



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

“El potencial terapéutico y antiinflamatorio del Genipin en un modelo de infección corneal”

Yinna Marcela Huertas Bello

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Cirugía

Unidad de Oftalmología

Bogotá, Colombia

Año 2021

“El potencial terapéutico y antiinflamatorio del Genipin en un modelo de infección corneal”

Yinna Marcela Huertas Bello

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

.

Director (a):

Dr. Marcel Yecid Ávila Castañeda

Codirector (a):

Elena Koudouna, PhD.

Línea de Investigación:

Ciencias Básicas en Oftalmología

Facultad de Medicina, Departamento de Cirugía

Unidad de Oftalmología

Bogotá, Colombia

Año 2021

La familia es el comienzo y el fin porque con la familia caminado de la mano, no hay nada imposible, en cambio, todo es posible

A mis padres y hermanas: mi apoyo incondicional, compañía y guía en la construcción de mis sueños.

.

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.

Fecha 2/12/2020

Agradecimientos

A mis padres, por su amor incondicional, apoyo, paciencia y dedicación.

A mis hermanas, que son el mejor regalo de la vida, gracias por transitar este camino conmigo y hoy ser parte de este éxito.

A Dios presente en mi vida.

A la Dra. Elena Koudouna por ser mi mentora, por compartir su conocimiento. Admiro su dedicación, sencillez y gran calidad humana. Estoy infinitamente agradecida además por su amistad.

Al proyecto Horizon 2020 de la Unión Europea, Grant 793328 Marie Curie, gracias al cual se financió este trabajo.

Al Dr. Marcel Ávila que con su curiosidad por la investigación hace de sus estudiantes profesionales inquietos, creativos y apasionados por la ciencia.

Al departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y a la Dra Miriam Navarrete por proporcionar acceso a laboratorio y a los materiales necesarios para llevar a cabo este trabajo.

A Cristian Nicolas Rodríguez, Bacteriólogo por la asesoría en la metodología y su acompañamiento permanente en el desarrollo del protocolo. A la Dra Sandra Henao, Bacterióloga por su asesoría científica en la metodología.

Al grupo de laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia, María Clemencia Cortés Rueda y a la Histotecnóloga Jaydi Acosta Álvarez por el apoyo técnico en este trabajo.

Al Dr. Fabio Aurelio Rivas Muñoz por su ayuda en el análisis estadístico de los datos.

A Natalia Ramírez Pachón por las ilustraciones (<https://www.behance.net/nataliaramrez>).

Resumen

Propósito: Investigar la efectividad de la reticulación de colágeno corneal con Genipin (GEN) para el tratamiento de la queratitis bacteriana, en un modelo de infección corneal ex vivo con córneas porcinas.

Métodos: Se descontaminaron parejas de botones corneales y posteriormente se infectaron con *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) o *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) según el grupo. Treinta minutos después de la inoculación bacteriana; un ojo se trató con solución salina y el ojo contralateral se trató con GEN (n = 6 pares para cada microorganismo). También se realizó un control de esterilidad con corneas no expuestas a bacterias. Después de 24 h de incubación, la mitad de cada córnea se homogenizó y la se realizaron diluciones seriadas de la suspensión resultante, posteriormente se sembraron en placas de agar para recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) / córnea. La otra mitad de cada cornea se sometió a examen histológico.

Resultados: Macroscópicamente las corneas infectadas tratadas con Solución Salina (SSN) mostraron más turbidez y ulceración corneal versus las tratadas con GEN. Histológicamente, las tinciones de H-E y Gram confirmaron una infiltración bacteriana extensa en toda la córnea. El número de UFC disminuyó significativamente en las córneas tratadas con GEN vs las tratadas con SSN ($p < 0,05$). Las córneas de control de esterilidad no evidenciaron ninguna infección.

Conclusiones: El entrecruzamiento corneal con GEN podría servir como una opción terapéutica novedosa para el tratamiento de la queratitis bacteriana. Se necesitan más estudios para esclarecer la actividad antibacteriana y el mecanismo de acción de GEN.

Palabras clave: crosslinking, queratitis infecciosa, queratitis bacteriana, infección corneal por *Staphylococcus aureus*, infección corneal por *Pseudomonas aeruginosa*, Genipin, modelo de infección corneal ex vivo.

Abstract

Purpose: To investigate the effectiveness of corneal collagen crosslinking with Genipin (GEN) for the treatment of bacterial keratitis, in an ex vivo corneal infection model with porcine corneas.

Methods: Previously decontaminated pairs of corneal buttons were infected with *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) or *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Thirty minutes after bacterial inoculation; one eye was treated with saline solution and the contralateral eye was treated with GEN (n = 6 pairs for each microorganism). A sterility control was also carried out. After 24 h of incubation, half of each cornea was homogenized and serial dilutions of the resulting suspension were made, later they were seeded on agar plates for the count of colony forming units (CFU) / cornea. The other half of each cornea underwent histological examination.

Results: Macroscopically, infected corneas treated with Saline Solution (SSN) showed more turbidity and corneal ulceration versus corneas with GEN treatment. Histologically, H&E and Gram stains confirmed extensive bacterial infiltration throughout the cornea. The number of CFUs decreased significantly in corneas treated with GEN vs those treated with SSN (p <0.05). The sterility control corneas did not show any infection.

Conclusions: Corneal crosslinking with GEN could serve as a novel therapeutic option for the treatment of bacterial keratitis. More studies are needed to clarify the antibacterial activity and mechanism of action of GEN.

Keywords: corneal crosslinking, infectious keratitis, bacterial keratitis, *Staphylococcus aureus* corneal infection, *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection, Genipin, Keratitis ex vivo animal model.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XII
Lista de tablas	XIII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XIV
Introducción	15
1. Marco Teórico.....	17
2. Justificación	25
3. Objetivos.....	26
4. Consideraciones Éticas	27
5. Metodología	29
6. Resultados.....	33
7. Discusión.....	37
8. Conclusiones.....	39
Bibliografía	41

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Aproximación a la clasificación de Microorganismos con tinción de Gram.	22
Figura 2: Esquema ilustrativo de los grupos experimentales	29
Figura 3: Esquema ilustrativo del protocolo experimental	31
Figura 4: Resultados de la prueba de susceptibilidad bacteriana	33
Figura 5: Análisis macroscópico de la infección corneal.....	34
Figura 6: Análisis histológico de la infección corneal.....	35
Figura 7: Análisis cuantitativo de la infección corneal.....	36
Figura 8: Gráficas del Análisis estadístico.....	36

Lista de tablas

	Pág.
Tabla-1: Esquemas terapéuticos para tratamiento de la queratitis bacteriana.	20
Tabla-2 : Error estandar y promedio de los grupos experimentales.....	36

Lista de Símbolos y abreviaturas

GEN Genipin

UFC Unidades Formadoras de Colonias.

S. aureus *Staphylococcus aureus*

P. aeruginosa *Pseudomonas aeruginosa*

Crosslinking Entrecruzamiento del Colágeno corneal.

PACK-CXL Photoactivated Chromophore Crosslinking

BHI Brain-Heart Infusion

DMSO Dimethyl Sulfoxide

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

SSN Solución Salina Normal estéril

H-E Hematoxilina Eosina

Introducción

La queratitis infecciosa es una entidad que causa alta morbilidad y es una causa de ceguera importante a nivel mundial [1], reportándose 1.5-2.0 millones de nuevos casos de ceguera cada año [2,3], la queratitis infecciosa puede ser causada por hongos, virus, parásitos y más frecuentemente por bacterias en 90% de los casos, siendo los microorganismos más frecuentemente reportados el *Staphylococcus aureus* y la *Pseudomonas aeruginosa* [4-7]. Los factores de riesgo más frecuentemente encontrados en pacientes con queratitis infecciosa incluyen el uso de lentes de contacto, enfermedad de la superficie ocular y trauma [8,7]. Su manejo requiere instauración rápida de tratamiento ya que es una condición que puede tener complicaciones nefastas como cicatrización corneal, perforación ocular, endoftalmitis y pérdida del globo ocular con consecuente pérdida visual irreversible en los casos más avanzados [9,10].

El tratamiento estándar comprende el uso de medicamentos antimicrobianos, los cuales en ocasiones no son fácilmente accesibles para los pacientes, principalmente en países subdesarrollados [3, 11, 12]. Además, el incremento de la resistencia bacteriana a nivel mundial para los medicamentos de primera línea, e inclusive para quinolonas de tercera y cuarta generación [13-16], sumado a los malos resultados visuales de esta enfermedad per se [13-15], hacen que el control de esta infección sean un desafío. Teniendo que acudir como última alternativa en casos avanzados, a las queratoplastias tectónicas que tienen pobres resultados visuales, pueden generar aumento de presión intraocular y presentan una alta tasa de rechazo injerto contra huésped [17-19]. Ante este panorama es necesario buscar otras alternativas de tratamiento para estos pacientes.

