



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**ANÁLISIS DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN  
INTRAVITREAL DE VIRUS ADENOASOCIADOS TIPO 2 QUE  
TRANSDUCEN VASOINHIBINAS EN LA RETINOPATÍA DIABÉTICA  
EXPERIMENTAL**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA:  
M. C. NUNDEHUI DÍAZ LEZAMA**

**TUTORA:  
DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ L.  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DRA. BRENDA ANGUIANO SERRANO  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA , UNAM  
DR. RICARDO FÉLIX GRIJALVA  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Campus Juriquilla, Querétaro

Abril 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## JURADO DE EXAMEN

Presidente	Dra. Maricela Luna Muñoz
Secretario	Dra. María del Carmen Clapp Jiménez Labora
Vocal	Dr. Yonathan Omar Garfías Becerra
Vocal	Dra. Verónica Guarner Lans
Vocal	Dr. Gerardo Rojas Piloni.

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus Juriquilla, Querétaro. Fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyectos SALUD-2011-1-161594 y 247164; adicionalmente la alumna recibió apoyo con el número de registro de becario 245224.

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El apoyo técnico y la valiosa ayuda del Nut. Fernando López Barrera y de la ISC Elsa Nydia Hernández Ríó en la Unidad de Microscopía Confocal.

El asesoramiento de la M. en C. Leonor Casanova Rico, responsable de la Unidad de Enseñanza.

La labor asistencial de los laboratoristas Daniel Mondragón Huerta y Antonio Prado Galán, así como la ayuda técnica del M en C. Gabriel Nava Pinto.

Al personal del bioterio, de manera particular el apoyo del MVZ Martín García Servín y Alejandra Castilla León.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Ana y Octavio  
mis hermanos Xhareni y José Octavio y abuelas Juve y Ciria  
gracias por todo el amor .

VIVE COMO SI FUERAS A MORIR MAÑANA. APRENDE  
COMO SI FUERAS A VIVIR SIEMPRE

GANDHI

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	I
ABSTRACT .....	III
RESUMEN .....	IV
<b>I.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>4</b>
<b>III.- ANTECEDENTES .....</b>	<b>5</b>
<b>III.1 SISTEMA OCULAR .....</b>	<b>5</b>
<b>III.1.1 DESCRIPCIÓN ANATÓMICA BÁSICA .....</b>	<b>5</b>
<b>III.1.2 LA RETINA .....</b>	<b>6</b>
III.1.2.1 Anatomía y morfología general de la retina .....	6
III.1.2.2 Irrigación ocular .....	9
III.1.2.3 Vasculatura de la retina .....	9
III.1.2.4 Epitelio pigmentario de la retina.....	12
III.1.2.5 Mácula .....	12
<b>III.2 RETINOPATÍA DIABÉTICA (RD) .....</b>	<b>13</b>
<b>III.2.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA .....</b>	<b>13</b>
III.2.2.1 Prevalencia e incidencia de la RD.....	13
III.2.2.2 Factores de riesgo involucrados en el desarrollo de la retinopatía diabética.....	15
<b>III.2.2 CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN DE LA RETINOPATÍA         DIABÉTICA.....</b>	<b>16</b>
<b>III.2.3 MECANISMOS Y MOLÉCULAS INVOLUCRADOS EN LA         PROGRESIÓN DE LA RD .....</b>	<b>18</b>
III.2.3.1 Producción intracelular de precursores de productos terminales de la glicosilación avanzada .....	20
III.2.3.2 Vía de biosíntesis de la hexosamina.....	20
III.2.3.3 Vía de los polioles o del sorbitol.....	21



III.2.3.4 Activación de la proteína cinasa C (PKC) .....	22
III.2.3.5 Estrés en el retículo endoplásmico .....	23
III.2.3.6 Estrés oxidativo .....	24
III.2.3.7 Factores de crecimiento .....	24
<b>III.2.4 TRATAMIENTO DE LA RD</b> .....	25
III.2.4.1 Fotocoagulación láser y vitrectomía .....	26
III.2.4.2 Terapia anti-VEGF.....	28
Anticuerpos anti-VEGF .....	28
Inhibidores de la transcripción intracelular del VEGF .....	29
Inhibidores extracelulares del VEGF .....	30
Inhibidores de la expresión del VEGF.....	30
<b>III.2.5 TERAPIA GÉNICA PARA LA RD</b> .....	31
III.2.5.1 AAV.....	32
<b>IV.- ANTECEDENTES INMEDIATOS</b> .....	35
<b>V.- HIPÓTESIS</b> .....	38
<b>VI.- OBJETIVOS</b> .....	38
<b>VII.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	39
<b>VII.1 ANIMALES</b> .....	39
VI.1.1 Animales .....	39
<b>VII.2 METODOLOGÍA</b> .....	39
VII.2.1 Modelo experimental de retinopatía diabética .....	39
VII.2.2 Construcción de plásmidos y producción de AAV2 recombinantes .....	39
VII.2.3 Inyección intravitreal de AAV2Vi, AAV2sFlt-1, AAV2-GFP .....	40
VII.2.4 Cuantificación de los genomas virales .....	40
VII.2.5 Ensayo de azul de evans .....	41
VII.2.6 Montajes planos de retina .....	41
VII.2.7 Extracción del mRNA .....	42
VII.2.8 Síntesis del DNA complementario (cDNA) .....	42

