



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación del efecto del tratamiento ocular con Genipín in vivo, en conejos

Mauricio Esteban Narváz Peñafiel

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Cirugía, Unidad de Oftalmología
Bogotá, Colombia
2012

Evaluación del efecto del tratamiento ocular con Genipín in vivo, en conejos

Mauricio Esteban Narváez Peñafiel

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Especialista en Oftalmología

Director:

Doctor Marcel Yecid Ávila Castañeda

Línea de Investigación:

Tratamiento del grupo de patologías que comprenden las ectasias corneales

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Ciencias Básicas y Clínicas en Oftalmología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Cirugía, Unidad de Oftalmología

Bogotá, Colombia

2012

A Dios

*Al creador y director, todo sucede solo porque
él lo permite.*

Resumen

Objetivo: Evaluar los efectos del entrecruzamiento del colágeno con genipín en ojos de conejo in vivo en términos de seguridad y toxicidad

Métodos: Se aplicó genipín tópico al 0,25% a ojos de 20 conejos hembras raza nueva Zelanda, un ojo tratado el otro como control, divididos en dos grupos, en el primero, conejos adultos la aplicación fue tópica sobre la córnea, en el segundo, conejos en etapa de crecimiento, la aplicación fue subtenoniana. Se realizaron medidas de diferentes variables tales como queratometría, tonometría, paquimetría, longitud axial y evaluación macroscópica con lámpara de hendidura pretratamiento y una semana, cuatro semanas y doce semanas postratamiento

Resultados: El tratamiento con genipín muestra un perfil de seguridad alentador, no se encontraron efectos adversos de importancia, además no hubo alteración significativa de la tonometría ni la longitud axial, y se evidencio un aplanamiento de las curvaturas corneales en el grupo 1.

Conclusiones: El genipín al 0,25% es un medicamento que no produce reacciones toxicas de importancia en el globo ocular, seguro para aplicación tópica y subconjuntival y es un agente entrecruzador promisorio en el tratamiento de las ectasias corneales

Palabras clave: Córnea, Ectasias corneales, entrecruzamiento corneal, toxicidad corneal, genipín, queratocono

Abstract

Purpose : To evaluate the effects of genipín collagen crosslinking in rabbit eyes, in vivo, in terms of safety and toxicity

Methods : Topic Genipin 0,25%, was applied to eyes of 20 rabbits, New Zealand albino, one eye treated, fellow eye as control, in two groups, first in adult rabbits, topic on cornea, second in baby rabbits, in subconjunctival space. Keratometric, pachymetric, tonometric and axial length measures were taken, pre and post treatment in the first, fourth and twelfth weeks.

All procedures were done according to the ARVO statement for use of animals in research.

Results : The genipín treatment shows a very good security profile, no important adverse reaction was developed, no significant variability were found on tonometry or axial length, and flattening of corneal curvatures was found in group 1.

Conclusions : Genipin 0,25% is a compound that is safe to use topic or subconjunctival in the eye, and is a promissory crosslinking agent in the treatment of corneal ectasias

Keywords: Cornea, corneal ectasias, corneal crosslinking, corneal toxicity, genipin, keratoconus

Contenido

	Pág.
Resumen y Abstract.....	V
1. Justificacion	1
2. Objetivos.....	3
3. Marco teorico.....	5
4. Materiales y metodos	11
5. Resultados.....	17
6. Conclusiones.....	29
Bibliografía	31

1. Justificación

Las ectasias corneales, son un grupo de patologías degenerativas en donde la córnea desarrolla una deformidad progresiva, la forma y transparencia corneales son vitales para tener un adecuado funcionamiento óptico del sistema visual, por lo tanto, las ectasias corneales conllevan a un deterioro progresivo y una alteración significativa de la calidad visual del paciente. [14,17,18,22]

Dentro del grupo de las ectasias corneales, la más frecuente es el queratocono, patología que se manifiesta a una edad temprana, por lo general en la adolescencia, afectando por igual a hombres y mujeres, su nombre se debe a que la deformidad que provoca en la córnea tiene forma de cono, la prevalencia e incidencia del queratocono son desconocidas en nuestro medio, pero se calcula que la incidencia es de 1 en 5000 habitantes, lo que la hace una enfermedad frecuente, que se ve diariamente en la práctica clínica, afectando la calidad de vida del paciente en forma significativa, ya que en un gran número de ellos, la visión no logra ser corregida ni con anteojos ni con lentes de contacto [3], que son las primeras medidas de tratamiento[14,17,18,22]

Actualmente el queratocono no tiene un tratamiento curativo, los esfuerzos terapéuticos se concentran en desarrollar procesos encaminados a detener o retrasar la progresión de la deformidad corneal, y cuando no es posible detenerla, finalmente se requiere de un trasplante de córnea.

Uno de los tratamientos más ampliamente utilizados para el queratocono en humanos actualmente es el cross linking corneal (entrecruzamiento corneal), que busca fortalecer las uniones intermoleculares del colágeno corneal, para aumentar la resistencia de la córnea a la deformidad, tratamiento que se lleva a cabo con aplicación tópica ocular de riboflavina al 0.1% sobre la córnea, continuando con la fotoactivación de esta sustancia con luz ultravioleta a una longitud de onda de 360 nm durante 30 minutos. [6,7,]

Este tratamiento logra endurecer la córnea y evita la progresión de la deformidad corneal en forma efectiva, sin embargo involucra el uso de luz ultravioleta durante un periodo de tiempo considerable, esta radiación de luz UV produce apoptosis de los queratocitos y de las células epiteliales de la córnea, y se ha demostrado que existe un riesgo considerable de toxicidad en las demás estructuras del ojo, especialmente cristalino y retina. [8,9,10,11]

Por lo tanto, debido a la naturaleza progresiva de los distintos tipos de degeneración corneana ectásica y al deterioro significativo de la función visual en pacientes jóvenes, la búsqueda de compuestos alternativos que impliquen menor toxicidad corneal y menor riesgo para las demás estructuras oculares, con efectividad similar o superior al entrecruzamiento corneal actual, es un paso lógico y necesario.

En trabajos recientes, el grupo de Investigación en Ciencias Básicas y Clínicas en Oftalmología, de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, demostró que el uso de una sustancia natural llamada Genipín, actúa como agente entrecruzador de colágeno efectivo, sobre corneas de cerdo de ojos enucleados, sustancia que podría ser utilizada como alternativa a la riboflavina fotoactivada con UV, en el tratamiento de las ectasias corneales [1], sin embargo es necesario evaluar el grado de seguridad que conlleva la aplicación de esta sustancia sobre ojos in vivo, lo cual es el objetivo principal de este trabajo.