El entrecruzamiento corneal nace como una alternativa ante esta problemática [20-25], con la hipótesis que una córnea que se endurece mediante el entrecruzamiento de sus fibras de colágeno es más resistente a la digestión de proteasas y colagenasas [26-29]. Además, la exposición a radicales libres de UVA necesario para realizar este procedimiento, se piensa que daña el ADN de los microorganismos, reduciendo la proliferación de estos. El

uso del PACK-CXL termino dado al crosslinking realizado en keratitis infecciosa, se reportó inicialmente con los agentes usados tradicionalmente en el crosslinking convencional: Rivoflabina y UVA [30-34]. Sin embargo, se han encontrado algunas limitaciones para su uso, entre ellas la presencia de opacidades o cicatrices corneales que podrían limitar la penetración de la riboflavina y la luz UV [33,34]. Por otra parte, se ha contraindicado su uso en corneas con espesor menor de 400 micras (condición frecuente en pacientes con queratitis infecciosa), antecedente de queratitis herpética y enfermedades autoinmunes [29-33]. Las inquietudes que surgen con esta terapia incluyen el riesgo de daño y pérdida endotelial [35-38], el riesgo de reactivación de queratitis virales herpéticas, la penetración incompleta y no homogénea en las úlceras corneales [39] y además es un tratamiento que requiere poseer equipos especiales que no están fácilmente disponibles en países como el nuestro [3,9, 10].

En los últimos años se ha reportado que el Genipin (GEN), una molécula natural, derivada de la planta *gardenia jazminoides* y del *Genipa americano*, tiene propiedades que generan entrecruzamiento corneal, con baja toxicidad, excelente biocompatibilidad y seguridad [40-46] en estudios ex vivo e in vivo [47-49]. GEN además posee propiedades antiinflamatorias [50-55], antioxidantes [56, 57], antimicrobianas [58].

En este trabajo se estudió el efecto antibacteriano de GEN contra *S. aureus* y *P. aeruginosa* en un modelo de queratitis bacteriana ex vivo en corneas de cerdo, proponiendo que el entrecruzamiento corneal con GEN podría ser un tratamiento novedoso, con baja toxicidad y sin requerimiento de equipos sofisticados de emisión de luz UV, cuyos resultados sin duda alguna contribuirán al desarrollo de nuevas terapias para el manejo de las queratitis infecciosas.

Marco Teórico

1.1. Anatomía corneal.

La córnea además de ser la principal estructura refractiva del ojo proporciona estabilidad mecánica y es una barrera de protección para el segmento anterior del ojo. Es transparente, avascular, y está compuesta por varias capas: El epitelio se encuentra en la parte anterior. La lamina de Bowman es el límite entre el epitelio y el estroma. El estroma constituye el 90% del espesor corneal, y el endotelio es la capa más interna [59]. La córnea está compuesta en su mayoría por colágeno I, proteoglicanos no fibrilares; redes de fibrilina; y glicoproteínas [59]. Las células presentes en la córnea comprenden: células madre presentes en el limbo corneoescleral. Células dendríticas, un tipo de células presentadoras de antígeno específicas, encargadas de la respuesta inmune y que tienen un papel importante en la cicatrización corneal [59]. Los queratocitos, otro tipo celular muy predominante, desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la transparencia y homeostasis corneal a través de la producción de colágeno, proteoglicanos y cristalinas [60]. Se ha encontrado que la apoptosis de los queratocitos inducida por trauma e infección y su remplazo por fibroblastos, alteran la organización de la matriz estromal, llevando a turbidez corneal, neovascularización y pérdida de la visión [59,60].

1.2. Queratitis Bacteriana

1.2.1. Epidemiología y factores de riesgo

La queratitis bacteriana representa aproximadamente el 90% de todos los casos de queratitis a nivel mundial [6,2,12]. Siendo las bacterias más prevalentes: *S. aureus* y *P. aeruginosa* (microorganismo más común en todo el mundo) [6]. Las infecciones corneales o queratitis se asocian comúnmente al uso de lentes de contacto, las enfermedades de superficie ocular que causan defectos epiteliales, trauma y cirugía ocular previa [2-4].

1.2.2. Fisiopatología

Las bacterias generan infección al adherirse a las células del epitelio córneoal mediante adhesinas que reconocen carbohidratos y proteínas específicas de la superficie. La adherencia de *P. aeruginosa* y *S. aureus* es significativamente mayor al epitelio corneal dañado, en comparación con otras bacterias, lo que explica su aislamiento frecuente en casos de queratitis [6]. Posterior a la adhesión se genera un proceso de invasión microbiana, facilitada por proteasas y exotoxinas que llevan a degradación del colágeno, necrosis estromal y en estadios más avanzados melting corneal, así mismo hay activación de metaloproteinasas y de la respuesta inmune que genera más daño por la liberación de especies reactivas de oxígeno. Durante la multiplicación y colonización bacteriana se liberan constitutivamente exotoxinas y proteasas bacterianas de forma prolongada, que causan destrucción continua del estroma [6].

P. aeruginosa es capaz de secretar al menos 7 proteasas diferentes incluyendo elastasa A y B, elastasa modificada, proteasa alcalina, proteasa IV, proteasa pequeña de *P. aeruginosa* y exoproteasa grande, responsables de su gran facilidad para escindir el colágeno y evasión de la respuesta inmune [6,10]. *S. aureus* produce alfa-toxina, una citotoxina lítica formadora de poros en la membrana, causante de destrucción de los tejidos de la córnea [6,5]. El lipopolisacárido (LPS), presente en la membrana de los microorganismos gram negativos, media la adhesión a la córnea y lentes de contacto, la internalización bacteriana y la supervivencia dentro de las células epiteliales corneales [6,10,5],

1.2.3. Manifestaciones clínicas y Diagnóstico

Las características clínicas no son patognomónicas de ningún agente infeccioso [10-12], y la presentación clínica resulta de múltiples variables como: la virulencia del organismo u organismos infectantes, el método de inoculación, el tiempo transcurrido desde la inoculación, el estado previo de la córnea, los antimicrobianos y corticosteroides previos y/o actuales, y otros factores del huésped [61]. Los síntomas más frecuentes son el dolor que aumenta con el parpadeo, disminución de la agudeza visual, fotofobia, blefaroespasma y lagrimeo. En cuanto a los signos clínicos, es

frecuente encontrar secreción purulenta, hiperemia conjuntival, quemosis, reacción papilar, edema palpebral, reacción inflamatoria en la cámara anterior. En casos más avanzados hipopión, disminución del espesor corneal (Melting), descemetocele y perforación corneal . Pero sin duda alguna el signo mas distintivo de la queratitis es la presencia de una úlcera corneal, con erosión epitelial e infiltrados estromales subyacentes [61].

El Gold estándar para el diagnóstico en queratitis bacteriana son el cultivo y las tinciones, el gram y Giemsa son las más utilizadas [12]. La microscopía confocal in vivo puede ser un complemento clínico útil, pero depende en gran medida del observador y a menudo carece de resolución suficiente para obtener buenos resultados diagnósticos. Se han desarrollado nuevos métodos moleculares para complementar los métodos tradicionales de diagnóstico, como PCR, sin embargo siguen siendo de difícil acceso [12].

1.2.4. Tratamiento

La queratitis microbiana puede causar daños irreversibles a la córnea, lo que lleva a pérdida de la visión. El deterioro puede ser rápido y generalmente es mucho más rápido que el tiempo necesario para obtener los resultados del cultivo, por lo que generalmente se inicia un tratamiento empírico que puede modificarse con la evolución clínica y los resultados de identificación y susceptibilidad antimicrobiana [12].

Los agentes antimicrobianos se pueden clasificar según la estructura química y mecanismo de acción propuesto. Los antibióticos tópicos en colirio son capaces de alcanzar niveles altos en los tejidos y son el método de tratamiento preferido en la mayoría de los casos, los antibióticos subconjuntivales pueden ser útiles cuando existe una diseminación o perforación escleral inminente o en los casos en que el cumplimiento del régimen de tratamiento es cuestionable. La terapia sistémica puede ser útil en casos de extensión de la infección escleral, intraocular o infección sistémica. [12,62].

Algunos de los regímenes recomendados, adaptados, según recomendaciones de la academia americana de oftalmología se resumen en la (Tabla 1.)

Tabla 1. Resumen adaptado de esquemas terapéuticos para tratamiento de la queratitis bacteriana.

Microorganismo	Antibiótico	Concentración Tópica	Dosis subconjuntival
No identificado/Múltiples	Tobramicina	9-14 mg/ml	20mg en 0.5 ml
	Fluoroquinolonas	Varios	
Cocos Gram Positivos	Cefazolina	50 mg/ml	100 mg en 0.5ml
	Vancomicina	10-50 mg/ml	25 mg en 0.5 ml
	Fluoroquinolonas	Varios	
Bacilos Gram Negativos	Tobramicina	9-14 mg/ml	20mg en 0.5 ml
	Ceftazidime	50mg/ml	100 mg en 0.5ml
	Quinolonas	Varios	

Es una preocupación a nivel mundial el aumento de la resistencia bacteriana [10-14]., inclusive en nuestro país se han reportado tasas de resistencia a quinolonas de tercera y cuarta generación [16]. Un estudio de más de 3200 aislamientos oculares recolectados entre 2009 y 2013 encontró resistencia a la meticilina en el 42% de los aislamientos de *Stafilococos*, con una alta resistencia concurrente a las fluoroquinolonas [62].; En el sur de la India, ha habido un fuerte aumento en la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a la moxifloxacina, del 19% en 2007 al 52% en 2009 [62,10]. Por lo tanto se están buscando alternativas de tratamiento para sobrellevar esta problemática.