VII.2.9 qRT-PCR .....	43
VII.2.10 Fluoroangiografía de la retina.....	43
VII.2.11 Evaluación de la expresión de los transgenes en la retina .....	44
VII.2.12 Electroretinograma.....	44
VII.2.13 Evaluación del grosor retiniano mediante cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina.....	45
VII.2.14 Inmunohistoquímica en criosecciones de retina .....	46
VII.2.15 Análisis Estadístico.....	47
<b>VIII.- RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
VIII.1 Verificación de la expresión del transgen de vasoinhibinas y sFlt-1 en la retina .....	48
VIII.2 Los vectores de AAV2 vasoinhibinas y AAV2 sFlt-1 revierten la patología de la BHR inducida por la diabetes .....	49
VIII.3 El vector de AAV2 Vasoinhibinas reduce anomalías en la microvasculatura retiniana ocasionadas por la diabetes .....	52
VIII.4 El vector de AAV2 Vasoinhibinas disminuye la disfunción electrofisiológica en la retina producida por la diabetes.....	54
VIII.5 Los vectores AAV2 Vasoinhibinas no producen cambios en la histología de la retina.....	55
VIII.6 La diabetes aumenta la eficacia, la expresión de los transgenes y transducción de los vectores AAV2 en la retina .....	56
VIII.7 La expresión de los receptores primarios y co-receptores de los AAV2 esta elevada en la retina de ratas diabéticas.....	59
<b>IX.- DISCUSIÓN .....</b>	<b>61</b>
<b>X.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>XI.- REFERENCIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>XII.- ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>86</b>
<b>XIII.- ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>87</b>
<b>XIV.- ANEXOS .....</b>	<b>89</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>RD</b>	Retinopatía diabética
<b>RDP</b>	Retinopatía diabética proliferativa
<b>Vi</b>	Vasoinhibinas
<b>BHR</b>	Barrera hematoretiniana
<b>CCG</b>	Capa de células ganglionares
<b>CPI</b>	Capa plexiforme interna
<b>CNI</b>	Capa nuclear interna
<b>CPE</b>	Capa plexiforme externa
<b>CNE</b>	Capa nuclear externa
<b>CFR</b>	Capa de fotorreceptores
<b>EPR</b>	Epitelio pigmentario de la retina
<b>AAV2</b>	Virus adeno-asociados tipo 2
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>ACPM</b>	Arteria ciliar posterior media
<b>CNO</b>	Cabeza del nervio óptico
<b>ACPL</b>	Arteria ciliar posterior larga
<b>ACR</b>	Arteria ciliar retiniana
<b>EMD</b>	Edema macular diabético
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>HBP</b>	Vía de biosíntesis de hexosamina

<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>ET-1</b>	Endotelina 1
<b>TGF-β</b>	Factor transformante beta
<b>PAI-1</b>	Inhibidor del activador de plasminógeno 1
<b>RBX</b>	Ruboxistaurina
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>UPR</b>	Respuesta de proteínas mal plegadas
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intercelular 1
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>bFGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
<b>PDGFs</b>	Factores de crecimiento derivados de plaquetas
<b>RNAi</b>	RNA de interferencia
<b>PGF</b>	Factor de crecimiento placentario
<b>OCT</b>	Tomografía óptica computarizada
<b>rAAV</b>	Virus adeno-asociado recombinante
<b>PEDF</b>	Factor derivado del epitelio pigmentario
<b>AMD</b>	Degeneración macular asociada a la edad
<b>STZ</b>	Estreptozotocina
<b>EGFP</b>	Proteína verde fluorescente intensificada
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>ERG</b>	Electroretinograma
<b>DB</b>	Diabético
<b>ND</b>	No diabético

## ABSTRACT

Diabetic retinopathy and diabetic macular edema are among the primary causes of irreversible blindness and visual impairment in working-age adults. Adeno-associated virus (AAV) vector-mediated delivery of inhibitors of vascular abnormalities, like blood-retinal barrier breakdown (BRBB), offers an alternative for the treatment of this disease. Such inhibitors are vasoinhibins, a family of peptides generated by the specific proteolytic cleavage of the hormone prolactin that reduce diabetes-induced BRBB by targeting both the inner (vascular endothelial cells) and the outer (retinal pigment epithelium) components of the blood retinal barrier. Here we demonstrate a reversal of blood-retinal barrier pathology mediated by AAV type 2 (AAV2) vectors encoding vasoinhibin (AAV2 Vi) or soluble VEGF receptor 1 (AAV2 sFlt-1) when intravitreally injected into diabetic rats. The efficacy as well as biosecurity use of the AAV2 Vi vector were shown by evaluating effects on diabetes-induced alterations of the retinal vascular bed and thickness, and of the electroretinogram (ERG). We compared also the level of transduction of AAV2 vectors and expression profile of AAV2 receptors and co-receptors in diabetic and non-diabetic rat retinas. The vectors (AAV2-Vi or AAV-sFlt-1) were injected intravitreally before or after the BRBB was enhanced in diabetic rats treated with streptozotocin. The Evans blue method evaluated the BRBB and the retinal vascular bed was examined by fluorescein angiography. Confocal microscopy evaluated the retinal expression of the AAV2 EGFP reporter vector and quantitative PCR that of the AAV2 genome transgenes, receptors, and co-receptors. AAV2-Vi and AAV2-sFlt-1 vectors inhibited the diabetes-mediated increase in tracer (Evans blue albumin) accumulation when diabetes was induced prior to the intravitreal delivery of the vectors. However, neither vector affected tracer accumulation when injected before the onset of diabetes. Microvascular abnormalities and the diabetes induced reduction of the B-wave of the ERG were reduced by treatment with the AAV2 vasoinhibin vector, whereas such treatment had no effect in non-diabetic controls. Also, retinal thickness was not altered by diabetes or the administration of the AAV2-Vi vector. The AAV2 genome, vasoinhibins and sFlt-1 transgenes and EGFP levels were associated with an increased expression of AAV2 receptors and co-receptors. In conclusion retinal transduction and efficacy of AAV2 vectors are enhanced in diabetes, possibly due to their elevated cell entry. AAV2 vectors encoding vasoinhibin and sFlt-1 may be desirable gene therapeutics to target diabetic retinopathy and diabetic macular edema.

