



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**“EVALUAR EL EFECTO DEL GENIPIN SOBRE LA
CABEZA DEL NERVIÓ ÓPTICO, EN UN MODELO
ANIMAL DE GLAUCOMA”**

Carlos Miguel Córdoba Ortega

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de medicina, Departamento de cirugía, Programa Oftalmología
Bogotá, Colombia

2021

**“EVALUAR EL EFECTO DEL GENIPIN SOBRE LA
CABEZA DEL NERVIÓ ÓPTICO, EN UN MODELO
ANIMAL DE GLAUCOMA”**

Carlos Miguel Córdoba Ortega

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Oftalmólogo

Director (a):

Dr. Marcel Yecid Ávila Castañeda M.D. Oftalmólogo

Codirector (a):

Dra. Zulma Janeth Dueñas Gómez, Lic. Bio. MSc. PHD

Línea de Investigación: Glaucoma, estudio experimental en un modelo animal

Grupo de Investigación: Grupo de Investigación en Ciencias Básicas y Clínicas en
Oftalmología, Universidad Nacional de Colombia.

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de medicina, Departamento de cirugía, Programa Oftalmología

Bogotá, Colombia

2021

Toma una idea. Hazla tu vida: piensa sobre ella, sueña sobre ella,
vívela.

Deja que tus músculos, cerebro, nervios y cada parte de tu cuerpo se
llenen de esa idea.

Luego deja todas las demás ideas solas.

Ese es el camino hacia el éxito

(Swami Vivekananda)

Ora por cada una de tus decisiones de hoy...

Tú sabes lo que quieres, pero solo Dios sabe lo que verdaderamente
te conviene.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Carlos Miguel Córdoba Ortega

Nombre

Fecha 13/01/2021

VIII Evaluar el efecto del genipin sobre la cabeza del nervio óptico en un modelo animal
de glaucoma

Agradecimientos

A Dios por vigilar mi camino siempre y derramar sus bendiciones sobre mis sueños y anhelos.

A mi esposa y mi amado hijo por todo el cariño, comprensión y por haberme dado su tiempo con amor infinito para la consecución de mis sueños.

A mis padres por darme la vida y hacer de mi lo que soy sin pedir nada a cambio, por inculcar en mi los principios y valores y el don de servicio.

A mis hermanos por extenderme su apoyo y brindarme una mano en los tiempos difíciles.

A Magally por haber aceptado este trabajo a pesar de la magnitud, por brindarme su amistad y apoyo incondicional y encargarse de darle color a este proyecto.

A Jorge, estudiante de la Universidad Nacional por creer en mí y en la elaboración de este trabajo.

A mis profes, Dr. Ávila por enseñarme a persistir y elaborar ideas que forjaron mi camino en la investigación. A la Dra. Zulma Dueñas por enseñarme que las personas buenas existen y por toda su ayuda en la consecución de este trabajo. A la Dra. Amparo Mora por su cariño y acompañamiento incondicional.

Especial agradecimiento al equipo de bioterio de la Universidad Nacional de Colombia por la colaboración prestada para el cuidado de los animales.

Al laboratorio de histotecnopatología de la Universidad Nacional de Colombia, especialmente a Jeidy Acosta por su colaboración en la obtención y preparación de los tejidos.

Al Servicio Oftalmológico Veterinario SOV por abrirnos las puertas de la institución y facilitarnos el uso del tonómetro.

Resumen

Propósito: La reticulación del colágeno de la lámina cribosa y la esclera peripapilar, podría ser un método plausible para modular el estrés biomecánico y las lesiones basados en la tensión en la región laminar causados por el glaucoma.

Método: 32 ratas wistar albinas distribuidas en 4 grupos, los ojos derechos se infiltraron vía retrobulbar con genipin (15 mM y 150 mcl), BAPN (beta – aminopropilnitrilo) (10 mM y 150mcl). Los ojos izquierdos se usaron como controles. Se realizaron mediciones de la PIO inmediatas y semanales durante 1 mes con el tonómetro de rebote Tonolab. Se realizó inmunohistoquímica para la proteína S-100 y GFAP, para medir el cambio en la longitud del nervio óptico y el grado de bloqueo del transporte en la cabeza del nervio óptico. Finalmente, los cambios moleculares se analizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).

Resultados: Genipin no afectó la PIO ni la morfología de la cabeza del nervio óptico, en cambio, el BAPN redujo significativamente la PIO en todos los grupos de tratamiento. La relación copa / disco en ojos glaucomatosos había aumentado aproximadamente 0,6 en comparación con 0,3 en los controles. La longitud axial fue más pronunciada en los ojos tratados con BAPN. Por último, no observamos ningún cambio en la expresión de genes en los tratamientos.

Conclusión: La reticulación con genipin en ratas evita la deformación biomecánica la esclera peripapilar, tiene un efecto antiinflamatorio y neuroprotector, no observamos signos de toxicidad al evaluar los axones, las CGR y la anatomía macroscópica de los ojos después de la inyección retrobulbar de genipin ni de BAPN.

Palabras clave: Glaucoma, Genipin, BAPN, RGC, PIO.

Abstract

Purpose: Crosslinking of the collagen of the lamina cribrosa and the peripapillary sclera could be a plausible method to modulate biomechanical stress and strain-based injuries in the lamina region caused by glaucoma.

Method: 32 albino Wistar rats distributed in 4 groups, the right eyes were infiltrated via retrobulbar with genipin (15 mM and 150 μ l), BAPN (beta-aminopropionitrile) (10 mM and 150 μ l). The left eyes were used as controls. Immediate and weekly IOP measurements were made for 1 month with the Tonolab rebound tonometer. Immunohistochemistry was performed for the S-100 protein and GFAP, to measure the change in the length of the optic nerve and the degree of transport blockage in ONH. Finally, the molecular changes were analyzed using the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results: Genipin did not affect IOP or optic nerve head morphology, BAPN significantly reduced IOP in all treatment groups. The cup / disc ratio in glaucomatous eyes had increased to approximately 0.6 compared to 0.3 in controls. Axial length was more pronounced in BAPN-treated eyes. Finally, we did not observe any change in gene expression in the treatments.

Conclusion: Crosslinking with genipin in rats avoids biomechanical deformation of the peripapillary sclera, has an anti-inflammatory and neuroprotective effect, we did not observe signs of toxicity when evaluating axons, RGCs and macroscopic anatomy of the eyes after retrobulbar injection of genipin. nor from BAPN.

Keywords: Glaucoma, Genipin, BAPN, RGC, IOP.

Contenido

	Pág.
Resumen	XI
Lista de figuras	XVV
Lista de tablas	XVI
Lista de Símbolos y abreviaturas	XVII
Introducción	¡Error! Marcador no definido.9
1. Marco teórico	21
2. Justificación	25
3. Objetivos	26
3.1 Objetivo general	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. Metodología	28
4.1 Tipo y diseño del estudio	28
4.2 Sujetos experimentales	28
4.3 Procedimiento	29
4.3.1 Inducción de la anestesia	29
4.3.2 Inducción y medición de la presión intraocular	29
4.3.3 Infiltración retrobulbar del genipin y del BAPN.....	30
4.3.4 Inmunohistoquímica	30
4.3.5 Medición del grosor esclera	30
4.3.6 Reacción en cadena de la polimerasa RT-PCR	31
4.4 Análisis estadístico.....	31
5. Consideraciones éticas	¡Error! Marcador no definido.
5.1 Normatividad	32
5.2 Declaración de conflictos de interes	32
6. Resultados	¡Error! Marcador no definido.
6.1 Cambios en la presión intraocular en un modelo de glaucoma	33
6.2 Cambios en la PIO ante el tratamiento con genipin y BAPN sin glaucoma	34
6.3 El BPNA disminuye la PIO en modelo animal de glaucoma	35
6.4 El Genipin no genera cambios en la PIO en animales con glaucoma	35
6.5 Cambios anatómicos e histológicos	36

6.5.1	Cambios en el grosor escleral	37
6.5.2	Efecto antiinflamatorio de genipin sobre la cabeza del nervio óptico	38
6.6	Cambios en la expresión genica causada por el glaucoma	38
7.	Discusión	¡Error! Marcador no definido.
8.	Conclusiones y recomendaciones	¡Error! Marcador no definido.
9.	Bibliografía	¡Error! Marcador no definido.