1.2.5. PACK-CXL

La reticulación corneal o crosslinking (CXL) es una técnica que se desarrolló inicialmente para detener la progresión del queratocono. La técnica emplea gotas de riboflavina de forma tópica y una luz ultravioleta A (UVA) de 365 nm, en el que se liberan radicales libres creando nuevos enlaces en las fibras de colágeno, aumentando la fuerza biomecánica de la córnea [20,34]. El CXL también demostró ser capaz de destruir células y organismos vivos, incluidos queratocitos y patógenos. Así surgió un concepto nuevo e innovador de tratamiento para la queratitis infecciosa el PACK-CXL, término acuñado en el noveno congreso de CXL en Dublín [20,34]. La combinación de

radiación ultravioleta y el efecto de reticulación puede proteger la córnea contra la degradación enzimática, evitando una mayor destrucción de los tejidos [32-35]. Sin embargo, los estudios in vitro e in vivo han demostrado resultados mixtos [36,28,33] y se necesitan urgentemente más estudios para determinar completamente el perfil terapéutico de PACK-CXL.

1.2.6. Terapias Novedosas

Recientemente, se han publicado estudios proponiendo el uso de rosa de Bengala como fotosensibilizador para realizar terapia fotodinámica en casos de queratitis severas [63-65]. Sin embargo, existen algunas limitaciones con respecto a los aspectos prácticos, ya que se requiere un sistema de luz UVA que no está disponible a nivel global.

1.3. Genipin (GEN)

El Genipin es una molécula derivada de la planta *gardenia jazminoides* y del árbol *American Genipa* [64]. Genipin ha surgido como un nuevo agente de reticulación natural con excelente biocompatibilidad y baja toxicidad [47,48,49]. Se han aislado y caracterizado varios componentes químicos de *G. jasminoides*, incluidos iridoideos, glucosidos iridoideos, triterpenoides, ácidos orgánicos y compuestos volátiles [64]. Estudios en la esclera también han confirmado su efecto como entrecruzador y una biocompatibilidad satisfactoria en ratas [66], moscas de árbol [67], cerdos [68, 69] y conejos [70], planteando el entrecruzamiento con genipin para el tratamiento del glaucoma y la miopía. Además, GEN exhibe varias propiedades farmacológicas que incluyen actividad antiinflamatoria [50-54], antioxidante [56-57,71], anti angiogénica [72] y anti metastásica [73,74]. También se han descrito propiedades antimicrobianas: GEN limitó el crecimiento bacteriano de *E. coli* y *L. monocytogenes* en carnes frescas de cerdo [58].

1.4. Modelo Experimental de Infección Corneal.

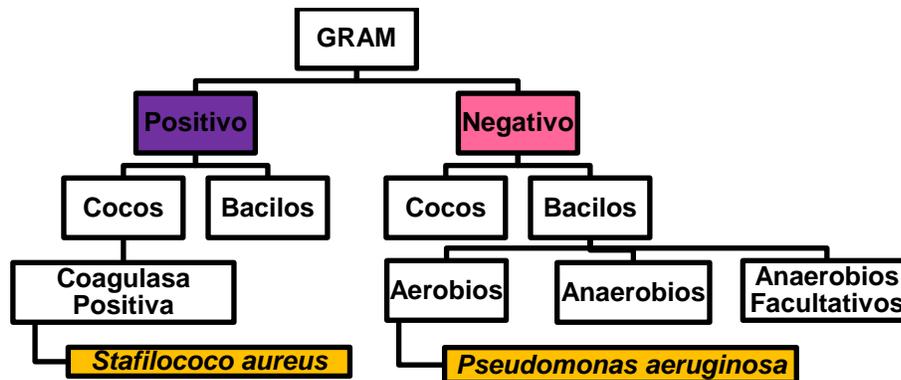
Las córneas de conejo y cerdo se han utilizado en la investigación científica debido a su similitud estructural con la córnea humana [75]. El modelo que se creó en este trabajo se basó en el modelo de infección corneal descrito por *Pinnock* y colegas [76].

1.5. Conceptos y Métodos Bacteriológicos.

1.5.1. Tinción de Gram

Una de las técnicas de tinción más importantes en bacteriología. Se utiliza para poder realizar una primera aproximación en la diferenciación bacteriana. Se nombran los microorganismos según su forma redonda (Cocos) o en forma de bastón (Bacilos). El principio básico de la tinción de Gram implica la capacidad de la pared celular bacteriana para retener el colorante violeta cristal durante el tratamiento con solvente. Los microorganismos grampositivos tienen mayor contenido de peptidoglicano, mientras que los gramnegativos tienen mayor contenido de lípidos. Los grampositivos serán los que se tiñen de marrón púrpura y gramnegativos los que se visualizan rosa-rojos al microscopio [77].

Figura 1. Aproximación a la clasificación de Microorganismos con tinción de Gram.



1.5.2. Método de Micro dilución en placa

Una de las técnicas más utilizadas para determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI) de agentes antimicrobianos y sustancias con actividad bactericida, bacteriostática.[78]. El objetivo de los métodos de microdilución en placa y agar es determinar la concentración más baja del agente antimicrobiano que, en condiciones de definidas debe inhibir el crecimiento visible de la bacteria que se está investigando. Implica la realización de diluciones de diferentes concentraciones de la sustancia antimicrobiana en una placa de micro titulación de 96 pozos, luego, inoculación bacteriana en estas celdas y sembrado posterior en un medio de agar nutritivo. El crecimiento bacteriano se evalúa después de la incubación durante un período de tiempo definido (16-20 h) posterior al cual se pueden registrar los resultados [78].

1. Justificación

Las queratitis infecciosas catalogadas por la Organización Mundial de la Salud como la segunda causa de pérdida visual irreversible [3,12]. Representan un desafío terapéutico, llevan a inflamación y cicatrización con secuelas visuales nefastas [9]. Las guías de manejo para la queratitis bacteriana comprenden el uso de antibióticos, queratoplastia tectónica y recubrimiento conjuntival. Alternativas con malos resultados visuales y además a nivel mundial la disponibilidad de tejido corneal para trasplantar es escaso [17-19]. También, el aumento de la tasa de resistencia bacteriana es una preocupación mundial, por lo que se hace necesario desarrollar alternativas terapéuticas [17].

Se ha reportado el uso de agentes de entrecruzamiento de colágeno como Riboflavina y Rosa de Bengala como una opción de tratamiento, con la hipótesis de que una córnea con fibras de colágeno más fuertes es más resistente a la digestión de proteasas y colagenasas [20,21,63]. Pero desafortunadamente, en estos protocolos se requiere el uso de radiación UV y están contraindicados en corneas delgadas, condición muy frecuente en pacientes con queratitis [35-38].

El Genipin, una molécula de origen natural [84]., ha sido objeto de estudio en los últimos años por su efecto reticulador de las fibras de colágeno, Estudios de Ávila *et al*, demostraron la utilidad del tratamiento con Genipin en el manejo de ectasias corneales con la ventaja de no requerir radiación y su baja toxicidad [47-49].

Esta investigación busca determinar los efectos del tratamiento con Genipin a nivel macroscópico y microscópico, en un modelo de infección corneal ex-vivo. Los resultados de este estudio ayudarán a esclarecer el efecto terapéutico del genipin en el control de las infecciones bacterianas corneal, crucial en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas en las enfermedades corneales infecciosas.

2. Objetivos

3.1 Objetivo General:

Evaluar los efectos terapéuticos del Genipin en un modelo ex vivo de infección corneal.

3.2. Objetivos Específicos:

- Desarrollar un modelo de queratitis ex vivo reproducible.
- Cuantificar el efecto del entrecruzamiento corneal con genipin mediante análisis macroscópico y microscópico de las corneas.
- Hallar la concentración de genipin necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano.
- Comparar la Respuesta de las corneas del modelo de infección tratadas con genipin con respecto a los controles.

3. Consideraciones Éticas

El estudio involucra el uso de corneas porcinas en un modelo Ex Vivo, es decir no se utilizaron animales vivos. Las corneas se obtuvieron frescas directamente de los sitios de sacrificio de animales en Bogotá, las cuales son descartadas como desechos y subproductos de la producción y comercialización de porcinos, siguiendo los principios internacionales recomendados por “The Association for research in Vision and Ophthalmology” (ARVO): reemplazo, reducción y refinamiento, para realizar protocolos científicos de alta calidad.

Las bacterias que se utilizaron en este estudio corresponden al grupo II dentro de la clasificación de riesgo biológico y se manejaron de acuerdo con los protocolos establecidos dentro del laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

Se obtuvo aprobación por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Acta: 004-039-19).