## RESUMEN

La retinopatía diabética (RD) y el edema macular diabético (EMD) son las principales causas de ceguera irreversible y discapacidad visual en personas en edad laboral. Estas enfermedades derivan de la proliferación vascular (angiogenesis) y la vasopermeabilidad excesiva en la retina ocasionadas por la diabetes. La transferencia génica de inhibidores de anormalidades vasculares por medio de vectores derivados de virus adeno-asociados del serotipo 2 (AAV2) constituye una alternativa prometedora para el tratamiento de ambos padecimientos. Entre estos inhibidores se encuentran las vasoinhibinas, una familia de péptidos generados por la proteólisis específica de la hormona prolactina, que inhiben la angiogénesis y la ruptura de la barrera hematorretiniana, al tener efectos tanto a nivel de su componente interno vascular (células endoteliales) como sobre su componente externo (células del epitelio pigmentario de la retina). En este trabajo demostramos que la inyección intravitreal de vectores AAV2 que codifican para las vasoinhibinas o para el receptor soluble tipo 1 del VEGF (sFlt-1) son capaces de revertir la patología en la barrera hematorretiniana de ratas diabéticas. La eficacia y bioseguridad de esta terapia se evaluó a través de cambios en las alteraciones vasculares, histológicas (grosor) y funcionales (electroretinograma, ERG) de la retina en el modelo de diabetes inducida por estreptozotocina en la rata. Además, comparamos el nivel de transducción de los vectores AAV2 y la expresión de sus respectivos receptores y co-receptores en las retinas de animales diabéticos y no diabéticos. La integridad de la barrera hematorretiniana se evaluó mediante el método de azul de Evans, la fluoroangiografía analizó la estructura del lecho vascular, la expresión de los AAV2 se determinó mediante microscopia confocal utilizando AAV2 que codifican para la proteína verde fluorescente (AAV2-EGFP) y mediante PCR cuantitativa que evaluó la expresión génica de los transgenes, así como de los receptores y co-receptores de los AAV2. Los AAV2-Vi y AAV2-sFlt-1 inhibieron la ruptura de la barrera hematorretiniana cuando se administraron a animales diabéticos, pero no cuando se indujo la diabetes posterior a la administración de los vectores. Además, los AAV2-Vi redujeron anormalidades microvasculares debidas a la diabetes así como revirtieron la reducción en la amplitud de la onda B del ERG característica de este padecimiento. Los vectores no ocasionaron cambio en estos parámetros en animales controles no diabéticos. El grosor retiniano tampoco se vio alterado ni por la diabetes ni por el tratamiento con los vectores. Los genomas virales de los AAV2, así como los transgenes de la vasoinhibina, el sFlt-1 y el EGFP aumentaron en la retina de animales diabéticos en comparación con los animales controles y esto se correlacionó con un incremento en la expresión de los receptores y co-receptores de estos vectores. En conclusión, la transducción y la eficacia de los vectores AAV2 aumentan bajo condiciones de diabetes, probablemente debido a que la diabetes favorece su incorporación celular. Los vectores AAV2 que codifican para las vasoinhibinas y el sFlt-1 representan un tratamiento seguro con potencial clínico en la RD y el EMD.

## I.INTRODUCCIÓN

La retinopatía diabética (RD) es la complicación ocular más severa de la diabetes<sup>1</sup>. Alrededor de un 30% de las personas que padecen diabetes en el mundo tienen retinopatía diabética. La aparición de RD esta relacionada en gran medida a la duración de diabetes, se conoce que luego de 15 años con la enfermedad el 75-95% de los diabéticos presentarán signos de retinopatía<sup>2</sup>.

Clínicamente la RD se define como una microangiopatía de tipo progresivo que se caracteriza por lesiones, oclusión de los vasos capilares y neovascularización de la retina en personas con diabetes<sup>3</sup>. La causa exacta de la microangiopatía diabética es desconocida, sin embargo uno de los factores más importantes que conduce a su desarrollo es la hiperglucemia crónica. La hiperglucemia crónica promueve la producción de especies reactivas de oxígeno que conllevan a la muerte de células vasculares (pericitos y células endoteliales). Esto aumenta la permeabilidad de la barrera hematoretiniana y conduce a la filtración de componentes plasmáticos al espacio extravascular, al edema retiniano, a la formación de exudados lipídicos y al engrosamiento de la membrana basal endotelial. Con el tiempo, estas alteraciones vasculares producen zonas de isquemia e hipoxia. La hipoxia promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) a través de estimular la producción en la retina de factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En estados avanzados de la RD los nuevos vasos sanguíneos invaden y sangran en el cuerpo vítreo produciendo una membrana fibrovascular que puede provocar el desprendimiento de la retina y la consecuente ceguera<sup>4</sup>.

La principal estrategia para controlar la RD es la fotocoagulación con rayos láser de zonas discretas o extensas de la retina. En la clínica, el uso de la fotocoagulación láser como tratamiento para la RD ha mostrado una eficacia cercana al 50% en los pacientes tratados, sin embargo, no está exenta de complicaciones y efectos secundarios dentro de los que se han reportado la pérdida de la visión periférica, de la visión nocturna y de la visión al color<sup>5, 6</sup>. Otro tratamiento ampliamente utilizado es la vitrectomía, un tratamiento quirúrgico que se indica en casos graves de RD, específicamente aquellos que



cursan con desprendimiento de la retina o una hemorragia vítrea severa<sup>7</sup>. A pesar de los avances, sigue siendo una cirugía altamente compleja y con riesgos potenciales como la formación de cataratas en un 44%<sup>8</sup> y, en el peor de los casos, de endoftalmitis, que conlleva a la pérdida total de la visión, o del globo ocular. En general, tanto la vitrectomía como la fotocoagulación láser, son aplicables solamente en los estados avanzados de la RD, tienen efectos limitados a una proporción de los pacientes, son destructivos y comprometen la funcionalidad de la retina. Adicionalmente, estos tratamientos no ayudan a prevenir la recurrencia de la enfermedad ya que no erradican del todo el estímulo angiogénico que está directamente relacionado con el desarrollo de la RD<sup>9</sup>.

Aunque el tratamiento estándar de la RD y edema macular diabético sigue siendo la fotocoagulación laser, recientemente los especialistas de la retina están explorando el uso de agentes anti-VEGF aplicados mediante inyecciones intravitreales, obteniendo resultados prometedores<sup>10</sup>. Sin embargo, este tratamiento tampoco resulta efectivo en todos los casos y requiere de inyecciones intravitreales repetidas para que el efecto terapéutico se mantenga. Esto incrementa el riesgo de complicaciones oculares serias como son la endoftalmitis, el desprendimiento de la retina y el daño al cristalino<sup>10</sup>.

Ante esta problemática, la terapia génica utilizando vectores derivados de virus adenoasociados del serotipo 2 (AAV2), capaces de transducir proteínas con propiedades antiangiogénicas e inhibitorias de la permeabilidad vascular, constituyen una opción promisoría para el tratamiento de la RD<sup>11</sup> y del EMD. Los vectores recombinantes derivados de los AAV2 son utilizados en la terapia génica ocular dado que exhiben una muy baja inmunogenicidad y transducen de manera eficiente y estable los distintos tipos celulares de la retina<sup>11</sup>. Su éxito se ha demostrado para el tratamiento de enfermedades genéticas oculares, específicamente en la amaurosis congénita de Leber<sup>12</sup>.