Lista de figuras

	Pág.
Figura 6-1: Diferencias de la PIO entre los sujetos con glaucoma y sin glaucoma...	33
Figura 6-2: El BAPN disminuye la PIO en ojos sanos	34
Figura 6-3: El BAPN disminuye la PIO en ojos glaucomatosos.....	35
Figura 6-4: El Genipin no genera cambios en la PIO en glaucoma.	35
Figura 6-5: Cambios anatómicos en el nervio óptico..	3¡Error! Marcador no definido.
Figura 6-6: Cambios anatómicos en glaucoma con genipin.	3¡Error! Marcador no definido.
Figura 6-7: Cambios en el grosor esclerar disminuye con genipin.	37
Figura 6-8: Efecto antiinflamatorio del genipin	38

Lista de tablas

Pág.

Tabla 4-1: Grupos experimentales.....**¡Error! Marcador no definido.**

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>PIO</i>	Presión intraocular
<i>CGR</i>	Células ganglionares de la retina
<i>DM II</i>	Diabetes Mellitus Tipo II
<i>BAPN</i>	Beta – aminopropilnitrilo
<i>GA</i>	Gliceraldehido
<i>LALES</i>	Angeles Latino Eye Study
<i>GAA</i>	Glaucoma de ángulo abierto
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la salud
<i>CMT</i>	Células de la malla trabecular
<i>LIO</i>	Lente intraocular
<i>OCT</i>	Tomografía de coherencia óptica

Introducción

El glaucoma está caracterizado por un incremento de la presión intraocular (PIO) causada por una excesiva tensión biomecánica en la cabeza del nervio óptico donde residen las células ganglionares de la retina (CGR), las cuales se ven afectadas por esta enfermedad (1). El nervio óptico puede continuar dañándose a pesar de disminuir la presión intraocular, es por ello que puede existir daño glaucomatoso con presión normal (2). Existen estudios recientes sobre el manejo de la hipertensión ocular entre los que se destacan algunos factores de riesgo como la edad, la PIO, la relación excavación disco y el espesor corneal adelgazado, siendo este último hallazgo un factor importante que ha permitido el estudio de otras variables involucradas y ha generado un mayor interés en el estudio de las propiedades biomecánicas del revestimiento ocular y su papel en la fisiopatología del glaucoma (3, 4).

En trabajos preliminares como el estudio de tratamiento de hipertensión ocular y el estudio europeo de prevención del glaucoma, se ha determinado la relación inversa existente entre la diabetes Mellitus tipo II (DM II) y el riesgo de glaucoma, debido a una forma natural de reticulación de las fibras de colágeno secundarias a la glucosilación no enzimática de las proteínas, lo que conduce a la rigidez del tejido y por lo tanto un importante factor de protección (5, 6, 7).

Recientemente se ha propuesto la teoría biomecánica del daño glaucomatoso que según principios de ingeniería se han utilizado para explicar por qué una carga mecánica, la presión intraocular, puede llevar al desarrollo de una neuropatía óptica glaucomatosa específicamente dentro de la esclerótica y la lámina cribosa peripapilar influyendo directamente en la pérdida de células ganglionares de la retina en el glaucoma (8).

Dentro de las alternativas terapéuticas para mitigar dicho daño, se plantea la hipótesis de reducir estas tensiones excesivas mediante la reticulación de la esclerótica posterior que

rodea el nervio óptico para proteger a las CGR; es así, que dentro de las alternativas terapéuticas para obtener dicho efecto sobre la esclerótica se encuentra el genipin, un agente de entrecruzamiento de colágeno no fotoactivado, de origen natural, extraído de la fruta Gardenia, previamente investigado como colágeno para el uso ocular (9). El genipin es una molécula que tiene un efecto entrecruzador logrando la adhesión de las fibras de colágeno y haciendo los tejidos más fuertes y resistentes a la tracción mecánica y a la deformidad. Genipin-crosslinking se ha utilizado para mejorar la fuerza del cartílago articular, los tendones de la rótula humana y el refuerzo de la esclerótica posterior con excelente biocompatibilidad y menor toxicidad, es un agente de reticulación superior debido a su estabilidad, biocompatibilidad y seguridad general (9, 10, 11). Estudios previos, han indetificado que la administración retrobulbar de Genipin contribuye a una rigidez exitosa de la esclerótica posterior de la rata durante 4 semanas; sin embargo, en condiciones normales, sin presencia de glaucoma, el genipin no mitiga la perdida axonal, ni tampoco genera cambios en la expresión génica escleral relacionada con el recambio de la matriz extracelular o en la expresión génica retiniana de citocinas inflamatorias (12).

Tambien, existen otras teorías que refieren que el endurecimiento del complejo nervio óptico- esclera peripapilar, podría ser un factor protector. Sin embargo, estudios recientes usando diversas sustancias como glicerladehido, metilglioxal han demostrado efectos adversos; la aplicación directa de estos agentes de reticulación a la lámina cribosa y la esclerótica peripapilar puede aumentar la resistencia a la tracción de estas estructuras en explantes sometidos a análisis extensométricos (13, 14, 15).

Con base en estos antecedentes y buscando un posible método viable para el tratamiento del glaucoma, el objetivo de este estudio es utilizar un modelo animal de glaucoma y buscar revertirlo a través del endurecimiento del colágeno utilizando genipin, molécula de origen vegetal que tiene un efecto entrecruzador y permite la adhesión de las fibras de colágeno, haciendo los tejidos más fuertes y resistentes a las tracciones mecánicas y a la deformidad de la lámina cribosa y la esclerótica peripapilar. Las propiedades del genipin permitirían modular el estrés biomecánico y los mecanismos de lesión basados en la tensión en la región laminar, evitando así la aparición o ralentización de la progresión de la neuropatía óptica glaucomatosa.

Marco teórico

El glaucoma representa un grupo de enfermedades definidas por una neuropatía óptica característica que es consistente con la excavación y el debilitamiento de los elementos del tejido neural y conectivo del disco óptico que resultan de una lesión en los axones a nivel de la cabeza del nervio óptico que ocasiona el desarrollo eventual de patrones distintivos de disfunción visual (14,15, 16).

El glaucoma es el padecimiento que provoca mayor número de pacientes con ceguera irreversible en el mundo siendo la segunda causa de ceguera a nivel mundial, 4,5 millones de personas lo padecen en la actualidad con proyección a 11 millones de afectados para el 2020 según datos de la OMS; presenta una Incidencia 1% - 2% en mayores de 40 años a nivel mundial siendo afectados 2,4 millones por año, y su prevalencia se encuentra entre el 0.8% - 7%, este aumenta con la edad y varía de acuerdo poblaciones. En Estados Unidos constituye la primera causa de ceguera legal en pacientes de raza negra y la tercera en pacientes de raza blanca, después de la degeneración macular relacionada con la edad y la retinopatía diabética (16-19). De acuerdo con las características que originan el glaucoma, se clasifica así (20):

1. Glaucoma primario de ángulo cerrado
2. Glaucoma primario de ángulo abierto
3. Glaucoma de tensión normal
4. Glaucoma secundario (pseudoexfoliativo, pigmentario neovascular)
5. Glaucoma congénito
6. Otros tipos de glaucoma (inflamatorio, relacionado al LIO, traumático, por tumores etc.)

Los factores de riesgo relacionados con el glaucoma varían según su clasificación, por ejemplo, para glaucoma primario de ángulo cerrado: raza de origen mongoloide, sexo femenino, mayor edad, antecedentes familiares, hipermetropía; en el caso del glaucoma primario de ángulo abierto: raza negra, miopía, sexo sin diferencia, corneas delgadas, antecedentes familiares, edad, migraña. La presión intraocular elevada es el factor de riesgo más importante que, aunque su presencia no define la entidad si está directamente relacionada con la misma (21,22, 23) .

El diagnóstico del glaucoma se basa en un estudio clínico y paraclínico detallado y de seguimiento, es necesario realizar fondo de ojo, toma de presión intraocular, gonioscopia, campos visuales, paquimetría, OCT de nervio óptico (24).

En cuanto al tratamiento, el objetivo fundamental en el glaucoma es reducir la tasa de daño glaucomatoso a un punto en el que, con suerte, se mantenga la mayor visión funcional posible y para ello es necesario un buen control de la PIO que se logra a través de terapia farmacológica (análogos de las prostaglandinas, b agonistas, inhibidores de la anhidrasa carbónica agonistas simpaticomiméticos, agentes para simpaticomiméticos), terapia laser (trabeculoplastia, iridotomía) y si falla lo anterior procedimientos quirúrgicos (Trabeculectomía, cirugías no penetrantes, dispositivos de drenaje, microimplantes) (21-25).