Así mismo este protocolo fue aprobado por la UE (Unión Europea) dentro del marco de cooperación del proyecto 2020 CORLINK www.cordis.europa.eu/project/rcn/214454/es, mediante el cual se financió, dentro de los lineamientos del Acuerdo suscrito entre la Universidad de Cardiff y la Universidad Nacional de Colombia

4.1 Declaración de Conflicto de Interés

Se declara que no existen conflictos de interés por parte de los investigadores en el desarrollo de este estudio.

4. Metodología

4.1 Tipo y Diseño del Estudio

Estudio experimental en un modelo de infección corneal ex vivo.

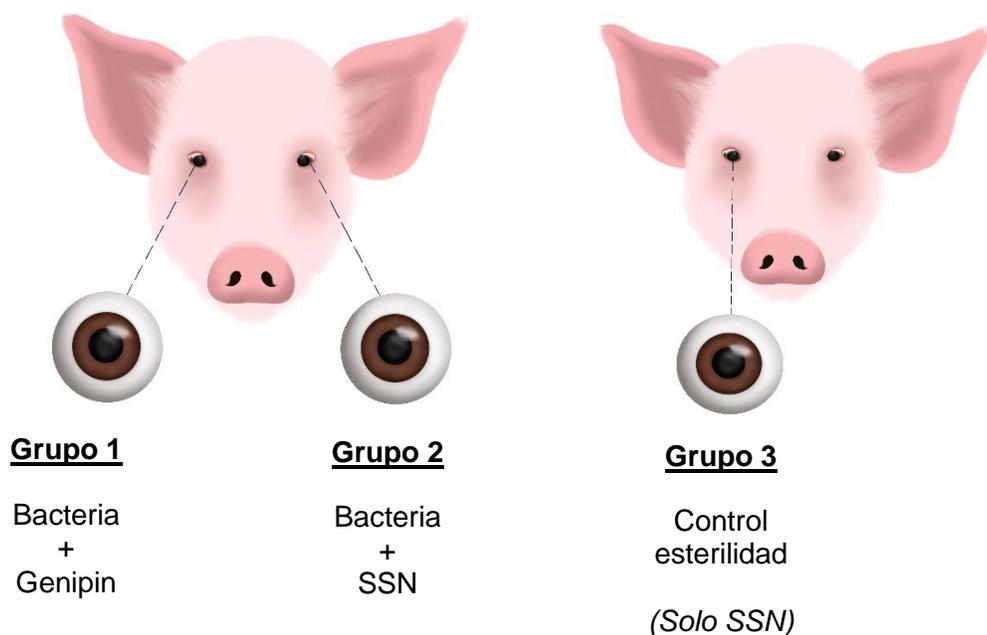
4.2 Grupos Experimentales

Se definieron 3 Grupos experimentales de forma aleatoria, de la siguiente forma:

1. Grupo de córneas infectadas tratadas con Genipin
2. Grupo de córneas infectadas a las que se les aplicó Solución Salina (SSN) como tratamiento
3. Grupo de control de esterilidad del proceso (De otra Cabeza de cerdo)

Los grupos de tratamiento (Genipin o solución Salina) debían pertenecer a la misma cabeza del Cerdo (Figura 2), y se utilizó un n=6.

Figura 2. Esquema ilustrativo de los grupos experimentales.



5. Procedimientos

5.1.1 Cultivo de Bacterias

Se utilizaron cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) y *P. aeruginosa* (ATCC 27853) de la American Type Culture Collection (Labcare de Colombia Ltda, Cota, Colombia), se cultivaron en agar infusión cerebro-corazón (BHI) (Suministros Clínicos ISLA S.A.S, Bogotá, Colombia) a 37 °C por 12 horas y posteriormente se mantuvieron a 4°C. El día anterior al procedimiento experimental se tomó una colonia del cultivo previo y nuevamente se realizó cultivo en agar BHI fresco con incubación a 37°C. El día de la infección corneal se preparó una suspensión Bacteriana con un valor de 0.5 en la escala de McFarland, correspondiente a una concentración de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias por ml (UFC / ml).

5.1.2 Test de Susceptibilidad al Genipin

Mediante el método de micro dilución en placa se determinó la susceptibilidad in vitro de *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Se preparó Genipin (Challenge Bioproducts Co., Taiwán) en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich) a una concentración de 25 mg / ml y tomando esta solución se realizaron diluciones seriadas con solución salina en una placa estéril con 96 pozos a las que se inoculó una suspensión bacteriana con una concentración de 1×10^5 UFC / ml y posteriormente estas diluciones se cultivaron en agar Mueller-Hinton (Químirel Químicos y Reactivos SAS, Bogotá, Colombia) a 37 ° C durante 24 horas, con el fin de hallar la concentración bactericida mínima del Genipin para cada una de las bacterias. Por otra parte, se realizaron controles de calidad del proceso, para lo cual se cultivaron diluciones de la Bacterias en los medios nutritivos, se verificó el crecimiento con el disolvente del Genipin (DMSO) a diferentes concentraciones, y además se probó la inhibición del crecimiento bacteriano con antibióticos comerciales: para *S. aureus* (vancomicina 5 µg / ml) y para *P. aeruginosa*, (tobramicina 3 mg/ml) (Tecnoquímicas S.A., Cali, Colombia). La concentración bactericida mínima hallada se utilizó para tratar las corneas infectadas en el modelo ex vivo

5.1.3 Disección y Desinfección de las córneas

Se obtuvieron pares de ojos enucleados, de la misma cabeza del cerdo, del frigorífico local (BLE, Ltda., Bogotá, Colombia), con un periodo de sacrificio menor a 2 horas. Manteniéndolos en parejas, estos se transportaron al laboratorio en una nevera portátil, se realizó lavado inicial con SSN estéril y disección de los músculos y conjuntiva, posteriormente se llevó a cabo un proceso de descontaminación mediante lavados seriados con yodopovidona al 5% (Tecoquimicas, Ltd, Cali, Colombia), solución salina estéril, ácido hipocloroso al 0.046% (Neutroderm, Aquilabs S.A., Bogotá, Colombia). Subsiguientemente se realizaron incisiones corneales con una hoja de bisturí estéril # 15 (3 cortes horizontales y 3 cortes verticales), según el protocolo descrito previamente por Pinnock, *et al* [76]. A continuación, se disecaron los botones corneales, los cuales se colocaron en platos estériles de 35mm y nuevamente se efectuó desinfección de estos utilizando el protocolo con Yodopovidona al 5%, SSN y ácido hipocloroso.

5.1.4 Infección corneal y tratamiento con Genipin

Los grupos experimentales se definieron según lo enunciado en el apartado 5.2. En la Figura 3. Se ilustra el protocolo experimental realizado. Los botones corneales se orientaron con en lado epitelial hacia arriba y se inyectó una alícuota de 100 μ l que contenía 1×10^5 UFC de *S. aureus* o *P. aeruginosa* a los grupos 1 y 2, que luego se incubaron a 37°C durante 30 minutos para permitir el asentamiento bacteriano. Luego de los 30 minutos el grupo 1 fue tratado con una solución de 100 μ l de Genipin según la concentración bactericida mínima hallada previamente para *S. aureus* y *P. aeruginosa*. El grupo 2 fue tratado con 100 μ l de SSN estéril. Posteriormente se adicionó medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; MERCK, Bogotá, Colombia) a las cajas de cultivo que contenían las corneas y estas se incubaron a 37°C durante 24 horas. A las corneas del grupo 3 se les inyectó solución salina, se adicionó DMEM al plato y se llevaron directamente a incubación a 37°C durante 24 horas. En este estudio se utilizaron seis pares de córneas para cada cepa bacteriana (excluyendo las córneas utilizadas para los controles de esterilidad).

Figura 3. Esquema ilustrativo del protocolo experimental



5.1.5 Análisis del crecimiento Bacteriano y análisis Histológico

Luego de 24 horas de incubación, se secciono cada córnea por la mitad con una hoja de bisturí estéril #20 y se utilizó una de estas partes para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) y la otra mitad para procesamiento histológico.

Las corneas usadas para recuento de UFC se homogenizaron y se realizaron diez diluciones seriadas en solución salina, posteriormente se tomaron 100 µl de cada dilución y se sembraron para cultivo en platos con agar BHI a 37 °C durante 24 horas. El recuento de las UFC se llevó a cabo 24 horas después y se diligenció una tabla de resultados.

Las córneas para procesamiento histológico se fijaron en formaldehído al 10% y consecutivamente se realizaron bloques de parafina, corte con microtomo y se prepararon laminas histológicas con tinciones de Gram y Hematoxilina Eosina (H-E) para cada muestra. El análisis y documentación fotográfica se hizo con un microscopio Olympus y una cámara fotográfica Canon EOS T4i Rebel®.