Para ello se realizara la aplicación tópica de genipín, en ojos de conejos, especie escogida por su facilidad de manipulación y manutención, con un tamaño ocular que permite una adecuada evaluación macro y microscópica, y se realizaran mediciones de distintas variables de la fisiología ocular, que nos permitirán determinar el grado de seguridad y efectividad el tratamiento.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar el perfil de seguridad y toxicidad del compuesto Genipín a nivel ocular en modelos in Vivo, en conejos.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar el perfil de toxicidad del compuesto Genipín a nivel corneal en modelos in Vivo, en conejos, en términos de cambios microscópicos.

Evaluación del efecto de genipín a nivel corneal in vivo, en conejos, en términos de espesor, curvatura y transparencia corneales.

Evaluación del efecto del genipín a nivel de crecimiento ocular in vivo, en conejos, en términos de variabilidad en la longitud axial ocular.

Evaluación del efecto del genipín a nivel escleral in vivo, en conejos, en términos de cambios histológicos.

Evaluación del efecto del genipín en, in vivo, en conejos, a nivel de cambios en la presión intraocular.

3. Marco teórico

La cornea es la zona más anterior del ojo, a través de la cual entra la luz al globo ocular, está especializada en refractar la luz y transmitirla al cristalino y a los fotorreceptores de la retina. Tiene forma de cúpula, es el principal medio óptico refractivo del ojo y es esencial para la visión, de modo que cualquier alteración en su forma o transparencia se ven reflejados de manera directa en la función visual. La córnea está constituida por cinco capas: de superficial a profundo están distribuidas así; epitelial, capa de bowman, estroma, membrana de descemet y endotelio. La capa media, el estroma, constituye el 90% del grosor y normalmente tiene un espesor de 450 micras. Este estroma consiste en muchos tipos de colágeno pero principalmente en colágeno tipo I. Las fibras de colágeno están altamente organizadas y sus diámetros oscilan entre 27 y 35 nm, entre ellas existe un espacio interfibrilar que es necesario para la transparencia corneal.

La cornea se ve afectada por una serie de patologías que pueden afectar su forma y transparencia, y entre ellas nos interesan principalmente el grupo de las ectasias corneales.

3.1 Degeneraciones corneales ectásicas

Las degeneraciones corneales ectásicas son un grupo de enfermedades que afectan a individuos jóvenes y que por su carácter progresivo pueden deteriorar enormemente la función visual y la calidad de vida de los pacientes. Dentro de estas patologías encontramos el queratocono, la degeneración marginal pelúcida y el queratoglobos. También podemos describir las ectasias que se presentan luego de cirugía refractiva. [2]

De todas, el queratocono es la más frecuente, afecta principalmente individuos entre la pubertad y los 30 años de edad. Su prevalencia se ha descrito entre 4 a 600 casos por 100.000 habitantes en la literatura mundial, en nuestro medio es desconocida, afectando a personas de todas las razas y ambos sexos por igual. El queratocono tiende a desarrollarse en córneas con fuerza tensil disminuida. [14,,22]

La degeneración marginal pelúcida es una variante del queratocono que compromete la periferia de la córnea (generalmente en los dos cuadrantes inferiores), se presenta con espesor corneal central normal. Compromete personas entre 20 a 40 años y a ambos géneros por igual. Este tipo de degeneración se ha asociado a ruptura espontánea de la córnea por adelgazamiento del estroma. En estos pacientes la realización de queratoplastia es técnicamente más difícil y pueden ocurrir mayores complicaciones que en casos de pacientes con queratocono. [14,17,18,22]

El queratoglobo es un adelgazamiento global de la córnea que está presente desde el nacimiento y se asocia con la amaurosis congénita de Leber o síndrome de esclera azul. Se considera que la ectasia ocasionada por el queratoglobo no es progresiva y se han descrito casos de queratoglobo adquirido en individuos con orbitopatía distiroidea (18). En estos pacientes se contraindica el uso de lentes de contacto debido al alto riesgo de perforación. [3]

Este grupo de enfermedades se caracterizan por un adelgazamiento estromal progresivo no asociado a procesos inflamatorios. Debido al adelgazamiento gradual del estroma corneano, se producen deformidades de la curvatura de la córnea que se manifiestan como astigmatismos irregulares y defectos refractivos elevados que no corrigen adecuadamente con el uso de gafas ni lentes de contacto.

Para aquellos pacientes con degeneraciones ectásicas se han descrito complicaciones como opacidades corneanas, hydrops corneal (ruptura de la membrana de Descemet con la consiguiente sobrehidratación de la córnea), perforación (especialmente en queratoglobo), vascularización periférica, entre otras. Bajo estas condiciones, estos pacientes requieren frecuentemente trasplantes de córnea. [14,17,18,22]

3.2 Tratamientos Actuales

Las modalidades de tratamiento para este tipo de patologías varían según el grado de ectasia encontrado en cada caso. Los tratamientos incluyen el uso de corrección óptica; uso de gafas o lentes de contacto (contraindicado en pacientes con queratoglobo por riesgo de perforación), que en casos moderados y severos no logran una adecuada agudeza visual, por lo que se requerirían procedimientos quirúrgicos como la queratoplastia (trasplante de córnea de un donante humano muerto) para reemplazar en su totalidad la córnea ectásica o el implante de anillos intraestromales, son segmentos de anillo semicirculares de materiales polímeros que se implantan en el espesor del estroma corneal para intentar aplanar la córnea y disminuir el astigmatismo que produce la deformidad y así mejorar la calidad visual y, finalmente la utilización de terapias de entrecruzamiento molecular (crosslinking) del colágeno corneal para aumentar la fuerza tensil de este tejido y disminuir su deformación. [4,5,]

Este último es uno de los tratamientos más ampliamente utilizados para el queratocono en humanos actualmente, se realiza con aplicación tópica ocular de riboflavina al 0.1% sobre la córnea previamente desepitelizada con alcohol, continuando con la fotoactivación de esta sustancia con luz ultravioleta a 360 nm durante 30 minutos. [6,7]

Este tratamiento logra endurecer la córnea y evita la progresión de la deformidad corneal en forma efectiva, sin embargo existe un riesgo considerable de toxicidad, sobre la córnea y otras estructuras del ojo, particularmente cristalino y retina.