Durante la última década, los principios de ingeniería se han utilizado para explicar por qué una carga mecánica: la presión intraocular, puede llevar al desarrollo de una neuropatía óptica glaucomatosa, que ha permitido proponer la "teoría biomecánica" del glaucoma (24,25). Ésta, plantea que el comportamiento de los tejidos conectivos de la cabeza del nervio óptico (específicamente dentro de la esclerótica y la lámina cribosa peripapilar) en respuesta a la presión intraocular (independientemente de su magnitud) puede influir directa e indirectamente en la fisiología y fisiopatología de la cabeza del nervio óptico. Dado que la biomecánica de la esclerótica y la lámina cribosa probablemente influyen en la pérdida de células ganglionares de la retina en el glaucoma, permite sugerir que alterar el comportamiento biomecánico teniendo un efecto protector contra el glaucoma (26). Los estudios realizados en gatos y monos con hipertensión ocular inducida experimentalmente han demostrado un bloqueo del transporte axonal ortogrado y retrógrado a nivel de la lámina cribosa (27), existe alguna evidencia que sugiere que la rigidez de la esclerótica peripapilar puede ser protectora contra el desarrollo

de glaucoma en un modelo animal (28). La idea de que alterar el comportamiento biomecánico podría proteger contra el glaucoma es una hipótesis prometedora. Es técnicamente posible como se ha hecho previamente usando crosslinking del colágeno mediante técnicas ya aplicadas in vivo a la córnea en el tratamiento del queratocono (27-31).

Como ya se mencionó, el Genipin es un agente entrecruzador de origen natural derivado de la planta gardenia jasminoides y del Genipa americano y ha demostrado ser el agente entrecruzador menos citotóxico en comparación de otros agentes como el glutaraldehído (28) Además de ser biocompatible (29) seguro y efectivo como entrecruzador de injertos en ingeniería de tejidos, así como en la aplicación en el campo de la producción de medicamentos de liberación sostenida y la aplicación en el microencapsulamiento de células madres de origen adiposo (30-31). Además del potencial en el manejo de enfermedades que tienen inflamación ocular, su efecto antiinflamatorio ha sido evaluado con resultados exitosos (32-34).

Se ha sugerido la rigidez escleral como una terapia potencial para glaucoma y miopía, Campbell y colaboradores estudiaron in vivo en modelo animal si la inyección retrobulbar de genipin causa una inmunidad o respuesta inflamatoria en la retina y concluyeron que no parece causar una respuesta inmune o inflamatoria en la retina (35).

Kimball y colaboradores en un modelo animal concluyó que la reticulación escleral usando gliceraldehído vía subconjuntival en un modelo de glaucoma indujo mayor daño axonal (36); recientemente Korneva y colaboradores (37) reforzó esta teoría, el entrecruzamiento con gliceraldehído de la esclerótica en ratones exacerba los cambios glaucomatosos en los componentes celulares del nervio óptico y la obstrucción del transporte axonal.

En estudios actuales se ha demostrado el factor antiinflamatorio y neuroprotector que tiene el genipin sin interferir en la función visual (34), sin embargo, existe también la teoría que probablemente el reblandecimiento del complejo nervio óptico esclera peripapilar y la extensión de la lámina cribosa podría tener un efecto relacionado con la disminución de la sobrecarga mecánica ejercida por la presión ocular, por lo tanto es necesario considerar comparativamente los efectos de la reticulación escleral y el reblandecimiento en la cabeza

del nervio óptico. Para ello, el BAPN un inhibidor conocido de la reticulación del colágeno, tiene importantes implicaciones en todas las áreas de la cirugía y lesión ocular para el control de la maduración del colágeno y sus complicaciones en la cicatrización (38-39).

Se ha demostrado que la reticulación de la matriz tiene efectos profundos sobre la resistencia al flujo de salida y la composición de las células de la malla trabecular (CMT) y son consistentes con el paradigma emergente de que cuanto más rígido es el CMT, menor es la facilidad de flujo de salida acuoso a través de la malla trabecular. No se ha determinado las implicaciones sobre el efecto del BAPN en el complejo nervio óptico esclera peripailar (38-40).

Justificación

El glaucoma corresponde a una patología ocular neurodegenerativa, que afecta progresivamente la estructura del nervio óptico, alterando la funcionalidad del campo visual. Esta afección es considerada la segunda causa más frecuente de ceguera a nivel mundial, después de la catarata (41). En 2013, se estimó que el número de personas con glaucoma alrededor del mundo era de 64,3 millones, cifra que se incrementaría a 76 millones en 2020 y a aproximadamente 111,8 millones en 2040, convirtiéndose esta patología en la segunda causa de ceguera en el mundo después de catarata y causando ceguera bilateral e irreversible a 8.4 millones de personas, que para el 2020 serían 11,2 millones (42, 43).

En Estados Unidos aproximadamente 4.4 millones de personas tienen glaucoma, de los cuales más de 120.000 personas resultan ciegas. En la población latina, según Los Angeles Latino Eye Study (LALES) la prevalencia de Glaucoma de ángulo abierto (GAA) es en promedio de 4.74%, siendo menor en población menor a 50 años (40-49 años; 1.32%) y hasta 16 veces mayor en población mayor de 80 años (21.76%) (40). Otros estudios realizados en población de 40-80 años sugiere una prevalencia de GPAA en Asia de 2.31%, África 4.20%, Europa 2.51%, Norte América 3.29%, Latinoamérica y Caribe de 3.65%, Oceanía 2.63% y mundial de 3.05% (44). En Colombia, en un estudio realizado por Juan Carlos Rueda en el 2005 se encontró en una población de adultos mayores de 50 años de bajos recursos económicos en el nororiente de Colombia una prevalencia del 5.41% de los cuales 84% desconocían este padecimiento (45). La prevalencia de ceguera es del 0.7% siendo el glaucoma la segunda causa después de la catarata y la retinopatía diabética (46).

El glaucoma no tiene cura y no es posible recuperar la visión perdida. En la actualidad, todas las terapias para el glaucoma, tanto farmacológicas como quirúrgicas, se basan en la necesidad de reducir la presión intraocular (PIO); cuando estos enfoques fallan, no hay otra alternativa de tratamiento. Por lo tanto, existe una necesidad clínica significativa de nuevos tratamientos efectivos para la pérdida de visión debida al glaucoma (47, 48). Dado lo anterior, el presente estudio busca determinar si el tratamiento con genipin resultar ser antiinflamatorio y neuroprotector para la enfermedad de glaucoma, dado sus efectos de entrecruzamiento de colageno sobre las células ganglionares de la retina, ya que, se ha determinado que el genipin protege el revestimiento esclerar por el efecto crosslinking del colágeno (49-53).

De acuerdo a lo postulado, el interés central del presente estudio es responder a la pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto del genipin sobre la cabeza del nervio óptico en un modelo animal de glaucoma?

Objetivos

3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto biomecánico del genipin sobre el complejo nervio óptico – lámina cribosa en un modelo animal de glaucoma.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar los cambios morfológicos del complejo nervio óptico posterior a la infiltración de genipin y de BAPN en la esclera peripapilar.
- Identificar si la aplicación de genipin induce alteraciones de los tejidos oculares incluyendo la capa de células ganglionares y fibras nerviosas.
- Determinar si el genipin tiene efecto antiinflamatorio y/o neuroprotector.
- Comparar el efecto del entrecruzamiento con genipin en las fibras del nervio óptico en un modelo de glaucoma respecto a un grupo control con reblandecimiento de las mismas usando beta – aminopropionitrilo con/sin glaucoma.

Metodología

4.1 Tipo y diseño del estudio

Estudio experimental en modelo animal con ratas albinas, ver la distribución de los grupos experimentales en la tabla 4-1.

Tabal 4-1. Grupos de acuerdo a los tratamientos experimentales.

GLAUCOMA	SIN GLAUCOMA
GRUPO 1: Glaucoma + BAPN (O.D) / Glaucoma (O.I)	GRUPO 3: BAPN (O.D) / Sano (O.I)
GRUPO 2: Glaucoma + Genipin (O.D) / Glaucoma (O.I)	GRUPO 4: Genipin (O.D) / Sano (O.I)

4.2 Sujetos experimentales

En este estudio se utilizaron 32 ratas albinas Wistar con edades entre 8 a 10 semanas, con un peso de 250-300 gr. Los sujetos fueron distribuidos en 4 grupos (8 animales en cada grupo), 26 hembras y 6 machos. Todas las ratas se alojaron en un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad proporcionándoles comida y agua ad libitum. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad Nacional de Colombia. Todos los procedimientos se adhirieron a la Declaración de ARVO para el uso de animales en la investigación oftálmica y visual.

4.3 Procedimiento

4.3.1 Inducción de la anestesia

Se realizó de acuerdo con lo reportado por Kimball et al (2014) así: una mezcla de ketamina / xilazina (100 mg / kg y 10 mg / kg, respectivamente, intraperitoneal; y se aplicó una gota de tetracaína tópica (0,5%; Alcon, Ginebra, Suiza), como anestésico local para ambos ojos. Durante la anestesia, los animales permanecerán en una manta de temperatura controlada a 37 ° C para mantener la temperatura corporal.