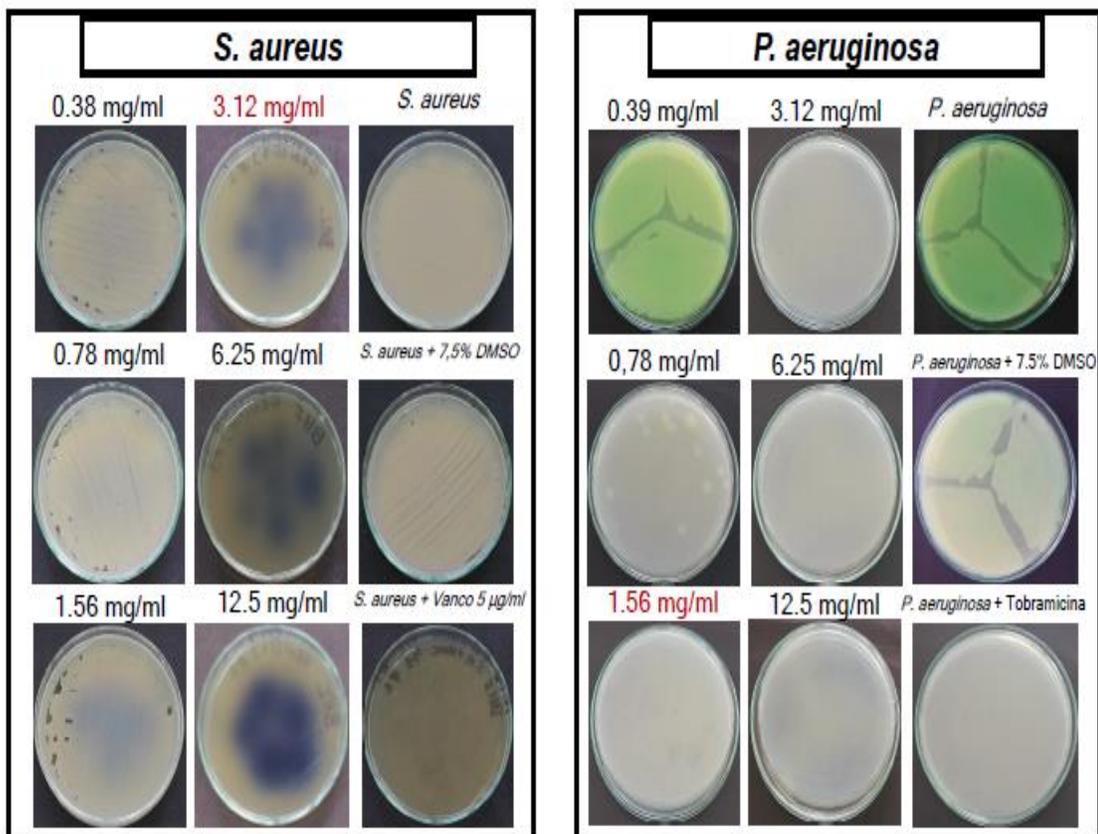
5.1.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de las UFC se analizaron mediante el software SigmaPlot Versión 12.0. Además, se realizó t de student pareada y una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Se tomo una $p \leq 0,05$ para hablar de significancia estadística.

6. Resultados

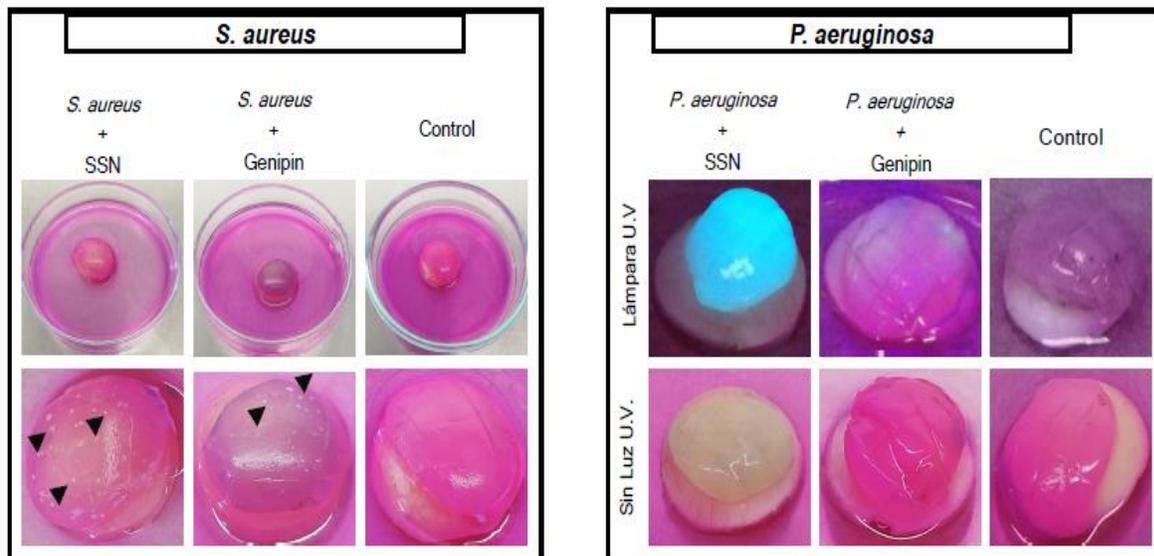
La prueba de susceptibilidad bacteriana al Genipin, demostró una actividad bactericida significativa contra las bacterias gram positivas y gram negativas que más frecuentemente causan queratitis a nivel mundial [1]. Se determinó la concentración mínima inhibitoria, es decir la concentración de genipin a la que no hay crecimiento del 99% de bacterias, siendo de 3,12 mg / ml para *S. aureus* y de 1,56 mg / ml para *P. aeruginosa* respectivamente. Así mismo se descartó un efecto bactericida del disolvente del Genipin (DMSO). (Figura 4).

Figura 4. Resultados de la prueba de susceptibilidad bacteriana.



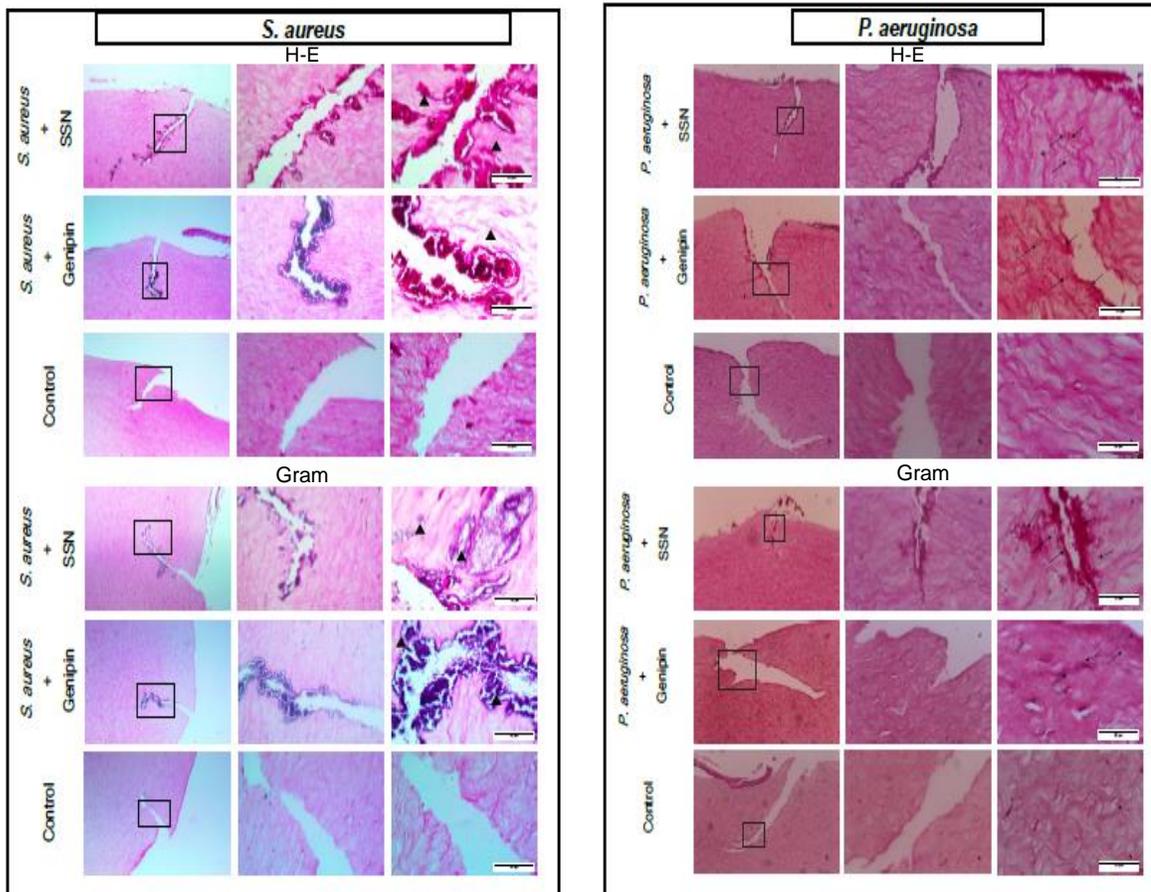
Se logro desarrollar un modelo de infección corneal reproducible, Se comprobó la infección corneal mediante varios métodos. En primer lugar en el análisis macroscópico las córneas infectadas por *S.aureus* presentaron ulceración y la formación de microcolonias fue evidente. En cuanto a las corneas a las que se inyectó *P. aeruginosa* presentaron haze y melting corneal severo más significativos en las corneas tratadas con SSN comparado con las corneas tratadas con genipin. Las corneas del grupo control, que no fueron inoculados se conservaron transparentes sin cambios en su morfología (Figura 5).