3.3 Genipín

El genipín es un producto hidrolítico de la geniposida, compuesto que se extrae del fruto de la planta *Gardenia jasminoides* Ellis que pertenece a la familia Rubiaceae. El fruto de esta planta es utilizada en las culturas orientales para el tratamiento de problemas médicos como estados febriles, ictericia, conjuntivitis aguda, epistaxis, hematemesis, úlceras cutáneas por estasis venosa, entre otras. [12,13,20,21]

Desde el descubrimiento de su estructura química, el genipín se ha utilizado a escala industrial como colorante y como reactivo para realizar entrecruzamiento molecular de diversas sustancias en la industria farmacéutica y en áreas de investigación dentro de la bioingeniería. [13]

Químicamente el genipín es un derivado agluconado de la geniposida. Posee la siguiente fórmula química $C_{11}H_{14}O_5$ y contiene un anillo dihidropiran. El método utilizado para la extracción de la geniposida y el genipín del fruto de la planta fue descrito en 1973 y desde entonces no ha tenido modificaciones importantes. [12]

El genipín por sí mismo es incoloro pero reacciona espontáneamente con aminoácidos para formar pigmentos azules. [20,21]

Como reactivo para realizar crosslinking, se ha utilizado en numerosas aplicaciones biológicas. Debido a que es una sustancia natural, biodegradable con muy baja citotoxicidad, ocupa un espacio importante en el diseño de adhesivos tisulares, materiales para recubrimiento de heridas, sustitutos óseos, estabilización de materiales para diseño de matrices tisulares y formas de liberación sostenida de fármacos. Además de sus aplicaciones en bioingeniería, se han descrito propiedades antiinflamatorias y antifibróticas en estudios in vitro y en animales. [13,15,16]

Se conocen propiedades antifibróticas a nivel de conjuntiva y células epiteliales del cristalino en modelos in vitro.

El mecanismo por el cual se logra el entrecruzamiento molecular no se entiende por completo. De forma general, se considera que el genipín, puede crear enlaces intra e intermoleculares en proteínas que tienen estructuras heterocíclicas y grupos amina primarios. También se ha demostrado la utilidad de genipín en las ciencias forenses por su capacidad de develar los dactilogramas latentes debido a su particular pigmento azul.

Específicamente, el genipín ha probado su utilidad para mejorar las propiedades tensiles de los tejidos en experimentos in vitro realizados con segmentos intervertebrales y tendones. [15,16,]

El entrecruzamiento corneal utilizando Genipín, un agente natural, en aplicación tópica, ha sido desarrollado por nuestro grupo de investigación, con el fin de endurecer la córnea y la matriz colágena. En trabajos anteriores realizados por nuestro grupo, ex vivo, hemos encontrado cómo de manera dosis dependiente el tratamiento con genipín tópico, incrementa el módulo de Young(modulo físico de fuerza/resistencia) y la resistencia mecánica de la córnea, así como también se aumenta el coeficiente de rigidez ocular, de modo que el genipín es un compuesto de origen natural el cual ha demostrado ser un excelente agente entrecruzador al ser comparado con el glutaraldehído y con otras sustancias entrecruzadoras ampliamente conocidas, y no requiere de activación con luz ultravioleta [1].

Para detalles de nuestros trabajos previos, remitimos el artículo publicado en la revista de las sociedades americana y europea de cirugía de catarata y refractiva, una de las revistas más importantes a nivel mundial en el ámbito de la oftalmología [1].

Se propone la evaluación de este compuesto in vivo en diferentes estructuras del ojo para establecer su perfil de seguridad y efectividad, que es el paso siguiente con miras a establecer el uso de genipín como agente entrecruzador en el tratamiento del queratocono y las otras ectasias corneales en seres humanos, para ello se realizó la aplicación tópica de genipín en ojos de conejo, in vivo con evaluación pre y pos aplicación del medicamento, de diferentes variables de la fisiología y así establecer el perfil de seguridad y efectividad del mismo.

4. Materiales y métodos

Se realizó el estudio en dos grupos independientes de conejos.

4.1 Grupo 1: Efecto de genipín sobre la cornea

12 Conejos de 20 semanas de edad (edad en la que la etapa de crecimiento se ha completado)

Hembras (no agresividad entre especímenes a diferencia de los machos)

Color blanco

Raza nueva Zelanda (raza morfológicamente uniforme, ampliamente usada en experimentación, sin presencia de pigmento ocular, que facilita la evaluación macroscópica)

Se evaluaron los efectos de la aplicación tópica de genipín en la córnea de un ojo, utilizando el ojo contralateral como control no tratado, en conejos que ya han completado su ciclo de crecimiento.

Se realizó la evaluación pretratamiento de todos los ojos, posteriormente se aplicó, en todos los ojos a tratar, el mismo día (día 1), genipín al 0.25% en la córnea, bajo anestesia tópica y general, mediante un anillo de Vidauri (anillo metálico que permite la estabilización espacial del ojo y el contacto con el genipín durante el tiempo deseado), durante 25 minutos, posteriormente se evaluaron las corneas a diferentes intervalos de tiempo, en ambos ojos (ver cronograma de actividades).

Los ojos tratados y no tratados fueron evaluados así, según los objetivos específicos del proyecto, al inicio, a la primera semana, a la cuarta semana y a la doceava semana:

Toxicidad directa observando cambios celulares a través del estudio microscópico, de los ojos enucleados de los especímenes sacrificados.

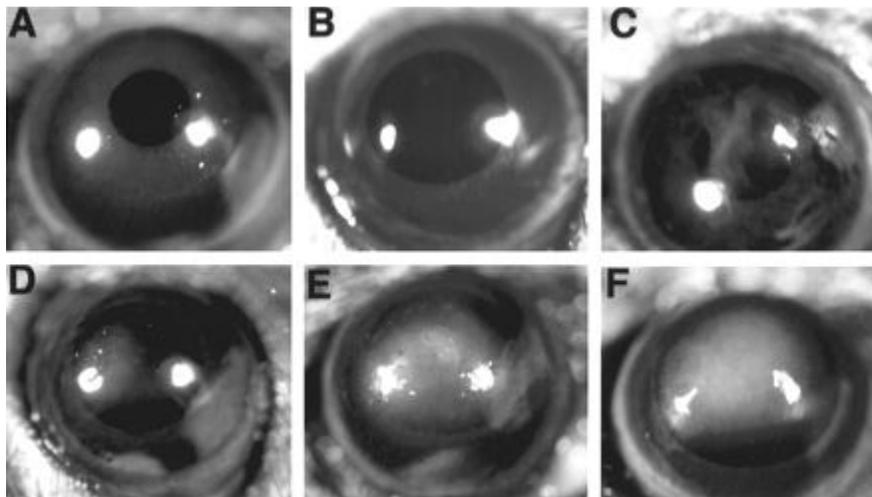
Espesor corneal a través de Paquimetría central ultrasónica (in vivo).