4.3.2 Inducción y medición de la presión intraocular

Se realizó la medición de la PIO basal antes de la inducción de la hipertensión intraocular con sutura circunferencial, se utilizó un tonómetro de rebote (tonolab, I CARE). El procedimiento de sutura se realiza con una sutura de 8/0 (nylon) alrededor del ecuador del ojo, mediante cinco o seis puntos de anclaje y nudos dobles en la conjuntiva. La sutura solo comprometió el espacio subconjuntival y, por lo tanto, no la esclerótica. Se realizó este procedimiento de acuerdo a lo reportado por Liu y colaboradores (54). Posterior a la sutura circunferencial se realizaron mediciones de manera inmediata de la PIO; estas mediciones se realizaron entre las 9:00 a.m. y las 11:00 a.m. El tonómetro se calibró previamente en un ojo canulado, en el que se configuró externamente la PIO en un rango de 7 a 50 mm Hg utilizando un depósito externo (datos no mostrados). Las ratas despiertas se sujetaron suavemente con la mano mientras se registraban diez lecturas de tonómetro en cada ojo. Eliminamos los valores de PIO más bajos y altos y promediamos las ocho mediciones restantes para representar la PIO de ese ojo. Las mediciones de la PIO se registraron en 0 (línea de base, justo antes de la inyección y la inducción de hipertensión ocular), y una vez por semana durante un mes, en relación con el momento de la inyección retrobulbar y el procedimiento quirúrgico. En cada uno de estos puntos de tiempo, los ojos de las ratas también se observaron a simple vista en busca de anomalías derivadas de las inyecciones retrobulbares y la cirugía.

4.3.3 Infiltración retrobulbar de genipin y BAPN

La administración de genipin se realizó a través de una infiltración por vía retrobulbar; para ello, se utilizó una aguja de insulina por vía inferotemporal (40, 52). Todas las inyecciones retrobulbares se realizaron utilizando una aguja de jeringa de insulina 31G estéril (aguja ultrafina BD 300 µl Insulin Syringe; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) insertada en el cuadrante inferior. Las ratas en los grupos de infiltración de genipin / HBSS, recibieron una única inyección retrobulbar de genipina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Richmond, VA) mezclada en HBSS (15 mM y 150 µl) unilateralmente, mientras que el ojo contralateral se utilizó como control. El procedimiento para la infiltración de BAPN se aplicó por vía retrobulbar (10 mM y 150 µl) (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Todos los ojos derechos fueron utilizados para el tratamiento y los ojos izquierdos como controles. Las ratas recibieron un antibiótico tópico (Certi-sporyn, Kansas City, MO) para evitar infecciones.

4.3.4 Inmunohistoquímica

Los animales fueron sacrificados con euthanex solución inyectable a una dosis de 150 mg/kg por vía IP para una posterior enucleación de los ojos y el nervio óptico, estos se fijaron en paraformaldehído al 4% que contenía tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) a una temperatura de 4°C, luego fueron colocados en sacarosa al 30% durante 3 horas. Los ojos fueron sumergidos en Tissue Tek y se criosectionaron a 12 µm de espesor. Las secciones congeladas se montaron y bloquearon con Blocking One (Nacalai Tesque, Japón) y las secciones de retina se incubaron con S 100 primario (1: 500), y proteína ácido fibrilar glial (1: 500) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU).

Se realizaron tinciones con hematoxilina en cortes de tejido con grosor de 15 µm en el nervio óptico, para indagar el efecto antiinflamatorio del genipin y del BAPN.

4.3.5 Medición del grosor escleral

Para la medición del grosor escleral se realizaron cortes de 5 mm del nervio óptico (NO) en 6 ubicaciones establecidas según protocolo de evaluación sistemática del ojo del ratón (47).

4.3.6. Reacción en cadena de la polimerasa en RT-PCR

Se enuclearon los globos completos, las escleróticas se limpiaron de grasa, tejido y músculo, se cortaron a lo largo del limbo y se abrieron para crear cuatro cuadrantes, inmediatamente después de retirado los tejidos se almacenaron en RNA Later durante dos días en congelación -20°C . El epitelio de pigmento retiniano (RPE) se retiró suavemente y se raspó de la esclerótica con una cuchilla y la esclerótica lavados en PBS para cortarla en trozos pequeños y luego se colocó en un tubo biomasher con trizol; y se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos.

Una vez que se adquirió el ARN, la cadena de ADNc se sintetizó a partir de ARN total mediante transcripción inversa utilizando oligodT y transcriptasa inversa Superscript I.

4.4 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de las medias de los grupos para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos evaluados con diferente tratamiento. Se verificó los supuestos de homocedasticidad (test de Levene) del modelo. Para los grupos donde no hubo diferencias entre las varianzas de las medias ($p > 0.05$), se utilizó la prueba de t de muestras independientes para determinar la diferencias entre las medias ($p < 0.05$ en la significancia bilateral) de los grupos evaluados.

En los grupos donde hubo diferencias significativas en las varianzas se realizó una comparación de medias por medio del estadístico de Mann-Whitney para comparar los datos de los diferentes grupos. Las comparaciones dentro de las mediciones se realizaron mediante una prueba de Wilcoxon considerando estadísticamente significativo un valor de p inferior a 0,05.

Se utilizó SPSS v22 para realizar todos los análisis estadísticos.

Consideraciones éticas

5.1 Normatividad

Todos los procedimientos que se llevarán a cabo durante el desarrollo de esta investigación se basan estrictamente en lo estipulado por la Ley 84 de 1989, especialmente lo mencionado en el capítulo VI: Del uso de animales vivos en experimentos e investigación; así mismo la reglamentación estipulada en la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, en la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, cumpliendo a cabalidad especialmente lo mencionado en Título V, en donde se mencionan los requisitos para llevar a cabo investigación biomédica con animales, siendo la presente investigación justificada en revisiones previas de artículos concernientes a modelos animales para estudio de glaucoma y a nuestro entender el primer modelo de infiltración directamente en el nervio óptico. Para el desarrollo de este estudio se seleccionarán y adquirirán legalmente ratas de la cepa CD1, de las cuales se hará uso del mínimo número requerido para obtener resultados científicamente válidos y se mantendrán en adecuadas condiciones sanitarias cumpliendo las reglamentaciones sanitarias en vigencia.

Según la resolución 8430 de 1993, se considera este estudio como una “investigación con riesgo mínimo” ya que el sujeto de investigación de este estudio, corresponde a investigación en modelo animal sujeto a todos los parámetros establecidos por la norma. Los animales serán mantenidos en condiciones controladas de bioterio y serán manejados bajo los protocolos de la Asociación para investigación en Oftalmología (ARVO)

5.2 Declaración de Conflicto de Intereses

Se declara que no existen conflictos de intereses por parte del investigador con el desarrollo del presente estudio.

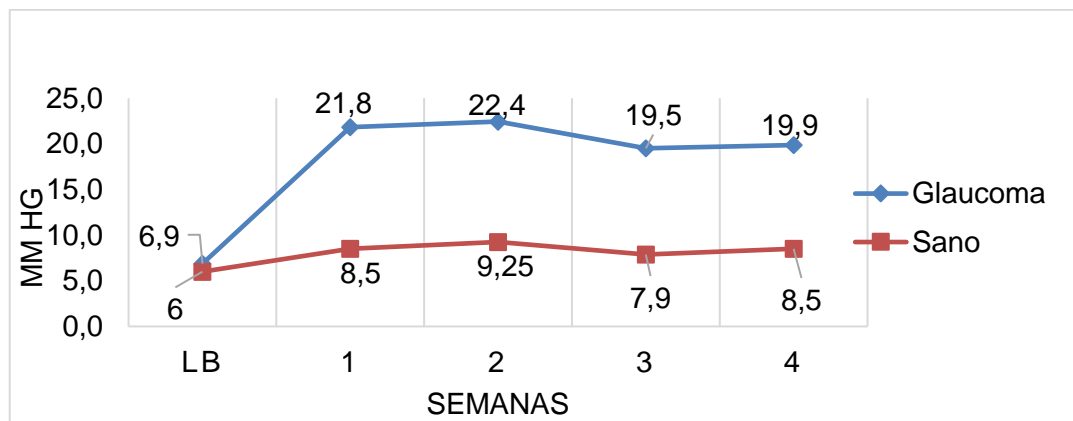
Resultados

Se utilizaron 32 sujetos experimentales (8 por cada grupo) 26 hembras y 6 machos. A todos los sujetos se les realizó medición de la presión intraocular dos veces durante el primer día (2 minutos y 1 hora) y una vez por semana durante 30 días.