Los vectores AAV2 que codifican para inhibidores de la vasopermeabilidad como el receptor soluble del VEGF 1 (sFlt-1)<sup>13</sup>, la angiostatina<sup>14</sup>, la angiotensina<sup>15</sup> y las vasoinhibinas<sup>13</sup>, aplicados en ratas diabéticas han demostrado reducir el aumento en la permeabilidad vascular después de suministrarlos de manera intravitreal. Sin embargo, en

estos estudios los vectores fueron administrados antes de que se indujera el padecimiento diabético. Demostrar la eficacia de la terapia génica una vez que la diabetes ya está establecida tiene una relevancia médica que podría ser inclusive mayor que la de desarrollar estrategias profilácticas. Dada la importancia que se ha enfatizado en estudios recientes sobre el riesgo de diseminación del vector y activación de la respuesta inmune con altas dosis de vectores suministrados intravitrealmente, es importante incrementar la eficiencia de transducción de estos vectores.

En este estudio evaluamos el efecto inhibitorio de los vectores AAV2 que codifican para las vasoinhibinas y el sFlt-1 sobre la ruptura de la barrera hematorretiniana (BHR) producida por la diabetes en un modelo murino, cuando son suministrados después de que la diabetes ya esta establecida. Deseamos analizar si la terapia génica utilizando vasoinhibinas tiene propiedades curativas una vez instaurada la diabetes, lo cual es relevante debido a que éste sería el escenario habitual de su utilización. Asimismo, dado que las vasoinhibinas interfieren con las acciones vasculares tanto del VEGF como de otros factores determinantes de la RD (bradicinina, interleucina 1- $\beta$ , factor de crecimiento de fibroblastos-2)<sup>16</sup>, proponemos que la terapia génica con vasoinhibinas pudiera representar ventajas sobre la terapia génica con inhibidores exclusivos del VEGF. Por lo cual estamos comparando el efecto terapéutico de los AAV2-Vi con el de los AAV2-sFlt-1.

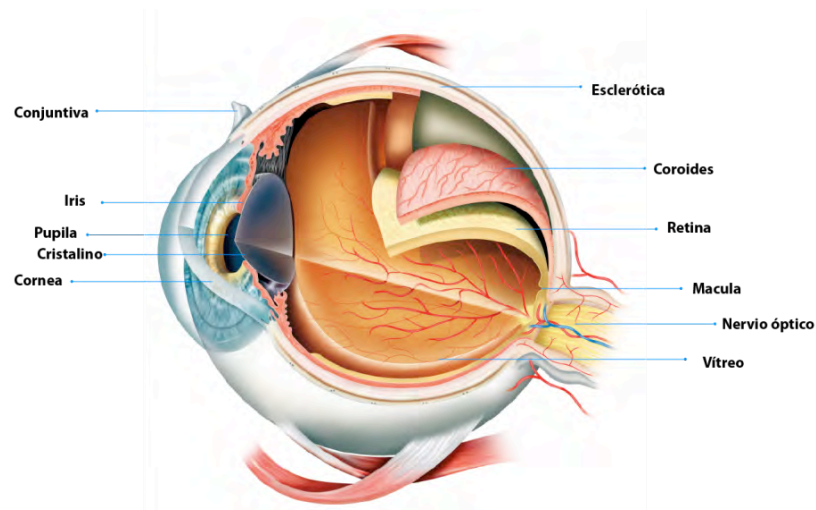
## II.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La RD es una de las principales causas de ceguera en personas en edad laboral. Las terapias usadas hasta el momento tienen limitaciones y hacen necesario la búsqueda de nuevas estrategias como el uso de vectores virales que permitan la expresión de un gen terapéutico por períodos prolongados. Dentro de los vectores virales más prometedores se encuentran los vectores derivados de AAV. Este proyecto investiga la terapia génica con vasoinhibinas en el control de la RD experimental. Su desarrollo tiene implicaciones sobre los alcances potenciales de la terapia génica en el padecimiento clínico y, en particular, sobre la terapia génica con vasoinhibinas en relación a otros factores antiangiogénicos más específicos (inhibidores del VEGF). El éxito de este estudio promoverá más investigación en torno al desarrollo de estos vectores para su uso clínico con el fin último de contar con estrategias terapéuticas efectivas para el control de la vasopermeabilidad excesiva y la angiogénesis patológica que caracteriza a la RD. Cabe mencionar también que este estudio reforzará la inclusión de las vasoinhibinas dentro del grupo de inhibidores con impacto en otros tipos de retinopatías vasoproliferativas (retinopatía del prematuro y degeneración macular asociada con la edad), pero también en otros padecimientos angiogénico-dependientes, como son el cáncer, la artritis reumatoide, la isquemia coronaria, la preeclampsia, etc. Finalmente, dado que las vasoinhibinas están presentes endógenamente, este estudio apoyará la importancia de estos péptidos tanto en la regulación normal de los vasos sanguíneos como de sus alteraciones patológicas.

#### III.1.SISTEMA OCULAR

##### III.1.1 DESCRIPCIÓN ANATÓMICA BÁSICA

El ojo es el principal órgano de la visión. Cada uno de los globos oculares se encuentran localizados en la órbita, donde ocupan alrededor de una quinta parte del volumen de esta y tienen la función de proteger los ojos de traumas mecánicos; el resto del espacio de la órbita está ocupado por los músculos extraoculares, tejido graso, vasos sanguíneos, nervios y la glándula lacrimal. El ojo humano tiene alrededor de 24 milímetros de diámetro, y como puede observarse en la figura 1, está organizado según su posición anatómica, en el segmento anterior y el posterior, separados por la línea divisoria justo detrás del cristalino. Dentro del segmento anterior se encuentran: la córnea, el iris, la pupila, el cristalino, el cuerpo ciliar, y la porción anterior de la esclerótica o esclera así como la cámara anterior (que contiene al humor acuoso). El segmento posterior es ligeramente más grande e incluye al vítreo, la retina, la mácula, el nervio óptico y la porción posterior de la esclera (Figura 1).



**Figura 1.-Esquema de la sección de un ojo humano mostrando sus diferentes componentes**  
Modificado de Kolb 1995 <sup>17</sup>.