Curvatura corneal a través de queratometría automatizada (in vivo).

Evaluación de presión intraocular a través de tonometría (in vivo).

Transparencia corneal a través de evaluación macroscópica directa con lámpara de hendidura (ver Figura 4-1)

Figura 4-1: Evaluación de la transparencia corneal o escala de Haze (turbidez) corneal



La imagen muestra en A, la transparencia corneal normal y en forma progresiva pérdida de la misma hasta opacidad total en F

4.2 Grupo 2: Evaluación de efecto de genipín sobre crecimiento ocular.

8 Conejos recién destetados 6-8 semanas de edad (etapa activa de crecimiento)

Hembras

Color blanco

Raza nueva Zelanda

En el segundo grupo se evaluó el efecto de la aplicación de genipín tópico en la esclera de un ojo, vía subtenoniana (epiescleral), utilizando el ojo contralateral como control, para evaluar si el entrecruzamiento con genipín, a nivel de las esclera, logra afectar el crecimiento ocular, evaluándolo a través de la medición de la longitud axial después de doce semanas y evaluar si había alteración de otras variables de la fisiología ocular.

Para ello se realizó la aplicación, bajo anestesia tópica y general, a todos los especímenes el mismo día en conejos recién destetados (en etapa de crecimiento) de genipín al 0.25% en el espacio epiescleral a un volumen de 0.40 ml logrando una difusión a nivel escleral y se realizaron mediciones de longitud axial ocular, queratometría, Paquimetría y tonometría a diferentes intervalos de tiempo, y finalmente se sacrificaron para estudios microscópicos. (ver cronograma de actividades).

4.3 Equipos y recursos utilizados:

Bioterio y laboratorio de Bioterio, para mantenimiento de animales y realización de intervenciones.

Laboratorio de microscopia de Luz y electrónica.

Lámpara de hendidura y fotografía ocular, para evaluar cambios macroscópicos y transparencia corneal

Queratómetro automático Topcon

Paquímetro ultrasónico.

Tonómetro de Perkins para toma de presión intraocular.

Anillo de Vidauri.

Ketamina, Acepromazina y Xilazina uso parenteral y proparacaina uso tópico para anestesia.

4.4 Cronograma de actividades

Primer día

Grupo	Descripción de actividades
<i>Grupo 1 (12 especímenes)</i>	Mediciones pre tratamiento: Tonometría, Paquimetría, queratometría, escala de haze. Aplicación de tratamiento
<i>Grupo 2 (8 especímenes)</i>	Medidas pre tratamiento: Queratometría, Paquimetría, tonometría. Aplicación de tratamiento

Día 8 (una semana pos tratamiento)

Grupo	Descripción de actividades
<i>Grupo 1 (12 especímenes)</i>	Tonometría, Paquimetría, queratometría, escala de haze. Sacrificio de 4 especímenes.
<i>Grupo 2 (8 especímenes)</i>	Queratometría, Paquimetría, tonometría.

Cuatro semanas pos tratamiento

Grupos	Descripción de actividades
<i>Grupo 1 (8 especímenes)</i>	Tonometría, Paquimetría, queratometría, escala de haze. Sacrificio de 4 especímenes.
<i>Grupo 2 (8 especímenes)</i>	Queratometría, Paquimetría, tonometría.

Doce semanas pos tratamiento

Grupo	Descripción de actividades
<i>Grupo 1 (4 especímenes)</i>	Tonometría, Paquimetría, queratometría, escala de haze. Sacrificio de 4 especímenes.
<i>Grupo 2 (8 especímenes)</i>	Queratometría, Paquimetría, tonometría. Sacrificio de los 8 especímenes, enucleación para medición de longitud axial ocular de todos los ojos.

4.5 Consideraciones éticas

En este caso las consideraciones éticas atañen al uso de especies animales para experimentación, al respecto se seguirán los lineamientos del ARVO (Association for Research in Visual Sciences and Ophthalmology), asociación que marca la investigación de punta en el área de oftalmología, que se pueden consultar en la página oficial de ARVO www.arvo.org

Incluyen usar el menor número de especímenes necesarios para alcanzar los objetivos.

Durante el proyecto se debe causar el menor estrés o discomfort a los especímenes animales, para ello se deben tener los recursos de infraestructura adecuados, estar vigilados por personal capacitado y realizar los procedimientos bajo analgesia/anestesia, según sea necesario, para ello nuestros especímenes se mantendrán en el bioterio central de la universidad, el cual cumple con las normas vigentes y el personal debidamente capacitado para este fin.

Todos los procedimientos se realizarán bajo anestesia tópica y general con Ketamina a dosis de 35 mg/kg y Xilazina 5 mg/kg, previa sedación con Acepromazina, complementadas con proparacaina tópica ocular y los sacrificios se realizarán por sobredosis de agentes anestésicos.

Además el proyecto fue aprobado por el comité de ética de la facultad de medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

5. Resultados

5.1 Grupo 1

A continuación se tabulan los datos obtenidos en las cuatro mediciones con las diferentes variables, los animales se identificaron numéricamente, del uno al doce.

Es preciso aclarar que se observan cambios tanto en los ojos tratados como no tratados, en queratometría y Paquimetría, esto se debe a que aunque teóricamente los animales cumplían con la edad para ser catalogados como adultos, durante el estudio clínico presentaron aumento de tamaño, es decir que no estaban en plena adultez y ello indujo la variabilidad en los ojos no tratados, sin embargo, no se considera un problema mayor, ya que contamos con la ventaja de utilizar un ojo para ser tratado y el contralateral como control no tratado, para comparar los datos con fiabilidad.

5.1.1 Queratometría

Se realizó queratometría automatizada con queratómetro Topcon a todos los ojos de los especímenes del estudio, solo se tomó en cuenta el valor queratometrico en dioptrías, sin tener en cuenta el eje, debido a que técnicamente es muy difícil lograr ubicar el ojo en una posición totalmente vertical, siempre había un grado de torsión, mayor o menor, que no permitía un eje queratometrico confiable. En la primera medición del ojo no tratado del espécimen número 3, no fue posible tomar la queratometría a pesar de múltiples intentos, la superficie de la córnea era irregular, y no permitía una adecuada visualización de los anillos queratometricos, por esa razón no se pudo obtener el dato.

El análisis de los datos queratometricos nos permite decir que hay un aplanamiento progresivo de las curvaturas corneales con el crecimiento de los especímenes, que es más acentuado en los ojos tratados, y el efecto es más evidente a las doce semanas, por lo tanto el tratamiento con genipín induce un aplanamiento queratometrico progresivo.