6.1 Cambios en la presión intraocular a través de una técnica inductora de glaucoma

La cirugía circulumbar generó un incremento de la PIO durante el procedimiento quirúrgico a un nivel de 98 mmHg que fue disminuyendo gradualmente durante el mismo día de la cirugía a un nivel de $21,8 \pm 2,42$ mmHg. A lo largo de las cuatro semanas la PIO en los sujetos con cirugía limbar se mantuvo en un promedio de 19,35 mmhg en comparación con los sujetos sin intervención quirúrgica con una PIO de $8,25 \pm 2,35$ mmhg (ver figura 6-1), con una diferencia significativa entre las medias de los dos grupos durante las 4 semanas ($p= 0,001$ para la semana 1 y 2, y una diferencia de $p= 0,02$ para la semana 3 y 4).

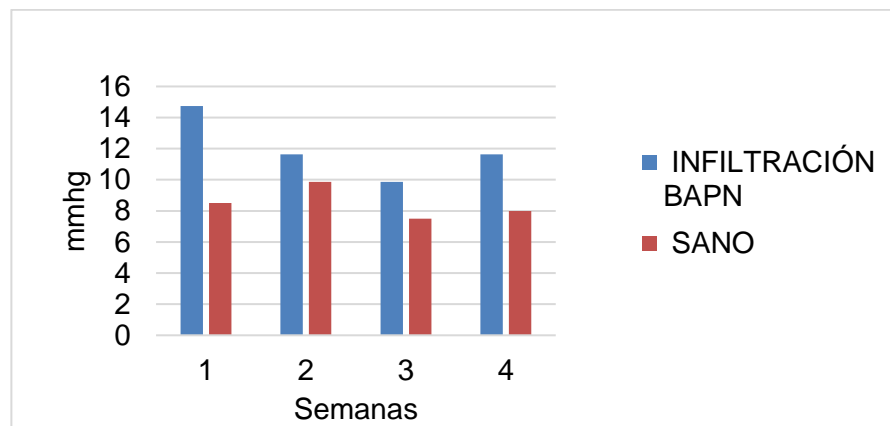
Figura 6-1. **Diferencias de la PIO entre los sujetos con glaucoma y sin glaucoma.** LB (Línea Base) fue registrado previamente a la cirugía, 6,45 mmhg fue promedio de todos los sujetos.



6.2 Cambios en la PIO ante el tratamiento con genipin y BAPN sin glaucoma.

Se administró una sola vez el tratamiento con BAPN y Genipin en ojos sanos sin intervención quirúrgica y se comparó con un grupo control. Se encontró una disminución de la PIO en la segunda y tercera semana en los sujetos con BPNA ($P= 0, 010$); estos cambios no se vieron reflejados en la PIO de los sujetos con ojos sanos ($P= 0.83$), lo que indica que la PIO se mantuvo igual durante las cuatro semanas en los ojos sanos. De manera contraria, en el tratamiento con genipin durante la semana 1 y 2 la PIO estuvo un poco más elevada ($p= 0, 055$) en comparación con los ojos de los sujetos sanos (ver figura 6-2).

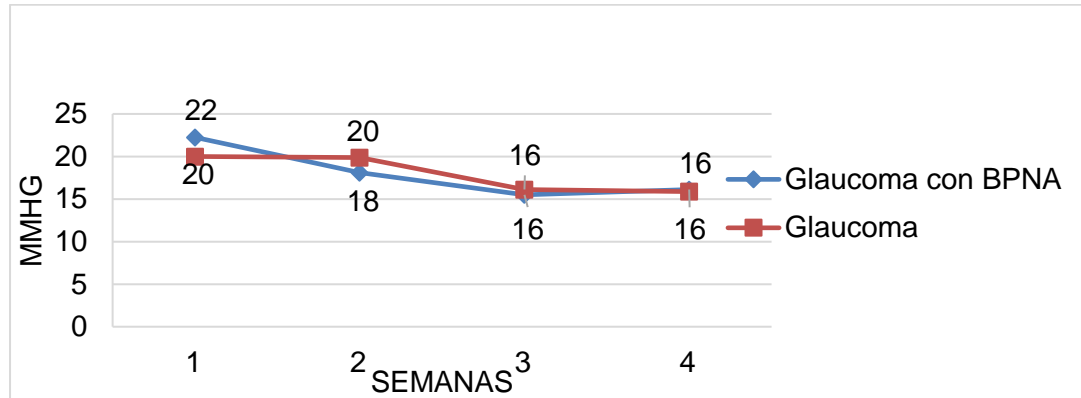
Figura 6-2. **El BAPN disminuye la PIO en ojos sanos, mientras que el Genipin eleva la PIO durante las dos primeras semanas.** Datos de la PIO con infiltración con BAPN en ojos sanos (color azul) comparado con la ojos sanos sin ninguna intervención (color rojo).



6.3 El BPNA disminuye la PIO en ojos glaucomatosos

El BPNA fue administrado una sola vez en el ojo derecho posterior a la cirugía limbar. Se encontró una disminución de la PIO durante la semana 1 y 2 en la PIO en los sujetos con BAPN ($p= 0,015$) en comparación con los sujetos con glaucoma sin tratamiento ($p= 0,859$); sin embargo, en la semana 3 y 4 no se encontraron diferencias en la PIO para ambos grupos (glaucoma con BAPN $P=0,274$, y glaucoma $p= 0,594$) (ver figura 6-3).

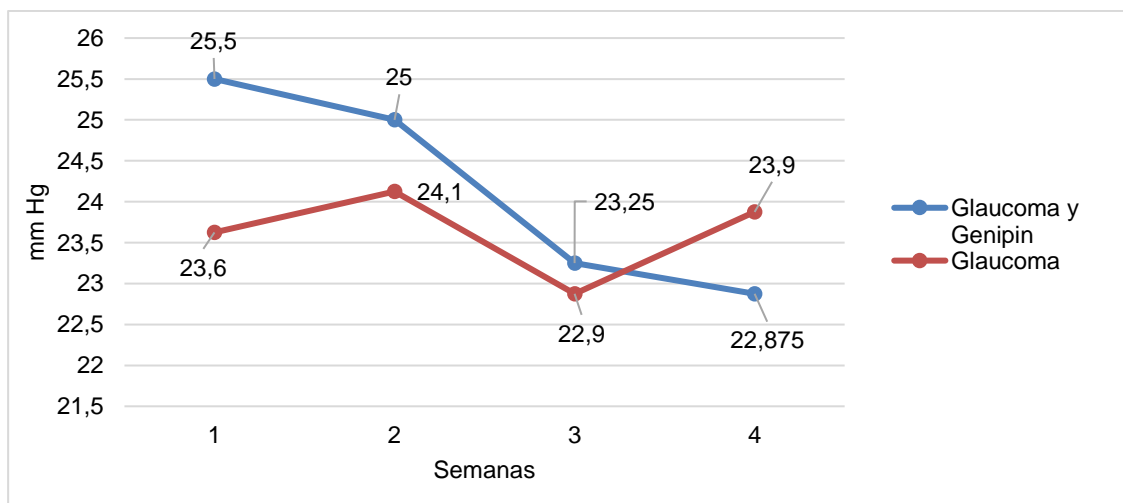
Figura 6-3. El BAPN disminuye la PIO en modelo de glaucoma durante las dos primeras semanas.



6.4 El Genipin no genera cambios en la PIO en animales con glaucoma

El Genipin fue administrado una única vez en el ojo derecho posterior a la cirugía. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo con glaucoma tratados con genipin ($p = 0,619$) y el grupo con solo glaucoma durante las 4 semanas ($p=0,341$) (Ver figura 6-4).

Figura 6-4. **El Genipin no genera cambios en la PIO en glaucoma.** Valores de la presión intraocular en glaucoma con infiltración de genipin. La línea roja refiere los valores de la PIO con glaucoma durante 4 semanas. La línea azul refiere los valores de la PIO en modelo animal de glaucoma con infiltración de genipin.



6.5 Cambios anatómicos e histológicos

Con respecto a los cambios anatómicos en el nervio óptico encontramos una relación copa-disco en los ojos glaucomatosos sin tratamiento que había aumentado 0,6 mm en comparación con los 0,2 mm de los controles (Ver figura 6-5).

Figura 6-5. **Cambios anatómicos en el nervio óptico.** A. Ojo izquierdo sin glaucoma ni tratamiento. B. Ojo derecho glaucomatoso sin tratamiento.

A.



B.