### III.1.2 LA RETINA

#### III.1.2.1 Anatomía y morfología general de la retina

El fondo ocular es la parte visible en el examen oftalmoscópico. El fondo de ojo incluye a la retina y sus grandes vasos así como al nervio óptico<sup>18</sup>. La retina es una capa fina y transparente que se desarrolla a partir de las capas internas y externas de la copa óptica durante el desarrollo embrionario<sup>19</sup>. La organización histológica de la retina comprende nueve capas (Figura 2), denominadas en conjunto como retina neurosensorial y un epitelio pigmentario. Las capas de la retina neurosensorial desde la parte interna (que bordea al vítreo) hacia la parte externa son: 1) la membrana limitante interna <sup>20</sup>, formada por las partes terminales de las células de Müller; 2) la capa de fibras nerviosas <sup>21</sup>, formada por axones de las células ganglionares; 3) la capa de células ganglionares (CCG), formada por los cuerpos celulares de las neuronas ganglionares; 4) la capa plexiforme interna (CPI), formada por axones de células bipolares, células amacrinas y dendritas de células ganglionares y sus sinapsis; 5) la capa nuclear interna (CNI), formada por los núcleos de las células bipolares, células de Müller, células horizontales y células amacrinas; 6) la capa plexiforme externa (CPE) <sup>22</sup>, formada por la interconexión de fotorreceptores y células bipolares y horizontales; 7) la capa nuclear externa (CNE); 8) la membrana limitante externa <sup>23</sup>, 9) capa de fotorreceptores (CFR); y el epitelio pigmentario de la retina (EPR) <sup>19, 24</sup>. En la parte mas periférica de la retina encontramos a la *ora serrata*, estructura formada de la unión entre la retina y la *pars plana* (área estrecha ubicada entre el iris y la coroides). El fondo de ojo posee un color rojizo dado por la transmisión de luz reflejada por la esclera posterior hacia los vasos capilares de la coroides<sup>25</sup>.

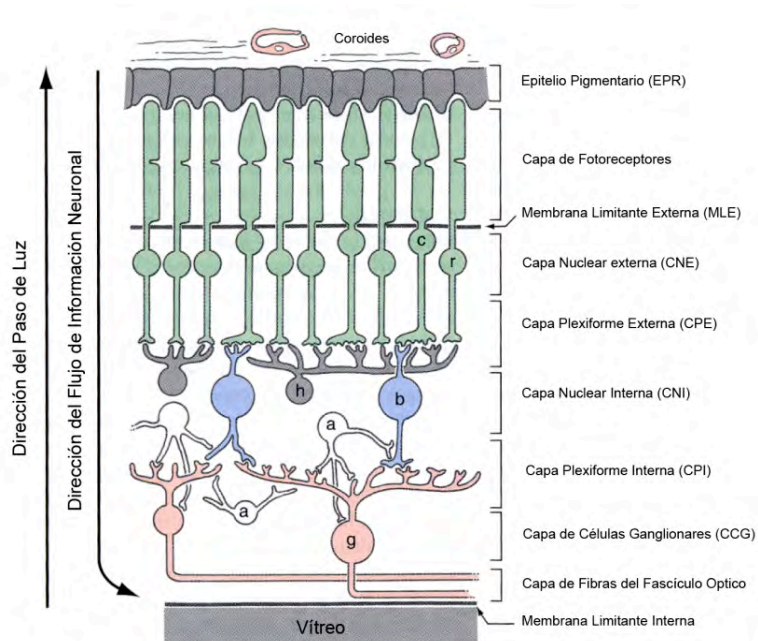
La retina neurosensorial está compuesta por elementos neuronales, gliales y vasculares <sup>26</sup>. Dentro de los elementos neuronales encontramos a los fotorreceptores que son células neuroepiteliales altamente especializadas, los conos y los bastones. En el ojo humano existen aproximadamente seis millones de conos y 120 millones de bastones. Cada una de estas células posee un segmento externo y un segmento interno <sup>27</sup>. Los

segmentos externos tanto de conos como de bastones, se encuentran rodeados por una matriz de mucopolisacáridos y hacen contacto con los procesos apicales del EPR<sup>28</sup>. Los segmentos externos de los bastones contienen múltiples discos en una disposición laminada que semeja una pila de monedas. Los segmentos internos de los bastones están subdivididos a su vez, en dos elementos adicionales: un elipsoide externo el cual contiene un gran número de mitocondrias y un mioide interno, el cual contiene una gran cantidad de glucógeno<sup>24</sup>. El mioide se continúa con el cuerpo celular principal que es donde se encuentra el núcleo. En el extremo interno de la célula se encuentra el cuerpo sináptico o esférula del bastón, la cuál está formada por una invaginación que se une con los procesos de dos células horizontales y una o más dendritas centrales pertenecientes a una célula bipolar<sup>19</sup>.

Los segmentos externos de los conos poseen una morfología distinta dependiendo de su localización en la retina. Los conos extrafoveales tienen elipsoides y mioides de forma cónica y su núcleo tiende a estar más cercano a la MLE en comparación con el núcleo de los bastones<sup>19</sup>. Los segmentos externos de los conos contienen también discos, sin embargo, a diferencia de los segmentos externos de los bastones, los discos en los conos se encuentran unidos a la membrana celular. El cuerpo sináptico de los conos, también llamado pedículo, se une a otros conos y a bastones, así como a células horizontales y procesos de células bipolares. Las células horizontales hacen conexiones sinápticas con varias esférulas de bastones<sup>19</sup> y con pedículos de conos y extienden sus procesos horizontales a través de la capa plexiforme externa. Las células, bipolares se encuentran orientadas verticalmente<sup>26</sup>, sus dendritas hacen sinapsis con bastones o con conos y sus axones hacen a su vez sinapsis con células ganglionares y células amacrinas en la capa plexiforme interna<sup>19</sup>. Los axones de las células ganglionares se flexionan y se disponen en una forma paralela a la superficie interna de la retina y forman la capa de fibras nerviosas y posteriormente los axones del nervio óptico<sup>26</sup>. Cada nervio óptico posee cerca de un millón de fibras. Las fibras nerviosas de la retina temporal siguen un trayecto arqueado alrededor de la macula y entran en el polo superior e inferior del nervio

óptico. Las fibras nerviosas procedentes de la fóvea poseen un trayecto directo hacia el nervio óptico denominándose haz papilomacular <sup>18</sup>.