Tabla 5-1: Queratometría pretratamiento

Animal	Ojo tratado	Promedio	Ojo no tratado	Promedio
1	47.75/49.62 X 170	48,62	48.5/50.12 X 6	49,25
2	51,75/54.37X175	53,00	50.25/51.12X21	50,62
3	46.00/48.50X160	47,25		
4	44.00/41.75X54	42,87	48.62/49.75X180	49,12
5	48.62/49.37X13	49,00	44.87/49.25X180	47
6	49.50/50.12X147	49,75	50.62/50.37X57	50,5
7	50.37/52.00X13	51,12	49.25/50.87X15	50,12
8	40.50/38.50X134	39,50	50.00/50.75X144	50,37
9	49.00/47.75X132	48,37	47.62/48.37X7	48
10	48.25/50.62X37	49,37	50.62/53.62X166	52,12
11	47.75/51.25X144	49,50	49.37/51.25X168	50,37
12	50.75/52.25X171	51,50	51.37/53.37X25	52,37
	PROMEDIO	48,32	PROMEDIO	49,98

Tabla 5-2: Queratometría una semana pos tratamiento

Animal	Queratometría 2			
	Ojo tratado	Promedio	Ojo no tratado	Promedio
1	47.62/49.00 X 157	48,25	42.25/46.87 X 6	44,50
2	47.62/48.50X164	48,12	48.50/49.25X21	48,87
3	41.75/50.25X5	46	48.87/47.37X94	48,12
4	49.00/50.37X20	49,62	47.75/48.75X145	48,25
5	48.12/52.50X141	50,37	46.00/48.12X26	47,12
6	45.25/49.37X159	47,37	47.75/49.75X28	48,75
7	48.50/50.00X166	49,25	48.12/47.12X119	47,62
8	45.75/48.75X11	47,25	46.00/49.37X168	47,62
9	40.87/47.00X9	44	44.87/47.37X20	46,12
10	39.00/48.12X31	43,5	47.75/49.62X174	48,75
11	47.00/50.00X175	48,5	48.62/49.62X31	49,12
12	45.00X48.37X176	46,75	42.87/49.37X167	46,12
	PROMEDIO	47,41	PROMEDIO	47,58

Tabla 5-3: Queratometría un mes pos tratamiento, sin los primeros cuatro especímenes

Animal	Queratometría 3			
	Ojo tratado	Promedio	Ojo no tratado	Promedio
5	42,50/43,50X11	43,00	44,50/47,50X15	46,00
6	42,50/47,75X176	45,12	47,25/48,00X16	47,62
7	45,37/47,00X19	46,12	46,25/43,62X75	44,87
8	42,62/42,75X25	44,62	45,87/47,00X148	46,37
9	47,25/45,00X108	46,12	47,62/48,37X7	48,00
10	48,87/50,87X180	49,87	43,50/45,25X147	44,37
11	41,75/45,12X170	43,50	42,87/47,00X13	45,00
12	48,12/49,50X156	48,75	45,12/48,87X172	47,00
		45,88		46,15

Tabla 5-4: Queratometría doce semanas pos tratamiento, sin los primeros ocho especímenes.

Animal	Queratometría 4			
	Ojo tratado	Promedio	Ojo no tratado	Promedio
9	42,00/42,87	42,50	45,25/48,12	46,62
10	42,12/46,00	44,00	46,12/47,37	46,75
11	43,50/46,75	45,12	43,12/47,00	45,12
12	41,12/43,75	42,50	42,37/44,00	43,25
	Promedio	43,53	Promedio	45,43

5.1.2 Paquimetría ultrasónica

Paquimetría hace referencia al espesor corneal. Se realizó Paquimetría ultrasónica central en todos los ojos de los especímenes, datos recopilados son interesantes, en la medida que lo que normalmente se observa en la práctica clínica al realizar crosslinking tradicional con riboflavina y UV, es que el grosor corneal disminuye, sin embargo al revisar los datos (ver tabla 5-5), nos damos cuenta en primera instancia el promedio paquimétrico entre los ojos tratados y no tratados previo al tratamiento es muy similar, 367,25 y 363,91 respectivamente, pero en todas las mediciones subsecuentes el promedio paquimétrico de los ojos tratados aumenta considerablemente respecto a los no tratados, sin embargo en la última medición, a las doce semanas pos tratamiento, se

observa una regresión de la Paquimetría central, que no alcanza a igualar el ojo no tratado, hipotéticamente, creemos que puede haber un edema pos tratamiento que no se alcanza a apreciar macroscópicamente, y que con el pasar de las semanas iría desapareciendo, sin embargo es difícil establecer cuál es la verdadera causa de este aumento en el grosor corneal, el estudio microscópico podría arrojar algunas luces a este respecto.

Tabla 5-5: Paquimetría de las cuatro mediciones, expresadas en micras

Animal	Paquimetría 1		Paquimetría 2		Paquimetría 3		Paquimetría 4	
	Tratado	No Tratado						
1	360	359	376	390				
2	402	369	430	442				
3	390	387	455	417				
4	364	356	389	385				
5	359	350	425	402	443	395		
6	295	301	350	332	394	347		
7	370	364	397	388	444	410		
8	384	380	403	384	461	402		
9	390	394	442	420	440	432	452	435
10	373	374	437	402	449	436	435	394
11	390	383	417	397	427	425	405	424
12	330	350	431	416	490	453	478	427
Promedio	367,25	363,91	417,7	404,1	443,5	412,5	442,5	420

5.1.3 Tonometría

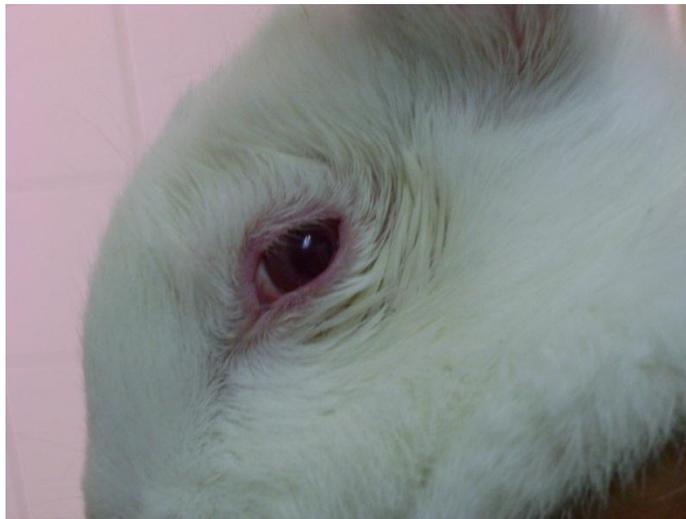
La presión intraocular no presentó ninguna variación de consideración, todas las tonometrías se mantuvieron en un rango entre 4 y 9 mmHg, que es normal, sin ningún pico de hipertensión (ver tabla 5-6)