En adición, la longitud y el ancho axiales aumentaron significativamente con la PIO elevada en los ojos de solo glaucoma frente a los ojos tratados con genipin. La longitud axial fue mas pronunciada en los ojos tratados con BAPN (Ver figura 6-6).

Figura 6-6. **Cambios anatómicos en grupo con glaucoma con genipin.** A. Ojo derecho glaucomatoso. B. Ojo derecho glaucomatoso con infiltración de genipin.

A.



B.

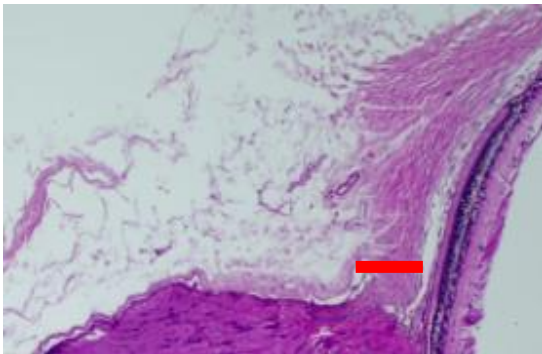


6.5.1 Cambios en el grosor esclerar

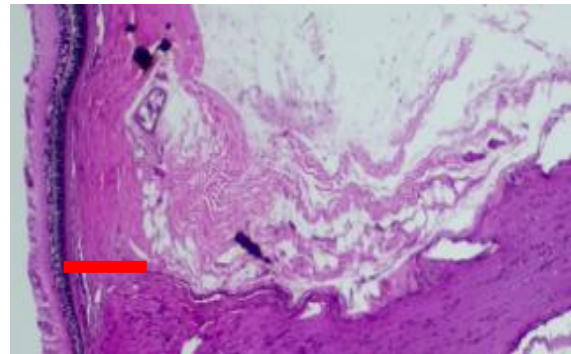
Con respecto al cambio en el grosor esclerar, encontramos en los ojos controles sin glaucoma una media de $152 \pm 2,1 \mu\text{m}$ en comparación con el grupo de glaucoma con un incremento en el grosor esclerar de $157 \pm 6,7 \mu\text{m}$ con una diferencia significativa de ($p=0.045$). Con respecto a los tratamientos, encontramos que el genipin en los ojos con glaucoma incrementó significativamente el grosor esclerar ($161 \pm 1,6 \mu\text{m}$) con respecto al glaucoma y al control ($P=0,036$). En contraste, con el grupo de BAPN que no presento diferencias significativas ($P: 0,82$) con el grupo control ni con el grupo de genipin con glaucoma (ver gráfica 6-7).

Figura 6-7. **Cambios en el grosor esclerar por el glaucoma con tratamiento con genipin.** A. Ojo derecho glaucomatoso. B. Ojo derecho glaucomatoso con infiltración de genipin.

A.



B.



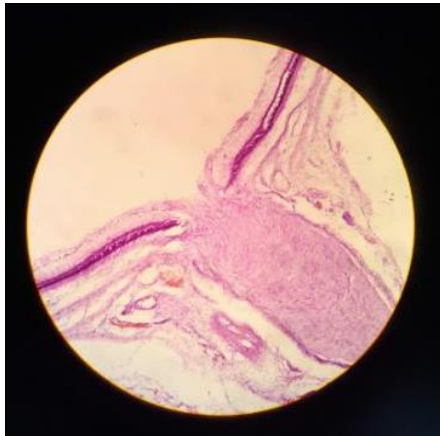
6.5.2 Efecto antiinflamatorio del genipin sobre la cabeza del nervio optico

A través de las tinciones con hematoxilina se evidenció una disminución de la deformación de la esclera peripapilar en el grupo con glaucoma con infiltración de genipin en comparación con el grupo control ($P=0.039$), evidenciando que, el genipin mitiga la rapidez de la deformación biomecánica del nervio óptico causado por el glaucoma, ver figura 6-8 . No se encontraron diferencias entre los ojos con infiltración de BAPN con glaucoma.

Tampoco se encontraron diferencias entre el grupo control y los de infiltración con genipin o BAPN. Claramente genipin parecer disminuir la excavación del nervio óptico.

Figura 6-8. **El genipin tiene un efecto antiinflamatorio sobre la cabeza del nervio óptico afectado por el glaucoma.** A. Ojo derecho glaucomatoso con infiltración de genipin. Relación copa disco 0.4. B. Ojo izquierdo glaucomatoso sin genipin, relación copa disco 0.8

A.



B.



6.6 Cambios en la expresión genica causada por el glaucoma

Para identificar los cambios generados sobre el glaucoma en las células ganglionares de la retina y en la expresión de otras proteínas, se realizó RT-PCR con los siguientes genes: -GFAP (glial fibrillary acid protein) para mirar la activación de astrocitos como agente activo inflamatorio, genes pro supervivencia con baja regulación: *Ywhaz*, *Ywhab* (Factor de estimulación de la importación mitocondrial), *Cpg 15* (Promotor el crecimiento de neuritas), *C3*, *B actin*, *Gadd45*. Los resultados mostraron mayor expresión de GFAP y una menor expresión de los genes *C3*, y *Cpg 15* en el grupo de glaucoma, pero no se encontraron diferencias entre los grupos con glaucoma con tratamiento de genipin y BAPN.

Discusión

El presente estudio evaluó el efecto biomecánico del BAPN y del genipin sobre el nervio óptico identificando cambios en la presión intraocular, en la reticulación escleral, y en la histología del nervio óptico en un modelo animal de glaucoma.

Se encontró que a través de la sutura circunlimbar se genera una hipertensión ocular crónica característico del glaucoma al observar una elevada PIO durante cuatro semanas en comparación con el grupo control; estos hallazgos son similares a otros estudios donde el modelo de sutura circunlimbar resulta eficiente para realizar mediciones de la PIO durante varias semanas permitiendo identificar cambios histopatológicos que inducen alteraciones en las CGR causados por el glaucoma (54, 56).

Con el fin de determinar el efecto de estos tratamientos en condiciones normales, se evaluó los cambios de la PIO con BAPN y genipin en ojos sin glaucoma, encontrando que el BAPN en condiciones normales disminuye levemente la PIO durante la semana dos y tres, mientras que el genipin eleva la PIO durante las dos primeras semanas. Para indagar su efecto sobre el glaucoma se utilizó el BAPN como tratamiento inhibidor de la reticulación del colágeno, encontrando que, la administración de BAPN disminuye la PIO durante las dos primeras semanas en comparación con el grupo de solo glaucoma; por el contrario, el tratamiento con genipin como inductor de colágeno no generó ningún cambio en la PIO en el grupo con glaucoma. Esto resulta similar a los hallazgos de Moorhead y colaboradores, donde utilizó BAPN como tratamiento posquirúrgico en pacientes con glaucoma severa durante 3 meses, el cual disminuir la PIO cerca de un 74% (22mmHg) al valor inicial prequirúrgico (40 +/- 14.1 mmH) (57); y a los hallazgos de Hannon y colaboradores (50) donde la rigidez escleral inducida por genipin no afectó la PIO durante 4 semanas.

Con respecto a la morfología, el tratamiento con genipin aumentó la reticulación escleral y no alteró la morfología de la cabeza del nervio óptico ni la esclera peripapilar después de 4 semanas de tratamiento; en contraste, el tratamiento con BAPN no presentó diferencias significativas con los ojos tratados con genipin. En estudios previos se observó la rigidez exitosa de la esclerótica posterior de la rata durante 4 semanas después de una única inyección retrobulbar de genipin (50,53). La exposición a genipin por sí solo no produjo

pérdida de axones de las células ganglionares a través de un efecto tóxico directo, evidenciando un proceso inflamatorio reducido para los tejidos tratados con genipin, y aparentemente no se evidenció daño en otras capas de la retina según lo evaluado por histología.

Según lo expuesto por Kimball y colaboradores (36), en un estudio en modelo animal con ratones CD1, sugieren que las alteraciones en la esclerótica inducidas por el tratamiento con GA condujeron a una mayor pérdida de axones de células ganglionares debido a la disminución de la tensión escleral (aumento de la rigidez), especialmente en la región peripapilar; los ojos de ratón tratados con GA tuvieron una mayor pérdida de axones RGC por la PIO elevada que los ojos inyectados con tampón o los ojos de control, controlando el nivel de exposición a la PIO. En este estudio, se comprobó que el genipin tiene un efecto antiinflamatorio importante en comparación con los controles sin tratamiento y con glaucoma, esto se evidenció a través de una disminución de la infiltración celular característico de los procesos inflamatorios agudos típicos de la enfermedad glaucomatosa.