Figura 5. Análisis macroscópico de la infección corneal



En segundo lugar, para confirmar la infección bacteriana estromal, se llevó a cabo análisis histológico con tinciones de Gram y H&E, encontrando que hubo colonización exclusiva de *S. aureus* y de *P. aeruginosa* en sus grupos respectivos. Por otra parte, se confirmó la ausencia de crecimiento bacteriano en los grupos de control de esterilidad (Figura 6).

Figura 6. Análisis histológico de la infección corneal, tinciones de H-E Y Gram



En tercer lugar, se realizó un análisis cuantitativo del efecto del Genipin sobre el modelo de infección corneal mediante conteo de las UFC presentes en las diluciones de cada muestra, luego de 24 horas de incubación. (Figura 7). Los datos obtenidos demostraron que en los grupos tratados con Genipin presentaron un número de UFC por córnea significativamente menor tanto para *S. aureus* (promedio, $\log 9,67 \pm 1,33$ UFC / córnea, $n = 6$) en comparación con las corneas tratadas con SSN (promedio, $\log 6,42 \pm 0,59$ UFC / córnea, $n = 6$, $p = 0,026$; Tabla 2, Figura 8) y para *P. aeruginosa* promedió $\log 9,37 \pm 0,33$ UFC / córnea ($n = 6$) en comparación con el grupo tratado con vehículo, que promedió $\log 6,72 \pm 0,41$ UFC / córnea ($n = 6$, $p = 0,011$, Tabla 2, Figura 8).

Figura 7. Análisis cuantitativo de la infección corneal

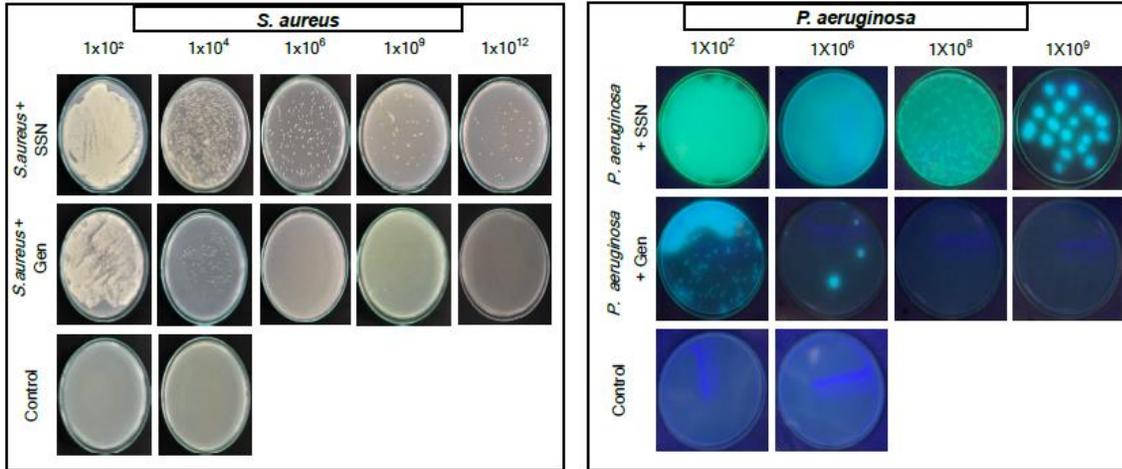
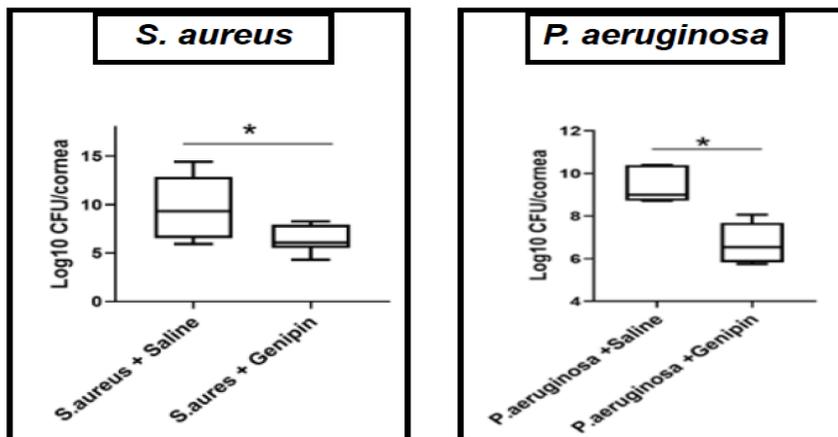


Tabla 2. Error promedio y estándar del log10 UFC de los grupos experimentales

Microorganismo	log ₁₀ CFU/cornea ± DE	
S. aureus	S. aureus + SSN	S. aureus + Genipin
	9.67 ± 1.33	6.42 ± 0.59*
P. aeruginosa	P. aeruginosa + SSN	P. aeruginosa + Genipin
	9.37 ± 0.33	6.72 ± 0.41*

*Estadísticamente significativo, $p < 0.05$

Figura 8. Gráficas del Análisis estadístico



7. Discusión

Las infecciones corneales son un desafío para los oftalmólogos de todo el mundo debido a la rápida progresión, las secuelas visuales nefastas, el aumento de la resistencia a los antibióticos y las pocas alternativas terapéuticas en los casos avanzados.

La iniciativa mundial "Visión 2020", la Organización Mundial de la Salud hace hincapié en la necesidad de enfoques terapéuticos novedosos e innovadores, para el tratamiento de la queratitis infecciosa corneal [79]. La reticulación corneal podría tener un papel importante en la fisiopatología de la queratitis infecciosa al proporcionar una barrera física contra la acción de las enzimas que generan destrucción tisular. Sin embargo, los protocolos tradicionales de reticulación con U.V. la luz y la riboflavina requieren la eliminación del epitelio y están contraindicadas en córneas delgadas. Y la fusión y el adelgazamiento de la córnea son condiciones frecuentes en las úlceras infecciosas, así que en los últimos años se ha investigado la aplicación de moléculas naturales como agentes de entrecruzamiento [80-82]. Genipin ha sido de especial interés en oftalmología debido a sus propiedades de reticulación [44-49], antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas [51-57].

Los datos obtenidos en este estudio confirman que Genipin tiene un efecto bactericida contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*, y se encontró que la concentración bactericida mínima de Genipin para gram negativos fue menor, lo cual es de gran relevancia ya que las queratitis bacterianas por gram negativos son más severas, progresan más rápidamente y son intrínsecamente más resistentes a los antibióticos. La acción bactericida de cualquier régimen de tratamiento es de suma importancia clínica ya que, al contrarrestarse el crecimiento bacteriano, se lograría una resolución temprana de la enfermedad, mejores resultados clínicos y menor resistencia bacteriana [83].

El mecanismo de acción exacto del Genipin todavía no se ha dilucidado, sin embargo, es probable que su actividad antimicrobiana sea multifactorial: En primer lugar podría atribuirse a las propiedades de reticulación [40, 84, 85] no solo del colágeno, sino además de la reticulación de proteínas de la membrana celular de los patógenos, como el peptidoglicano, el ácido lipoteicoico y el lipopolisacárido (LPS) [86-88], interfiriendo con procesos de división, crecimiento celular, alteración de la permeabilidad de la membrana

celular, limitando la replicación bacteriana [86-88]. En segundo lugar, Genipin podría interferir en los procesos de invasión y colonización bacteriana al restringir la adhesión bacteriana. En tercer lugar, se ha evidenciado que las corneas tratadas con genipin son más resistentes a la digestión enzimática [46-49] proceso sin ecuánime en la infección corneal, y, por último, Genipin ha demostrado tener propiedades antiinflamatorias, según lo reportado por Chang et al. (2017), quienes demostraron que genipin inhibe la secreción de citocinas proinflamatorias IFN- γ e IL-8, así como el estrés oxidativo inducido por LPS en la infección por *Helicobacter pylori* [89], un mecanismo importante en la fisiopatología de la infección por gram negativos que al estimular la respuesta inflamatoria, provocan un daño citotóxico en la córnea.

En cuanto a la seguridad del Genipin, se han informado efectos citotóxicos mínimos no solo en el endotelio corneal, sino también en los nervios corneales y queratocitos [44-46]. En este protocolo se desarrolló un modelo de infección corneal exitoso, el cual sin duda será de gran ayuda en el estudio de la queratitis infecciosa. Sin embargo, hacen falta estudios adicionales para indagar los efectos del Genipin en la respuesta inflamatoria in vivo, y que evalúen la relación dosis/efecto y la seguridad a largo plazo.