Tabla 5-6: Tonometría de las cuatro mediciones, expresada en milímetros de mercurio

Animal	Tonometría 1		Tonometría 2		Tonometría 3		Tonometría 4	
	Tratado	No tratado						
1	7	6	6	4				
2	6	5	7	6				
3	8	8	9	7				
4	5	4	4	5				
5	6	3	8	5	7	6		
6	4	8	6	6	8	6		
7	8	5	7	7	9	4		
8	9	4	7	6	6	7		
9	4	7	6	8	8	6	7	5
10	7	9	5	8	4	5	5	6
11	6	5	8	7	8	5	6	7
12	8	4	6	5	7	4	8	5

5.1.4 Evaluación macroscópica de los ojos tratados

La evaluación macroscópica en lámpara de hendidura nos permite examinar en detalle el segmento anterior de los ojos, el primer día posterior a la aplicación hay algo de inflamación de los tejidos periorbitales e inyección conjuntival, reacción que es absolutamente normal, dado el procedimiento al que fue expuesto cada animal (ver figura 5-1)

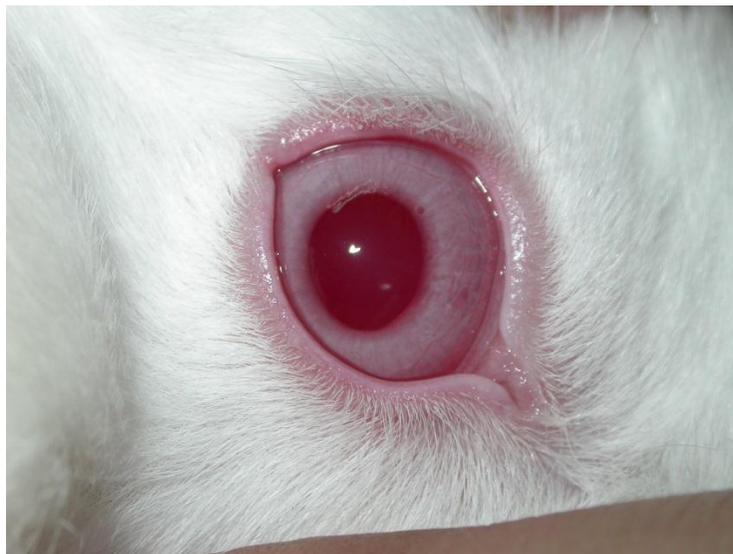
Figura 5-1: Primer día posterior a la aplicación

Todos los especímenes se recuperaron sin contratiempos, y al tercer día el aspecto general era normal (ver figura 5-2), con respecto a signos inflamatorios oculares, no se presentó ninguno, se aplicó la escala de haze para evaluar la transparencia corneal en todos los ojos tratados, y en todos ellos se clasificó como "A": no turbidez ni edema corneal, total transparencia, que se mantuvo en las doce semanas del estudio (ver figura 5-3), tampoco se evidenció coloración azul de la córnea, efecto secundario que podría haberse presentado, ya que el genipín un fuerte tinte azul natural.

Figura 5-2: Tercer día pos aplicación, el aspecto general es normal



Figura 5-3: Las estructuras oculares, en especial la córnea, no muestra signos inflamatorios, la transparencia es normal y no hay edema u otras alteraciones



5.2 Grupo 2

A continuación se tabulan los resultados obtenidos para los especímenes del grupo 2, los animales se enumeraron consecutivamente del número trece al veinte.

Es importante destacar que la aplicación del medicamento en el espacio subtenoniano resulto más difícil de lo pensado, debido a que los conejos recién destetados son pequeños y la manipulación de los ojos es difícil, además lograr la difusión uniforme del medicamento a nivel escleral, no se logró en la forma ideal, razón por la cual se aplicó el medicamento en cuatro cuadrantes, 0,1 ml en cada cuadrante, en forma subconjuntival directa.

5.2.1 Queratometría

Los datos que no se presentan en las tablas, no se lograron obtener a pesar de múltiples intentos.

Al analizar los datos no hay diferencias significativas entre los ojos tratados y no tratados

Tabla 5-7: Queratometría pre tratamiento

Animal	QUERATOMETRIA 1			
	Ojo tratado	Promedio	Ojo no tratado	Promedio
13	58.37/60.00X10	59,12	57,36/58,46X176	57,91
14	59.12/60.12X160	59,62	57.62/58.50X170	58,00
15	56.37/59.75X180	58,12	55.12/60.37X2	57,75
16	54.87/59.50X168	57,12	58,36/60,60X80	59,48
17	57.25/58.87X154	58,00		
18	58.87/61.12X4	60,00	55.37/59.25X137	57,25
19	57.00/53.87X71	55,50	58,38/59,12X15	58,75
20	58.37/54.62X120	56,50	55.25/51.62X111	53,50
	Promedio	57,99	Promedio	57,52

Tabla 5-8: Queratometría primera semana pos tratamiento

QUERATOMETRIA 2				
Animal	Ojo tratado	Promedio	Ojo no tratado	Promedio
13	51.50/54.37X3	53,00	43.50/44.25X14	43,87
14	55.87/54.62X108	55,25	54.25/57.12X31	55,62
15	57.62/54.75X131	56,12	56.62/58.00X16	57,25
16	55.12/58.12X156	56,62	55.62/56.62X22	56,12
17	52.37/54.75X14	53,50	54.87/57.75X6	56,25
18	53.87/58.25X153	56,00	64.37/60.00X61	62,25
19	51.50/54.50X12	53,37	53.75/52.87X68	53,00
20	55.00/51.62X51	53,37	55.37/53.37X48	54,37
	Promedio	54,65	Promedio	54,84

Tabla 5-9: Queratometría cuatro semanas pos tratamiento

QUERATOMETRIA 3				
Animal	Ojo Tratado	Promedio	Ojo No Tratado	Promedio
13	47,87/49,62X12	48,75	48,87/49,62X7	49,25
14	50,50/53,87X138	52,12	47,87/50,12X11	49,00
15	54,00/49,75X98	51,87	51,62/48,12X80	49,87
16	54,37/51,12X133	52,75	48,37/51,25X38	49,87
17	41,12/46,75X19	43,87	49,62/51,12X5	50,37
18	50,12/53,12X178	51,62		
19	41,37/40,75X55	41,00	47,87/49,87X22	48,87
20	51,00/47,37X99	49,12	50,25/47,37X67	48,75
	Promedio	48,88	Promedio	49,42