Koo y colaboradores (58), demostraron que el genipin posee un efecto antiinflamatorio y es un eliminador de radicales hidroxilos específicos. También se presentan sus propiedades antiangiogénicas e inhibidoras de la producción de óxido nítrico (NO); además Hannon y colaboradores (50) comprobaron que el endurecimiento escleral posterior con una única inyección retro bulbar de genipin 15 mM no provoca déficits sostenidos en la función visual o retiniana ni a nivel molecular en la retina ni en la esclerótica. En nuestros hallazgos la morfología del axón de las células ganglionares de la retina parecía normal al identificar que la morfología del nervio óptico se mantiene conservada ante la presencia del genipin igual que con el BAPN, incluso, se observa un alargamiento del canal escleral de los ojos tratados con BAPN.

Nuestras comparaciones con BAPN a una concentración de 10mM demostraron un importante alargamiento del diámetro anteroposterior del globo ocular con respecto a los tratados con genipin, además moduló la PIO con resultados mas bajos a los observados en los tratamientos de reticulación escleral, sin embargo, las diferencias histológicas son similares en los diferentes grupos de tratamiento, es decir, que el genipin no modifica la morfología de las capas de la retina ni del nervio óptico, ni en condiciones normales ni con presencia de glaucoma. Con respecto al BAPN, este no genero efectos tóxicos en los

tejidos tal cual como lo demuestra Yang y colaboradores (38) en todas las secciones los tratamientos no tóxicos para las células de la malla trabecular, y que los efectos del flujo de salida no se debían a la pérdida de células.

Con respecto a los cambios en la expresión genética causados por el glaucoma, algunos estudios han encontrado una mayor expresión de genes prosupervivencia, genes pro inflamatorios y pro apoptóticos (59), nuestro objetivo fue identificar si esta expresión de genes podía revertirse ante los tratamientos con genipin o glaucoma, sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la expresión de los genes *Cpg 15*, *C3*, *B actin*, *Gadd45*, *GFAP* entre los grupos con tratamiento, posiblemente estos hallazgos sugieren que existe una gran variedad de cambios en la expresión génicas de las células ganglionares de la retina glaucomatosas que involucran múltiples vías moleculares, incluidos genes pro supervivencia que mitigan las acciones de agentes pro inflamatorios y pro apoptóticos.

Este estudio es pionero en utilizar el BAPN como inhibidor de la reticulación por vía retrobulbar en un modelo animal de glaucoma para determinar los efectos del reblandecimiento a nivel del complejo nervio óptico esclera peripapilar, para establecer un papel neuroprotector en la neuropatía óptica glaucomatosa.

Conclusiones y recomendaciones

La reticulación de la esclerótica con genipin en ratas evita la deformación biomecánica la esclera peripapilar con respecto a la evaluación de los controles, tiene un efecto antiinflamatorio y neuroprotector, no observamos signos de toxicidad al evaluar los axones RGC y la anatomía macroscópica de los ojos después de la inyección retrobulbar de genipin ni tampoco de BAPN. La diferencia más representativa en este trabajo con respecto al tratamiento con genipin y BAPN, es que este último parece modular la PIO en etapas tempranas de la enfermedad y no deforma el complejo nervio óptico esclera peripapilar en este modelo animal y prolonga el canal escleral. Este trabajo sienta las bases para futuros estudios in vivo para evaluar el entrecruzamiento escleral inducido por genipin para el tratamiento del glaucoma y es pionero en el uso de BAPN como probable alternativa en el tratamiento de la neuropatía óptica glaucomatosa.

Los presentes experimentos tienen ciertas limitaciones. Los ojos de las ratas y las respuestas oculares y sistémicas en el modelo de glaucoma animal deben interpretarse con precaución con respecto al glaucoma humano.

Se necesitan más estudios experimentales para ver la compatibilidad de los resultados, los estudios prospectivos futuros deben evaluar el papel de la rigidez ocular en el desarrollo y progresión del glaucoma.

Bibliografía

1. Parihar JK. Glaucoma: The 'Black hole' of irreversible blindness. *Med J Armed Forces India*. 2016; 72(1):3–4. doi:10.1016/j.mjafi.2015.12.001
2. Anderson, Douglas R. "Normal-tension glaucoma (Low-tension glaucoma)." *Indian journal of ophthalmology* vol. 59 Suppl, Suppl1 (2011): S97-101. doi:10.4103/0301-4738.73695
3. Miglior S, Zeyen T, Pfeiffer N, et al. Results of the European Glaucoma Prevention Study. *Ophthalmology*. 2005; 112(3): 366-375. doi:10.1016/j.ophtha.2004.11.030
4. Miglior S, Zeyen T, Pfeiffer N, Cunha-Vaz J, Torri V, Adamsons, European Glaucoma Prevention Study Group. The European glaucoma prevention study design and baseline description of the participants. *Ophthalmology*. 2002; 109(9):1612-1621. doi:10.1016/s0161-6420(02)01167-3
5. Wong V, Bui B, Vingrys A. Clinical and experimental links between diabetes and glaucoma, *Clinical & experimental optometry: journal of the Australian Optometrical Association*. 2010;91(1):4-23. <https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2010.00546.x>
6. Shih KC, Lam KS, Tong L. A systematic review on the impact of diabetes mellitus on the ocular surface. *Nutr Diabetes*. 2017;7(3):e251. Published 2017 Mar 20. doi:10.1038/nutd.2017.4
7. Nakamura M, Kanamori A, Negi A. Diabetes mellitus as a risk factor for glaucomatous optic neuropathy. *Ophthalmologica*. 2005;219(1):1-10. doi:10.1159/000081775
8. Campbell IC, Hannon BG, Read AT, Sherwood JM, Schwaner SA, Ethier CR. Quantification of the efficacy of collagen cross-linking agents to induce stiffening of rat sclera [published correction appears in *J R Soc Interface*. 2017 May;14 (130):]. *J R Soc Interface*. 2017;14(129):20170014. doi:10.1098/rsif.2017.0014
9. Koriyama Y, Takagi Y, Chiba K, Yamazaki M, Sugitani K, et al. (2013) Requirement of Retinoic Acid Receptor b for Genipin Derivative-Induced Optic Nerve Regeneration in Adult Rat Retina. *PLoS ONE* 8(8): e71252. doi: 10.1371/journal.pone.0071252
10. Rijt SV, Habibovic P. Enhancing regenerative approaches with nanoparticles. *J R Soc Interface*. 2017 Apr; 14(129): 20170014, Published online 2017 Apr 5. Doi 10.1098/rsif.2017.0014

11. Phulke S, Kaushik S, Kaur S, Pandav SS. Steroid-induced Glaucoma: An Avoidable Irreversible Blindness. *J Curr Glaucoma Pract.* 2017;11(2):67-72. doi:10.5005/jp-journals-l0028-1226
12. Shin JK, Lee SM. Genipin protects the liver from ischemia/reperfusion injury by modulating mitochondrial quality control. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017;328:25-33. doi:10.1016/j.taap.2017.05.002
13. Avila MY, Gerena VA, Navia JL. Corneal crosslinking with genipin, comparison with UV-riboflavin in ex-vivo model. *Mol Vis.* 2012;18:1068-1073.
14. Pijanka JK, Coudrillier B, Ziegler K, Sorensen T, Meek KM, Nguyen TD, Quigley HA, Boote C: Quantitative mapping of collagen fiber orientation in non-glaucoma and glaucoma posterior human sclerae. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012, 53:5258-5270.
15. Girard MJ, Dahlmann-Noor A, Rayapureddi S, Bechara JA, Bertin BM, Jones H, Albon J, Khaw PT, Ethier CR: Quantitative mapping of scleral fiber orientation in normal rat eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011, 52:9684-9693.
16. Hannon BG, Luna C, Feola AJ, et al. Assessment of Visual and Retinal Function Following In Vivo Genipin-Induced Scleral Crosslinking. *Transl Vis Sci Technol.* 2020;9(10):8. Published 2020 Sep 8. doi:10.1167/tvst.9.10.8
17. Strouthidis NG, Girard MJ. Altering the way, the optic nerve head responds to intraocular pressure—a potential approach to glaucoma therapy. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13(1):83-89. doi:10.1016/j.coph.2012.09.001
18. Beidoe G, Mousa SA. Current primary open-angle glaucoma treatments and future directions. *Clin Ophthalmol.* 2012;6:1699-1707. doi:10.2147/OPTH.S32933
19. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma: A Review. *JAMA.*2014; 311(18):1901–1911. doi:10.1001/jama.2014.3192
20. Mantravadi AV, Vadhar N. Glaucoma. *Prim Care.* 2015;42(3):437-449. doi: 10.1016/j.pop.2015.05.008
21. E. Kim and R. Varma, “Glaucoma in Latinos/Hispanics.,” *Curr. Opin. Ophthalmol.*, vol. 21, no. 2, pp. 100–105, 2010.
22. Alm A. Latanoprost in the treatment of glaucoma. *Clin Ophthalmol.* 2014; 8:1967-1985<https://doi.org/10.2147/OPTH.S59162>
23. Girard MJ, Suh JK, Bottlang M, Burgoyne CF, Downs JC. Biomechanical changes in the sclera of monkey eyes exposed to chronic IOP elevations. *Invest Ophthalmol Vis*