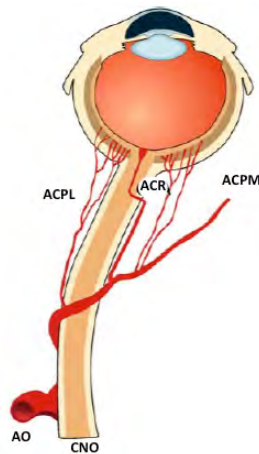
Dentro de los elementos gliales se encuentran las células de Müller que se extienden de forma vertical desde la MLE hacia la MLI. Su núcleo se encuentra localizado en la CNI<sup>27</sup>. Estas células, en conjunto con otros elementos gliales, como astrocitos protoplásmicos y astrocitos fibrosos, proveen soporte estructural y nutrición a la retina. Estudios de inmunohistoquímica han mostrado que éstas células contienen proteínas de unión a retinaldeído, taurina, glutamina y glutamina sintetasa. También son responsables en la degradación de neurotransmisores como glutamato y ácido gamma-aminobutírico (GABA) <sup>29</sup>.



**Figura 2.- Células y capas de la retina.** Fotorreceptores (conos [c], y bastones [r]) se muestran en verde. Células Horizontales, (h) en color gris, células bipolares, (b) en azul, reciben la información de los fotorreceptores, y hacen contacto con las células amacrinas, (a) en blanco, y células ganglionares, (g) en rosa (Modificado de Haines 2006) <sup>30</sup>.

### III.1.2.2 Irrigación ocular

El ojo humano está perfundido por dos sistemas vasculares, los vasos retinianos y los uveales. La úvea que es la capa vascular del ojo que se encuentra debajo de la esclera, está compuesta por el iris, el cuerpo ciliar y la coroides. Las capas externas de la retina donde se encuentran los fotorreceptores son avasculares reciben aporte sanguíneo y nutrientes a partir de la coroides, mientras que la capa interna de la retina del cual forma parte las células ganglionares se nutren a partir de los vasos de la retina interna. Alrededor del 65% del oxígeno que se utiliza en la retina proviene de la coroides. En humanos tanto la vasculatura retiniana como la coroides provienen de ramas de la arteria oftálmica, (Figura 3) <sup>31</sup>.



**Figura 3.- Irrigación sanguínea del ojo.** Cabeza del Nervio Óptico (CNO), Arteria Oftálmica (AO), Arteria Ciliar Posterior Larga (ACPL), Arteria Ciliar Posterior Media (ACPM), Arteria Central de la Retina (ACR) (Modificado de Joussem A. M. et al 2007) <sup>32</sup>

### III.1.2.3 Vasculatura de la retina

La retina es un tejido que se caracteriza por su alta densidad celular; donde existe un arreglo intrincado de neuronas y otros tipos celulares por lo cual es necesario contar con un sistema vascular altamente especializado para cumplir con las demandas metabólicas sin comprometer el espacio extracelular. Este espacio debe ser ideal para la neurotransmisión, fototransmisión y en el cual existe una compleja interacción de metabolitos, factores de crecimiento y agentes vasoactivos.



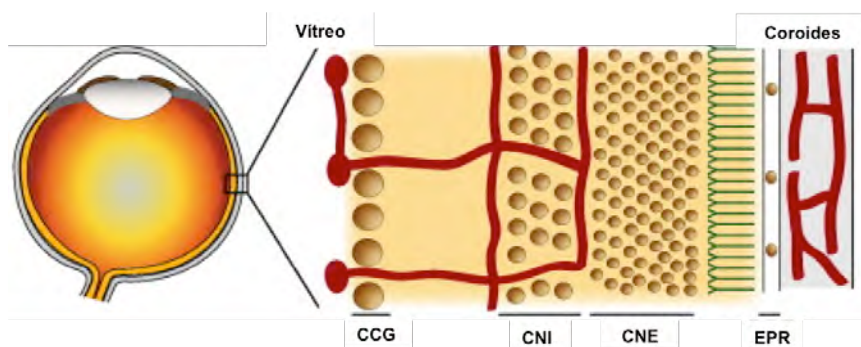
De manera más específica, la porción interna de la retina se encuentra perfundida por ramas de la arteria central de la retina; en el 30% de los ojos, una arteria denominada cilioretiniana, que proviene de la circulación ciliar, también se encarga de irrigar la parte interna de la retina<sup>33</sup>. Adicionalmente la arteria cilioretiniana contribuye a la circulación de la mácula. Los vasos sanguíneos de la retina son análogos a los vasos sanguíneos cerebrales en cuanto a que conforman una barrera fisiológica que regula el flujo de agua, iones y proteínas en la retina, la barrera hemato-retiniana (BHR). Esta barrera es vital para el establecimiento y mantenimiento de las concentraciones de iones y substratos específicos de la retina neural que permiten su funcionamiento adecuado. La BHR contiene tanto componentes internos como externos, que son indispensables también para mantener al ojo como un órgano inmunológicamente privilegiado<sup>34</sup>.

La BHR interna está conformada por una capa no fenestrada de células endoteliales que forman los lechos capilares (localizados en la capa de células ganglionares y la capa plexiforme externa de la retina). Por su parte la BHR externa está conformada por el epitelio pigmentario de la retina que forma una barrera entre el plexo capilar coroideo y la retina<sup>35</sup>. Las células de la BHR externa poseen uniones tipo estrechas que son impermeables a sustancias marcadoras como la fluoresceína o la peroxidasa de rábano. Una lámina basal cubre la parte externa del endotelio<sup>24</sup>. Por fuera de la membrana basal está presente una capa interrumpida de pericitos, que son células de sostén. Las terminaciones de las células de Müller y otros elementos gliales están generalmente adosados a la lámina basal de los vasos sanguíneos retinianos. Los vasos sanguíneos retinianos carecen de lámina elástica interna y de la capa de músculo liso que se encuentran en otros vasos en el resto del cuerpo<sup>36</sup>. Ocasionalmente se pueden observar células de músculo liso en los vasos cercanos al nervio óptico. Los vasos sanguíneos de la retina normalmente no se extienden más allá de la parte intermedia de la MLI. En el lugar donde las arterias y las venas se entrecruzan, éstas comparten una membrana basal común<sup>33</sup>.