Tabla 5-10: Queratometría doce semanas pos tratamiento

QUERATOMETRIA 4				
Animal	Ojo Tratado	Promedio	Ojo No Tratado	Promedio
13				
14	46,00/47,75	46,87	51,50/49,00	50,25
15	51,12/48,25	49,75	49,62/48,75	49,12
16	50,50/51,37	51,00	46,87/49,00	47,87
17	45,12/47,75	46,37	47,87/48,75	48,37
18	49,50/50,75	50,12	47,87/48,75	48,37
19	46,75/47,25	47,00	46,25/47,25	46,75
20	47,87/48,25	48,12	45,00/46,50	45,75
	Promedio	48,46	Promedio	48,06

5.2.2 Paquimetría ultrasónica

No fue posible obtener mediciones de Paquimetría, debido a que el grosor de las corneas de los conejos recién destetados no alcanza el umbral necesario para ser medido por el paquímetro ultrasónico, ni siquiera a las doce semanas pos tratamiento.

5.2.3 Tonometría

No se encontraron diferencias entre los ojos tratados y no tratados, el rango de presión estuvo entre los 3 y 8 milímetros de mercurio, valores normales.

Tabla 5-11: Tonometría

Animal	Tonometría 1		Tonometría 2		Tonometría 3		Tonometría 4	
	Tratado	No tratado						
13	5	6	6	4	3	5	7	4
14	7	5	7	6	5	8	5	7
15	7	8	8	7	7	6	6	8
16	5	4	4	5	6	6	6	5
17	6	3	7	5	7	6	4	8
18	3	8	6	6	8	6	8	4
19	8	5	9	7	7	4	9	5
20	9	4	7	6	6	7	10	8

5.2.4 Evaluación macroscópica de los ojos tratados

El tipo de procedimiento utilizado para la aplicación de tratamiento en este grupo, aplicación subtenoniana, es más invasiva que la aplicación corneal, debido a que se realizaron inyecciones subconjuntivales en cuatro cuadrantes de cada ojo tratado, además los conejos están en una etapa de vulnerabilidad por su edad, lo que hizo que la reacción pos operatoria fuera más marcada en este grupo y la recuperación más lenta, sin embargo al cabo de una semana, la apariencia y actividad de los animales era normal y todos se recuperaron sin contratiempos. (ver figuras 5-4 a 5-7)

No se evidenció ninguna alteración inflamatoria intraocular, reflejos pupilares normales, cámara anterior limpia en todos los especímenes durante las doce semanas del estudio.

Figura 5-4: Primer día pos tratamiento, marcada reacción de los tejidos perioculares



Figura 5-5: Tercer día pos tratamiento, ya se observa apertura ocular espontánea



Figura 5-6: Quinto día pos tratamiento, mejoría franca

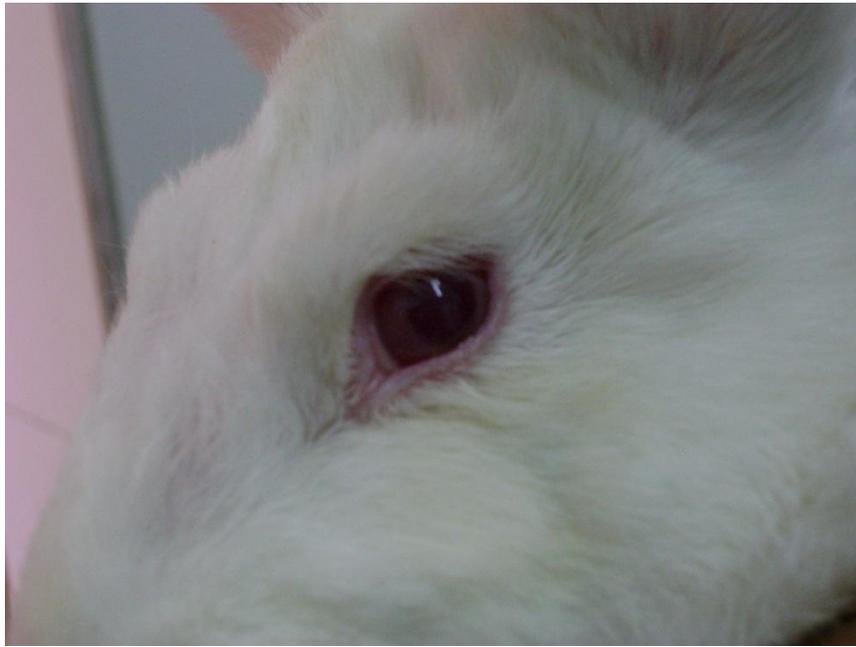


Figura 5-7: Octavo día pos tratamiento, recuperación completa



5.2.5 Longitud axial

Posterior al sacrificio de los especímenes a las doce semanas de tratamiento, se procedió a enuclear los ojos y a realizar medición de longitud axial con calibrador electrónico. No se encontraron diferencias entre la medición de la longitud axial de los ojos tratados y los no tratados (ver tabla 5-12)

Tabla 5-12: Longitud axial

	Longitud axial	
Animal	Ojo tratado	Ojo no tratado
13	16,7mm	16,7mm
14	17mm	17mm
15	16,7mm	16,6mm
16	16,2mm	16,2mm
17	17,4mm	17,3mm
18	16,7mm	16,8mm
19	16,9mm	16,8mm
20	16,8mm	16,8mm

6. Conclusiones

6.1 Grupo 1

El entrecruzamiento corneal con genipín, es una herramienta promisoría en el tratamiento de las ectasias corneales, por cuanto su perfil de seguridad, evaluado mediante este estudio, es alentador, no se encontró ninguna reacción inflamatoria intraocular y no se encontraron alteraciones de la transparencia o coloración corneales.

En cuanto a las variables específicas, la curvatura corneal demostró aplanamiento en los ojos tratados respecto a los no tratados, que es lo que precisamente se busca en el tratamiento de las ectasias, para reducir las curvaturas prominentes y el astigmatismo causados por la deformidad.

El grosor corneal mostro un aumento en los ojos tratados, que tendió a disminuir en las últimas mediciones y cuyo origen no está claro, hipotéticamente planteamos que se puede atribuir a un edema no apreciable macroscópicamente, a este respecto el estudio microscópico puede arrojar luces adicionales

La tonometría, una variable importante de la fisiología ocular no se vio afectada por el tratamiento con genipín.