- Sci.* 2011; 52: 5656–5669.
24. H. A. Quigley, "Number of people with glaucoma worldwide.," *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 80, no. 5, pp. 389–393, 1996.
 25. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma: A Review. *JAMA*.2014;311(18):1901–1911. doi:10.1001/jama.2014.3192
 26. Girard MJ, Dahlmann-Noor A, Rayapureddi S, Bechara JA, Bertin BM, Jones H, Albon J, Khaw PT, Ethier CR: Quantitative mapping of scleral fiber orientation in normal rat eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011, 52:9684-9693.
 27. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol.* 2006;90(3):262-267. doi:10.1136/bjo.2005.081224
 28. Prevalencia de glaucoma y factores de riesgo asociados en una población de adultos mayores de 50 años de bajos recursos económicos en el nororiente de Colombia. Juan Carlos Rueda. 2005.
 29. Cuellar Saenz, Z. La Ceguera. Un compromiso de todos. *Medicina.* 2003. 24(3), 188-196. Recuperado a partir de <https://revistamedicina.net/ojsanm/index.php/Medicina/article/view/60-3>
 30. Foster PJ, Buhrmann R, Quigley HA, Johnson GJ. The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. *Br J Ophthalmol.* 2002;86(2):238-242. doi:10.1136/bjo.86.2.238
 31. Cuellar Saenz. Ceguera y pobreza en el siglo XXI .*Cuadernos de medicina en investigación y salud.* Año 1, Vol 1- Número 3 - Dic 2007
 32. Thornton IL, Dupps WJ, Sinha Roy A, Krueger RR. Biomechanical effects of intraocular pressure elevation on optic nerve/lamina cribrosa before and after peripapillary scleral collagen cross-linking. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(3):1227-1233. doi:10.1167/iovs.08-1960
 33. Y. C. Tham, X. Li, T. Y. Wong, H. A. Quigley, T. Aung, and C. Y. Cheng. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: A systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology.* 2014.(121)11:2081–2090. doi.org/10.1016/j.optha.2014.05.013
 34. Ma Y, Pavlatos E, Clayson K, Pan X, Kwok S, Sandwisch T, Liu J. Mechanical Deformation of Human Optic Nerve Head and Peripapillary Tissue in Response to Acute IOP Elevation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.*2019 (60): 913-

920. doi:10.1167/iops.18-26071
35. Campbell IC, Coudrillier B, Mensah J, Abel RL, Ethier CR. Automated segmentation of the lamina cribrosa using Frangi's filter: a novel approach for rapid identification of tissue volume fraction and beam orientation in a trabeculated structure in the eye. *J. R. Soc. Interface.* 2015;12
 36. Kimball E, Nguyen C, Steinhart MR, Nguyen, TD, Pease M, Oglesby EN, Oveson BC, Quigley HA. Experimental scleral cross-linking increases glaucoma damage in a mouse model. *Experimental Eye Research.* 2014. 128:129-140. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.08.016>.
 37. Korneva A, Nguyen C, Schaub J, Nguyen T, Quigley H. Biomechanical effects on the mouse optic nerve head in experimental scleral crosslinking in glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2019.
 38. Yang, YF., Sun, Y., Acott, T. *et al.* Effects of induction and inhibition of matrix cross-linking on remodeling of the aqueous outflow resistance by ocular trabecular meshwork cells. *Sci Rep* 6, 30505 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep30505>
 39. Denlinger D, Keates RH. Effect of beta-aminopropionitrile (BAPN) on corneal wound strength. *Ann Ophthalmol.* 1984;16(7):625-627
 40. Tehrani S, Delf RK, Cepurna WO, Davis L, Johnson EC, Morrison JC. In Vivo Small Molecule Delivery to the Optic Nerve in a Rodent Model. *Sci Rep.* 2018;8(1):4453. Published 2018 Mar 13. doi:10.1038/s41598-018-22737-4
 41. American Academy of Ophthalmology. Section 6: Glaucoma. 2012
 42. Foster PJ, Buhrmann R, Quigley HA, Johnson GJ. The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. *Br J Ophthalmol.* 2002;86(2):238-242. doi:10.1136/bjo.86.2.238
 43. Cheng JW, Wei RL. Meta-analysis of 13 randomized controlled trials comparing bimatoprost with latanoprost in patients with elevated intraocular pressure. *Clin Ther.* 2008;30(4):622-632. doi:10.1016/j.clinthera.2008.04.006
 44. Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology.* 2014;121(11):2081-2090. doi:10.1016/j.ophtha.2014.05.013
 45. H. A. Quigley, "Number of people with glaucoma worldwide.," *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 80, no. 5, pp. 389–393, 1996.
 46. H. A. Quigley and A. T. Broman, "The number of people with glaucoma worldwide in

- 2010 and 2020.” *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 90, no. 3, pp. 262–7, 2006
47. Prevalencia de glaucoma y factores de riesgo asociados en una población de adultos mayores de 50 años de bajos recursos económicos en el nororiente de Colombia. Juan Carlos Rueda. 2005.
 48. Dare E, V, Griffith M, Poitras P, Kaupp J, A, Waldman S, D, Carlsson D, J, Dervin G, Mayoux C, Hincke M, T: Genipin Cross-Linked Fibrin Hydrogels for in vitro Human Articular Cartilage Tissue-Engineered Regeneration. *Cells Tissues Organs* 2009; 190:313-325. doi: 10.1159/000209230
 49. Zhou X, Wang J, Fang W, Ta Y, Zhao T, Xia J, Liang C, Hua J, Li F, Chen Q. Genipin cross-linked type II collagen/chondroitin sulfate composite hydrogel-like cell delivery system induces differentiation of adipose-derived stem cells and regenerates degenerated nucleus pulposus. *Acta Biomaterialia*. 2018. 71: 496-509.
 50. Hannon, BG, Schwaner SA, Boazak EM, Gerberich BG, Winger EJ, Prausnitz, MR, Ethier CR. Sustained scleral stiffening in rats after a single genipin treatment. *Journal of the Royal Society*. (2019) 16(159). <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0427>
 51. Paul, A., Cantor, A., Shum-Tim, D. et al. Superior Cell Delivery Features of Genipin Crosslinked Polymeric Microcapsules: Preparation, In Vitro Characterization and Pro-Angiogenic Applications Using Human Adipose Stem Cells. *Mol Biotechnol* 48, 116–127 (2011). <https://doi.org/10.1007/s12033-010-9352-8>
 52. Coudrillier B, Campbell IC, Read AT, et al. Effects of Peripapillary Scleral Stiffening on the Deformation of the Lamina Cribrosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(6):2666-2677. doi:10.1167/iovs.15-18193
 53. Campbell IC, Hannon BG, Read AT, Sherwood JM, Schwaner SA, Ethier CR. 2017 Quantification of the efficacy of collagen cross-linking agents to induce stiffening of rat sclera. *J. R. Soc. Interface* 14: 20170014. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2017.0014>
 54. Liu H, Flanagan J. A Mouse Model of Chronic Ocular Hypertension Induced by Circumlimbal Suture *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2017; 58(1):353-361. doi:10.1167/iovs.16-20576
 55. H. He Z, Zhao D, van Koeveerden AK, et al. A Model of Glaucoma Induced by Circumlimbal Suture in Rats and Mice. *J Vis Exp*. 2018;(140):58287. Published 2018 Oct 5. doi:10.3791/58287
 56. Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, et al. Retrograde axonal transport of BDNF

- in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41(11):3460-3466
57. Moorhead LC, Smith J, Stewart R, Kimbrough R. Effects of beta-aminopropionitrile after glaucoma filtration surgery: pilot human trial. *Ann Ophthalmol.* 1987;19(6):223-225.
58. Koo HJ, Song YS, Kim HJ, et al. Anti-inflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. *Eur J Pharmacol.* 2004;495(2-3):201-208. doi:10.1016/j.ejphar.2004.05.0
59. Wang, A Ray, K Rodgers, et al. Global Gene Expression Changes in Rat Retinal Ganglion Cells in Experimental Glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* August 2010, Vol.51, 4084-4095. doi.org/10.1167/iovs.09-4864