8. Conclusiones

- Se evaluó el potencial antimicrobiano de Genipin en un modelo ex vivo reproducible.
- Genipin tiene actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*
- El entrecruzamiento corneal con Genipin constituye un enfoque terapéutico novedoso e innovador para el tratamiento y manejo de la queratitis bacteriana.
- Se requieren más estudios para dilucidar los mecanismos de acción del Genipin sobre la muerte bacteriana en modelos de infección corneal.
- Los resultados de este estudio son prometedores en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, necesarios a nivel mundial por el incremento de la resistencia bacteriana.

8.1 Recomendaciones

Se requiere ampliar los resultados de este estudio en modelos in vivo para evaluar la acción del genipin en la respuesta inflamatoria corneal ante la infección, de hecho en el momento se cuenta con aval del comité de ética para desarrollar este protocolo, por parte de los autores de este trabajo.

Bibliografía

1. Marquart, M. E., & O'Callaghan, R. J. Infectious keratitis: secreted bacterial proteins that mediate corneal damage. *J. Ophthalmol.* **2013**, 369094 (2013).
2. Ezisi, C. N., et al. Microbial Keratitis—A Review of Epidemiology, Pathogenesis, Ocular Manifestations, and Management. *Nig. J. Ophthalmol.* **26**, 13-23 (2018).
3. Whitcher, J.P., Srinivasan. M. & Upadhyay, M.P. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ.* **79**, 214-221 (2001).
4. Green M, Apel A & Stapleton F. Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. *Cornea.* **27**, 22-27 (2008).
5. Bartimote, C., Foster, J. & Watson, S. The spectrum of microbial keratitis: An updated review. *Open Ophthalmol. J.* **13**, 100-130 (2019).
6. Lakhundi, S., Siddiqui, R. & Khan, N. A. Pathogenesis of microbial keratitis. *Microbial Pathogenesis* **104**, 97–109 (2017).
7. Sagerfors, S., Ejdervik-Lindblad, B., & Söderquist, B. Infectious keratitis: isolated microbes and their antibiotic susceptibility pattern during 2004-2014 in Region Örebro County, Sweden. *Acta ophthalmol.* **98**, 255–260 (2020).
8. Khor, W. B. *et al.* The Asia Cornea Society Infectious Keratitis Study: A Prospective Multicenter Study of Infectious Keratitis in Asia. *Am. J. Ophthalmol.* **195**, 161–170 (2018).
9. Wynants, S., Koppen, C. & Tassignon, M.J. Spontaneous corneal perforation and endophthalmitis in *Pseudomonas aeruginosa* infection in a ventilated patient: a case report. *Bull. Soc. belge Ophtalmol.* **276**, 53-56, (2000).
10. Al-Mujaini, A., Al-Kharusi, N., Thakral, A., & Wali, U. K. Bacterial keratitis: perspective on epidemiology, clinico-pathogenesis, diagnosis and treatment. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* **9**, 184–195 (2009).
11. Gupta, N., Tandon, R., Gupta, S.K, Sreenivas, V. & Vashist P. Burden of corneal blindness in India. *Indian J Community Med.* **38**,198-206 (2013).
12. Ung, L., Bispo, P.J.M., Shanbhag, S.S., Gilmore, M.S. & Chodosh, J. The persistent dilemma of microbial keratitis: Global burden, diagnosis, and antimicrobial resistance. *Surv Ophthalmol.* **64**, 255-271 (2019).
13. Lalitha, P., et al. Trends in antibiotic resistance in bacterial keratitis isolates from South India. *Br J Ophthalmol.* **101**, 108-113 (2017).
14. Alanis, A.J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res.* **36**, 697-705 (2005).

15. Cabrera-Aguas, M., Khoo, P., George, C. R. R., Lahra, M. M. & Watson, S. L. Antimicrobial resistance trends in bacterial keratitis over 5 years in Sydney, Australia. *Clin. Exp. Ophthalmol.* **48**, 183–191 (2020).
16. Galvis, V, Parra, M. M, Tello, A, Castellanos, Y. A, Camacho, P. A, Villarreal, D, Salcedo, S. L.L. Antibiotic resistance profile in eye infections in a reference centre in Floridablanca, Colombia. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmología.*,**8**, (2018)
17. Zhang, Q., et al. Outcomes of therapeutic keratoplasty for severe infectious keratitis in Chongqing, a 16-year experience. *Infect. Drug Resist.* **12**, 2487–2493 (2019).
18. Tew, T.B., et al. Therapeutic penetrating keratoplasty for microbial keratitis in Taiwan from 2001 to 2014. *J. Formos Med. Assoc.* **119**, 1061-1069 (2020).
19. Fasolo, A., et al. Risk factors for graft failure after penetrating keratoplasty: 5-year follow-up from the corneal transplant epidemiological study. *Cornea.* **30**, 1328-1335 (2011).
20. Tabibian, D., Richoz, O. & Hafezi, F. PACK-CXL: Corneal cross-linking for treatment of infectious keratitis. *J. Ophthalmic Vis Res.* **10**, 77–80 (2015).
21. Iseli, H.P., Thiel, M.A., Hafezi, F., Kampmeier, J. & Seiler, T. Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts. *Cornea.* **27**, 590-594 (2008).
22. Garg, P., Das, S. & Roy, A. Collagen Cross-linking for Microbial Keratitis. *Middle East African J. Ophthalmol.* **24**, 18-23 (2017).
23. Shetty, R., Nagaraja, H., Jayadev, C., Shivanna, Y. & Kugar, T. Collagen crosslinking in the management of advanced non-resolving microbial keratitis. *Br J Ophthalmol.* **98**, 1033-1035 (2014).
24. Panda, A., Krishna, S.N. & Kumar. S. Photo-activated riboflavin therapy of refractory corneal ulcers. *Cornea.* **31**, 1210-1213 (2012).
25. Zloto, O., et al. Does PACK-CXL change the prognosis of resistant infectious keratitis? *J. Refract. Surg.* **34**, 559-563 (2018).
26. Spoerl, E., Wollensak, G. & Seiler, T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr. Eye Res.* **29**, 35–40 (2004).
27. Martins, S. A. 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 Ophthalmol Vis Sci.* **49**, 3402–3408 (2008).
28. Makdoui, K., Bäckman, A., Mortensen, J. & Crafoord, S. Evaluation of antibacterial efficacy of photo-activated riboflavin using ultraviolet light (UVA). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* **248**, 207-212 (2010).
29. Kumar, V., et al. Riboflavin and UV-Light Based Pathogen Reduction: Extent and Consequence of DNA Damage at the Molecular Level. *Photochem Photobiol.* **80**, 15-21 (2004).
30. Ting, D.S.J., Henein, C., Said, D. G. & Dua, H. S. The Ocular Surface Photoactivated chromophore for infectious keratitis – Corneal cross-linking (PACK-CXL): A systematic review and meta-analysis. *Ocul. Surf.* **17**, 624–634 (2019).

31. Papaioannou L, Miligkos M, Papathanassiou M. Corneal Collagen Cross-Linking for Infectious Keratitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cornea*. **35**, 62-71 (2016).
32. Davis, S.A., Bovelle, R., Han, G. & Kwagyan, J. Corneal collagen cross-linking for bacterial infectious keratitis. *Cochrane Database Syst Rev*. **6**, CD013001 (2020).
33. Makdoui, K., Mortensen, J. & Crafoord, S. Infectious keratitis treated with corneal crosslinking. *Cornea*. **29**, 1353-1358 (2010).
34. Tabibian, D., Mazzotta, C. & Hafezi, F. PACK-CXL: Corneal cross-linking in infectious keratitis. *Eye and Vis*. **3**, 11 (2016).
35. Gokhale, N.S. Corneal endothelial damage after collagen cross-linking treatment. *Cornea*. **30**, 1495–1498 (2011).
36. Raiskup, F.M.D.P.F., Hoyer, A.M.D. & Spoerl, E.P. Permanent corneal haze after riboflavin-UVA-induced cross-linking in keratoconus. *J Refract Surg*. **25**, S824–S828 (2009).
37. Wollensak, G., Spoerl, E., Wilsch, M. & Seiler T. Endothelial cell damage after riboflavin–ultraviolet-A treatment in the rabbit. *J Cataract Refract Surg*. **29**, 1786–1790 (2003).
38. Moore, J.E., Schirotli, D. & Moore, C.B. Potential Effects of Corneal Cross-Linking upon the Limbus. *Biomed Res Intern*. **2016**:5062064 (2016).
39. Seiler, T. & Hafezi, F. Corneal cross-linking-induced stromal demarcation line. *Cornea*. **25**, 1057-1059 (2006).
40. Sung, H. W., Chang, W. H., Ma, C. Y. & Lee, M. H. Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide. *J Biomed Mater Res A*. **64**, 427–438 (2003).
41. Daniel, M., K., N. K. & Myron, S. Injectable Collagen–Genipin Gel for the Treatment of Spinal Cord Injury: *In Vitro* Studies. *Adv Funct Mater*. **21**, 4788–4797 (2011).
42. Yan, L. P. *et al.* Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*. **95**, 465–475 (2010).
43. Výborný, K., *et al.* Genipin and EDC crosslinking of extracellular matrix hydrogel derived from human umbilical cord for neural tissue repair. *Sci Rep*. **9**, 10674 (2019).
44. Song, W. *et al.* The comparative safety of genipin versus UVA-riboflavin crosslinking of rabbit corneas. *Mol Vis*. **23**, 504–513 (2017).
45. Song, W., *et al.* The Short-Term Safety Evaluation of Corneal Crosslinking Agent Genipin. *Ophthalmic Res*, **62**, 141–149 (2019).
46. Tang, Y. *et al.* A study of corneal structure and biomechanical properties after collagen crosslinking with genipin in rabbit corneas. *Mol Vis*. **25**, 574–582 (2019).
47. Avila, M. Y., Narvaez, M. & Castañeda, J. P. Effects of genipin corneal crosslinking in rabbit corneas. *J Cataract Refract Surg*. **42**, 1073–1077 (2016).
48. Avila, M. Y. & Navia, J. L. Effect of genipin collagen crosslinking on porcine corneas. *J Cataract Refract Surg* **36**, 659-664 (2010).