Las arterias y venas permanecen en la capa de fibras nerviosas de la retina, mientras que las arteriolas y vénulas se extienden a las capas más profundas de la retina, formando de este modo dos principales redes microvasculares: (1) capilares superficiales en las capa de células ganglionares y la capa de fibras nerviosas y (2) capilares más densos y profundos en la capa nuclear interna <sup>37</sup> (Figura 4). En las regiones perifoveales y periféricas de la retina, estas redes microvasculares se adelgazan y únicamente forman una sola capa.

La coroides, otro elemento primordial en la vascularización del ojo y la retina, recibe irrigación por dos sistemas arteriales diferentes: (1) las arterias ciliares posteriores cortas que aportan el riego sanguíneo a la coroides posterior y (2) las arterias ciliares posteriores largas que proveen irrigación a la porción anterior de la coroides. La principal función de la vasculatura coroidea es la de proveer nutrientes y oxígeno a la región externa de la retina.

Los capilares retinianos tienen un calibre pequeño de alrededor de 5-7  $\mu\text{m}$ , a diferencia del calibre mayor de los capilares coroideos  $>10 \mu\text{m}$ . Otra característica importante de los capilares de la retina es que en comparación de cualquier otro lecho vascular en el cuerpo, tienen la mas alta densidad de pericitos alcanzando una relación 1:1 con las células endoteliales. Dado que los pericitos tienen capacidad contráctil pueden modificar el tono vascular y resistencia del flujo sanguíneo como respuesta a diferentes factores circulantes vasoactivos <sup>38</sup>.



**Figura 4.- Esquema de la vasculatura retiniana.** Se observa la coroides en contacto íntimo con el epitelio pigmentario de la retina que provee nutrientes y oxígeno principalmente a los fotorreceptores; así como los plexos capilares retinianos; el interno localizado en la

capa nuclear interna, y el externo en la capa de células ganglionares y capa de fibras nerviosas. (Modificado de Xin Ye 2010) <sup>39</sup>.

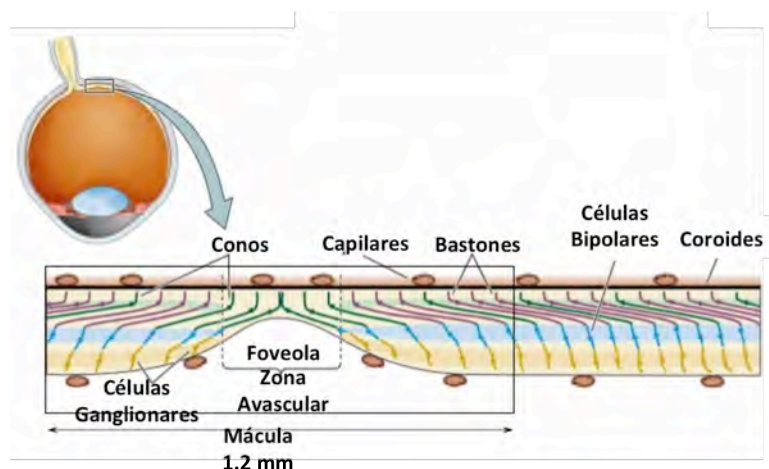
#### **III.1.2.4 Epitelio pigmentario de la retina (EPR)**

El epitelio pigmentario de la retina consiste en una sola capa de células hexagonales que se extiende anteriormente desde el nervio óptico a la ora serrata donde se une con el epitelio pigmentario del cuerpo ciliar, tiene diversas funciones que incluyen: (1) el metabolismo de vitamina A; (2) formar la barrera hematorretiniana externa; <sup>31</sup> reducir la dispersión de la luz; (4) fagocitar los segmentos externos de los fotorreceptores; (5) transportar activamente los materiales hacia dentro y hacia afuera de la retina<sup>28</sup>. El lado basal de las células del EPR se encuentra plegado y brinda una superficie grande para la unión a la lámina interna de la membrana de Bruch. El lado apical de las células del EPR poseen numerosas vellosidades que se unen a los segmentos externos de los fotorreceptores. Las células del EPR se unen entre sí por medio de la *zonulae occludens* y de la *zonulae adherens* <sup>40</sup>. La retina posee diversos grosores, dependiendo de su localización. La porción de mayor grosor se localiza en el haz papilomacular donde mide 0.23mm y la porción mas delgada se encuentra en la foveola donde mide 0.10mm <sup>41, 42</sup>. El citoplasma de las células del EPR contiene numerosas mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi, un núcleo grande ovalado, y melanosomas, los cuales son gránulos que contienen pigmento <sup>28</sup>.

#### **III.1.2.5 Mácula**

Si dividimos a la retina por regiones, la mácula lútea (Figura 5), que es la parte central de la retina humana, mide 5-6mm de diámetro y se encuentra entre las arcadas vasculares temporales. Se le ha denominado así debido a la coloración amarilla que presenta, dada por la presencia de pigmento carotenoide localizado en la capa plexiforme externa<sup>24</sup>. Dos pigmentos principales han sido localizados en éste sitio, luteína y zeaxantina y sus proporciones varían con respecto a la distancia de la fovea. El radio luteína-zeaxantina es 1:2.4 en el área central (dentro de 0.25mm de la fovea) y mayor a 2:1 en la periferia (2.2 - 8.7 mm de la fovea). La luteína se encuentra más concentrada en

áreas con mayor concentración de bastones, como en la periferia y la zeaxantina se encuentra más concentrada en áreas con mayor densidad de conos<sup>20</sup>. La fovea es un área cóncava localizada en el centro de la mácula, de 1.5mm de diámetro aproximadamente. Alrededor de la fovea se encuentra la parafóvea, con 0.5mm de ancho, donde la capa de CG, CNI y la capa PLE presentan mayor espesor. Rodeando ésta área se encuentra la región más periférica de la mácula llamada perifóvea. La depresión central de la fovea se denomina foveola, está localizada aproximadamente a 4.0mm temporal y 0.8mm inferior al centro del nervio óptico<sup>41</sup>. En la foveola únicamente se encuentran conos, siendo ésta área la responsable de la agudeza visual de alta resolución<sup>27</sup>.