En general, la aplicación tópica de genipín en la córnea para producir entrecruzamiento, no mostro efectos adversos o reacciones inflamatorias de consideración en los ojos tratados, mostrando un perfil de seguridad viable para el tratamiento de corneas humanas, sin embargo para evaluar más a fondo su perfil de toxicidad es necesario el estudio histológico, que a la fecha de entrega de este trabajo de investigación, se encuentra en proceso.

Es necesario conducir estudios adicionales para establecer específicamente la eficacia del genipín en el tratamiento de las ectasias corneales, y si el perfil de toxicidad es favorable en el estudio microscópico, estos estudios se deben llevar a cabo en ojos humanos, como siguiente paso en desarrollo de una terapia efectiva de entrecruzamiento alternativa a la riboflavina con UV, en el tratamiento de las ectasias corneales.

6.2 Grupo 2

En la evaluación del efecto del genipín sobre el crecimiento ocular, la hipótesis de trabajo proponía que al realizar entrecruzamiento del colágeno sobre la esclera, se lograría detener el crecimiento del globo ocular en los conejos recién destetados, a este respecto los resultados desmintieron esta hipótesis, ya que no se encontraron diferencias en la longitud axial de los ojos tratados y los no tratados. Sin embargo, cabe anotar, que técnicamente fue muy difícil lograr una adecuada difusión escleral del medicamento, debido al comportamiento de los tejidos del globo ocular de los especímenes, en los cuales encontrar el espacio subtenoniano y aplicar el medicamento no se logró de la manera esperada. Es necesario, para dar una respuesta definitiva a esta interrogante, conducir nuevos ensayos con especies más grandes que permitan una adecuada manipulación de los tejidos en los que se asegure la difusión adecuada del genipín.

Sin embargo, lo que reveló el segundo grupo, en ojos con actividad mitótica fuerte, es que la seguridad del genipín es muy buena, ya que se aplicó el medicamento en forma subconjuntival, recordemos que en el primer grupo, el genipín se aplicó tópico por 20 minutos, y luego se realiza un lavado exhaustivo del mismo, sin embargo la aplicación subconjuntival no permite un lavado, el medicamento queda en ese espacio hasta que se realiza su absorción y metabolismo completos, y a pesar de ello, no se encontraron eventos adversos de importancia, y la evaluación macroscópica fue, aparte de una ligera coloración azul que hacia la semana doce había desaparecido, absolutamente normal.

Para establecer el perfil de toxicidad a nivel celular, es necesario evaluar los estudios microscópicos, que a la fecha de entrega de este trabajo de investigación, se encuentran en proceso.

Bibliografía

- [1] Avila Marcel, Navia Jose L, Effect of genipin collagen crosslinking on porcine corneas, J Cataract Refract Surg 2010; 36:659–664 Q 2010 ASCRS and ESCRS
- [2] Seiler T, Koufala K, Richter G: Iatrogenic keratectasia after laser in situ keratomileusis. J Refract Surg 1998;14:312-317
- [3] Mannis MJ, Zadnik K: Contact lens fitting in keratoconus. CLAO J 1989;15:282-289
- [4] Sekundo W, Stevens Jd: Surgical treatment of keratoconus at the turn of the 20 th century. Journal of refractive surgery(1995) 2001;17:69-73
- [5] Colin J, Cochener B, Savary G, Malet F: Correcting keratoconus with intracorneal rings. Journal of Cataract & Refractive Surgery 2000;26:1117-1122
- [6] Wollensak G, Spoerl E, Seiler T: Riboflavin/ultraviolet-A induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. American Journal of Ophthalmology 2003;135:620-627
- [7] Wollensak G: Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. Current Opinion in Ophthalmology 2006;17:356
- [8] Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, Seiler T: Collagen Fiber Diameter in the Rabbit Cornea After Collagen Crosslinking by Riboflavin/UVA. Cornea 2004;23:503
- [9] Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T: Endothelial cell damage after riboflavin-ultraviolet-A treatment in the rabbit. Journal of Cataract & Refractive Surgery 2003;29:1786-1790

[10] Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T: Keratocyte Apoptosis After Corneal Collagen Cross-linking Using Riboflavin/UVA Treatment. *Cornea* 2004;23:43. 34

[11] Pitts DG, Cullen AP, Hacker PD: Ocular effects of ultraviolet radiation from 295 to 365 nm. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1977;16:932-939

[12] Endo T, Taguchi H: The Constituents of *Gardenia jasminoides* Geniposide and Genipin-gentiobioside. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 1973;21:2684-2688

[13] Yao CH, Liu BS, Chang CJ, Hsu SH, Chen YS: Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials. *Materials Chemistry and Physics* 2004;83:204-208

[14] Maguire LJ, Meyer R: Ectatic corneal degenerations. *The cornea*, 2nd ed Oxford: Butterworth-Heinemann 1998;525-550

[15] Van Kleunen Jp, Elliott DM: Effect of a natural crosslinking agent (genipin) on tendon longitudinal and transverse tensile properties; 2003

[16] Lien SM, Li WT, Huang TJ: Genipin-crosslinked gelatin scaffolds for articular cartilage tissue engineering with a novel crosslinking method. *Materials Science and Engineering: C* 2008;28:36-43

[17] Edmund C: Corneal elasticity and ocular rigidity in normal and keratoconic eyes. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1988;66:134-140

[18] Meek KM, Tuft SJ, Huang Y, Gill PS, Hayes S, Newton RH, Bron AJ: Changes in Collagen Orientation and Distribution in Keratoconus Corneas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2005;46:1948-1956

[19] Tsai TR, Tseng TY, Chen CF, Tsai TH: Identification and determination of geniposide contained in *Gardenia jasminoides* and in two preparations of mixed traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography A* 2002;961:83-88

[20] Touyama R, Inoue K, Takeda Y, Yatsuzuka M, Ikumoto T, Moritome N, Shingu T, Yokoi T, Inouye H: Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. II: On the formation mechanisms of brownish-red intermediates leading to the blue pigment formation. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 1994;42:1571-1578

[21] Park JE, Lee JY, Kim HG, Hahn TR, Paik YS: Isolation and Characterization of Water-Soluble Intermediates of Blue Pigments Transformed from Geniposide of *Gardenia jasminoides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50:6511-6514

[22] Krachmer JH, Feder RS, Belin MW: Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders. *Surv Ophthalmol* 1984;28:293-322