-
49. Avila, M. Y., Gerena, V. A., & Navia, J. L. Corneal crosslinking with genipin, comparison with UV-riboflavin in ex-vivo model. *Mol Vis.* **18**, 1068–1073 (2012).
50. Wang, Y., et al. Genipin crosslinking reduced the immunogenicity of xenogeneic decellularized porcine whole-liver matrices through regulation of immune cell proliferation and polarization. *Sci Rep.* **6**, 24779 (2016).
51. Wang, J., et al. Genipin Inhibits LPS-Induced Inflammatory Response in BV2 Microglial Cells. *Neurochem Res.* **42**, 2769-2776 (2017).
52. Nam, K.N., et al. Genipin inhibits the inflammatory response of rat brain microglial cells. *Int Immunopharmacol.* **10**, 493-499 (2010).
53. Li, Z., et al. Genipin attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis via suppressing inflammatory and oxidative responses. *Inflammopharmacology.* **28**, 333-339 (2020).
54. Koo, H.J., et al. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. *Eur J Pharmacol.* 495, 201-208 (2004).
55. Yu, S., et al. Genipin inhibits NLRP3 and NLRC4 inflammasome activation via autophagy suppression. *Sci Rep* **5**, 17935 (2016).
56. Liu, J., Yin, F., Zheng, X., Jing, J. & Hu, Y. Geniposide, a novel agonist for GLP-1 receptor, prevents PC12 cells from oxidative damage via MAP kinase pathway. *Neurochem. Int.* **51**,361-369 (2007).
57. Zhao, H., Wang, R., Ye, M., & Zhang, L. Genipin protects against H₂O₂-induced oxidative damage in retinal pigment epithelial cells by promoting Nrf2 signaling. *Int J Mol Med.* **43**, 936-944 (2019).
58. Khan, A., et al. Genipin cross-linked antimicrobial nanocomposite films and gamma irradiation to prevent the surface growth of bacteria in fresh meats. *Inno Food Sci Emerg.* **35**, 96-102 (2016).
59. Espana, E.M., Birk, D.E., Composition, structure and function of the corneal stroma, *Experimental Eye Research* (2020).
60. Yam, G.H.F., Riau, A.K., Funderburgh, M.L., Mehta, J.S., Jhanji, V., Keratocyte biology, *Experimental Eye Research* (2020).
61. Trattler WB, Majmudar PA, Luchs JI, Swartz TS, eds. *Cornea Handbook* (pp. 13-22), SLACK (2010).
62. Lin, Amy, Rhee, Michelle K, Akpek, Esen K, Amescua, Guillermo, Farid, Marjan, Garcia-Ferrer, Francisco J, Varu, Divya M, Musch, David C, Dunn, Steven P, Mah, Francis S. Bacterial Keratitis Preferred Practice Pattern®. *Ophthalmology*, 1-55 (2019)
63. Amescua, G., Arboleda, A., Nikpoor, N., Durkee, H., Relhan, N., Aguilar, M.C., Flynn, H.W., Miller, D., Parel, J.M. Rose Bengal Photodynamic Antimicrobial Therapy: A Novel Treatment for Resistant Fusarium Keratitis. *Cornea.* **36**, 1141-1144 (2017)
64. Naranjo, A., Arboleda, A., Martinez, J.D., Durkee, H., Aguilar, M.C., Relhan, N., Nikpoor, N., Galor, A., Dubovy, S.R., Leblanc, R., Flynn, H.W. Jr, Miller, D., Parel, J.M., Amescua, G. Rose Bengal Photodynamic Antimicrobial Therapy for Patients With Progressive Infectious Keratitis: A Pilot Clinical Study. *Am J Ophthalmol.* **208**, 387-396 (2019)

65. Cherfan, D., Verter, E.E., Melki, S., Gisel, T.E., Doyle, F.J. Jr, Scarcelli, G., Yun, S.H., Redmond, R.W., Kochevar, I.E. Collagen cross-linking using rose bengal and green light to increase corneal stiffness. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **13**, 54, 3426-33 (2013)
66. Hannon, B.G., et al. Sustained scleral stiffening in rats after a single genipin treatment. *J R Soc Interface.* **16**, 20190427 (2019).
67. Levy, A. M., Fazio, M. A., & Grytz, R. Experimental myopia increases and scleral crosslinking using genipin inhibits cyclic softening in the tree shrew sclera. *Ophthalmic Physiol Opt.* **38**, 246–256 (2018).
68. Wong, F.F., Lari, D.R., Schultz, D.S. & Stewart, J.M. Whole globe inflation testing of exogenously crosslinked sclera using genipin and methylglyoxal. *Exp Eye Res.* **103**, 17-21 (2012).
69. Liu, T. X., Luo, X., Gu, Y. W., Yang, B., & Wang, Z. Correlation of discoloration and biomechanical properties in porcine sclera induced by genipin. *Int. J. Ophthalmol.*, **7**, 621–62 (2014).
70. Liu, T. X., & Wang, Z. Biomechanics of sclera crosslinked using genipin in rabbit. *Int. J. Ophthalmol* **10**, 355–360 (2017).
71. Li, Z., et al. Genipin attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis via suppressing inflammatory and oxidative responses. *Inflammopharmacology.* **28**, 333-339 (2020).
72. Del Gaudio C, Baiguera S, Boieri M, et al. Induction of angiogenesis using VEGF releasing genipin-crosslinked electrospun gelatin mats. *Biomaterials.* **34**, 7754-7765 (2013).
73. Hong, M., Lee, S., Clayton, J., Yake, W., & Li, J. Genipin suppression of growth and metastasis in hepatocellular carcinoma through blocking activation of STAT-3. *J Exp Clin Cancer Res.* **39**, 146 (2020).
74. Wang, N., et al. Up-regulation of TIMP-1 by genipin inhibits MMP-2 activities and suppresses the metastatic potential of human hepatocellular carcinoma. *PloS one*, **7**, e46318 (2020).
75. Sandeepani K Subasinghe, Kelechi C Ogbuehi, Logan Mitchell, George J Dias, Animal model with structural similarity to human corneal collagen fibrillar arrangement. *Anatomical Science International* volume 286-293 (2021)
76. Pinnock, A., et al. Ex vivo rabbit and human corneas as models for bacterial and fungal keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* **255**, 333–342 (2017).
77. Tripathi N, Sapra A. Gram Staining. [Updated 2020 Aug 28]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>.
78. Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* **3**, 163–175 (2008).

-
79. Ackland, P. The accomplishments of the global initiative VISION 2020: The Right to Sight and the focus for the next 8 years of the campaign. *Indian J Ophthalmol.* **60**, 380-386 (2012).
80. 89. Veeresham, C. Natural products derived from plants as a source of drugs. *J Adv Pharm Technol Res.* **3**, 200–201 (2012).
81. Yu, H., et al. Antimicrobial activity and mechanism of action of *Dracocephalum moldavica* L. extracts against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol.* **10**, 1249 (2019).
82. Radji, M., Agustama, R. A., Elya, B., & Tjampakasari, C. R. Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pac J Trop Biomed.* **3**, 663–666 (2013).
83. Finberg, R.W., et al. The importance of bactericidal drugs: future directions in infectious disease. *Clin Infect Dis.* **39**, 1314-1320 (2004).
84. Manickam, B., Sreedharan, R. & Elumalai, M. 'Genipin' - the natural water soluble cross-linking agent and its importance in the modified drug delivery systems: an overview. *Curr Drug Deliv.* **11**, 139-145 (2014).
85. Yoo, J. S., Kim, Y. J., Kim, S. H., & Choi, S. H. Study on genipin: a new alternative natural crosslinking agent for fixing heterograft tissue. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg.* **44**, 197-207 (2011).
86. Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2**, a000414 (2010).
87. Malanovic, N., & Lohner, K. Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Pharmaceuticals.* **9**, 59 (2016).
88. Malanovic, N. & Lohner K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* **1858**, 936-946 (2016).
89. Chang, C.H, et al. The Suppressive Effects of Geniposide and Genipin on *Helicobacter pylori* Infections In Vitro and In Vivo. *J Food Sci.* **82**, 3021-3028 (2017).