**Figura 5.-** Esquema de la retina mostrando las regiones de la mácula y foveola.

## III.2.RETINOPATÍA DIABÉTICA (RD)

### III.2.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA

#### III.2.1.1 Prevalencia e incidencia de la diabetes y la RD

La diabetes es una enfermedad metabólica crónico-degenerativa que ha alcanzado magnitudes epidémicas; tanto en países desarrollados como no-desarrollados. La prevalencia de esta enfermedad ha ido en aumento, ello debido al incremento en el sobrepeso/obesidad, la esperanza de vida y en los métodos de detección de la enfermedad. Para el año 2014 la Federación Internacional de Diabetes reportó que el número de personas que sufren diabetes es de 415 millones a nivel mundial<sup>43</sup>, con una prevalencia de 8.3%<sup>44</sup>. Se calcula que cada 9.9 segundos una persona en el mundo

desarrolla diabetes, que es una cifra realmente alarmante. En el caso particular de México se ha estimado que la prevalencia nacional de diabetes es de 11.92%, ocupando el sexto lugar de países con el mayor número de personas con esta enfermedad (Tabla 1). Adicionalmente, se prevé que para el año 2035 esta cantidad aumentará como se puede observar en la Tabla 2, México ocuparía ahora el quinto lugar con 15.7 millones de personas con diabetes.

**Tabla 1.** Primeros 10 Países /Territorios con mayor número de personas con diabetes en 2013 <sup>44</sup>.

País/Territorio	Millones
China	98.4
India	65.1
Estados Unidos de América	24.4
Brasil	11.9
Rusia	10.9
<b>México</b>	<b>8.7</b>
Indonesia	8.5
Alemania	7.6
Egipto	7.5
Japón	7.2

**Tabla 2.** Proyección primeros 10 Países/Territorios con mayor número de personas con diabetes para 2035<sup>44</sup>.

País/Territorio	Millones
China	142.7
India	109.0
Estados Unidos de América	29.7
Brasil	19.2
<b>México</b>	<b>15.7</b>
Indonesia	14.1
Egipto	13.1
Pakistan	12.8
Turquía	11.8
Rusia	11.1

Así mismo la Organización Mundial de la Salud <sup>21</sup> anticipa que la diabetes será la séptima causa de muerte para el año 2030. La diabetes aumenta los riesgos de desarrollar una amplia gama de complicaciones irreversibles<sup>45</sup>, las cuales se clasifican en macrovasculares y microvasculares. Dentro de las complicaciones macrovasculares se encuentran la enfermedad arterial coronaria, la enfermedad cerebrovascular y la arterial obstructiva periférica. Las complicaciones microvasculares de la diabetes son: la retinopatía diabética (RD), la neuropatía diabética y la nefropatía diabética.

Del estimado total de personas que sufren diabetes, aproximadamente un tercio de ellos presentan síntomas de RD <sup>46,47</sup>. Se calcula que 93 millones de personas tienen RD, 17 millones con retinopatía diabética proliferativa (RDP) y 21 millones presentan Edema Macular Diabético (EMD)<sup>21</sup> a nivel mundial.

### III.2.1.2 Factores de riesgo involucrados en el desarrollo de la RD

Diversos estudios epidemiológicos señalan los efectos que tienen diversos factores de riesgo con acciones sobre la incidencia y progresión de la retinopatía diabética (Tabla 3), dentro de los que destacan la hiperglucemia, la hipertensión, la dislipidemia y la inflamación<sup>46, 48</sup>.

**Tabla 3.- Factores de riesgo para el desarrollo de la retinopatía diabética (Modificado de Wong 2016) <sup>1</sup>**

<p><b>Factores de riesgo comunes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ <b>Hiperglucemia:</b> Una reducción sérica del 1% en la hemoglobina glicosilada se asocia con una reducción del 35% en el riesgo de desarrollar RD, 15-25% reducción de la progresión de la RD y hasta un 15% de reducción en el riesgo de ceguera <sup>49-51</sup>.</li> <li>⇒ <b>Hipertensión:</b> Una reducción en la presión sanguínea sistólica de 10mm de HG se asocia con un 40-50% de reducción en la progresión de la RD <sup>49, 52</sup>.</li> <li>⇒ <b>Duración de la diabetes:</b> la duración de esta enfermedad <math>\geq 20</math> años está asociado con el desarrollo de la RD en 50-90% de los pacientes <sup>53</sup>.</li> <li>⇒ <b>Nefropatía:</b> la aparición de la nefropatía diabética va de la mano con el desarrollo de la RD <sup>2</sup>.</li> </ul>
<p><b>Factores de riesgo menos establecidos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ <b>Dislipidemia.</b></li> <li>⇒ <b>Obesidad.</b></li> <li>⇒ <b>Factores genéticos.</b></li> </ul>

Independientemente del tipo de diabetes el riesgo de desarrollar RD se incrementa de manera directa con la duración de la diabetes. Alrededor del 25% de los pacientes con diabetes tipo 1 muestran algún daño a la retina, esta incidencia aumenta hasta alcanzar

casi el 60% después de 5 años de presentar el padecimiento y puede llegar hasta el 80% después de 10 a 15 años de sufrir diabetes<sup>54</sup>.

### **III.2.2 CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA**

La retinopatía diabética es una enfermedad que afecta predominantemente la integridad de la microvasculatura de la retina como resultado de la exposición prolongada a cambios metabólicos inducidos por la diabetes. Es la principal causa de ceguera en adultos en edad laboral, la cual puede ocurrir a través de dos vías: el crecimiento de nuevos vasos que pueden llevar a hemorragias intraoculares y desprendimiento de la retina ocasionado por la tracción que pueden generar estos neovasos; y daño localizado en la mácula del ojo con la consecuente pérdida de la agudeza de la visión central.

La RD es una enfermedad progresiva, posee distintas características en el fondo de ojo que permiten distinguirla<sup>5</sup> (Tabla 4). Existen hallazgos clínicos como son los microaneurismas, los cuales son pequeñas dilataciones saculares que afectan a los capilares y constituyen el signo más temprano en la retinopatía diabética<sup>55</sup>. Las hemorragias ocurren a distintos niveles de la retina y éstas se clasifican en superficiales o profundas adoptando la forma del espacio extravascular que ocupan<sup>5</sup>. Las hemorragias superficiales son en forma de llama y se localizan en la capa de fibras nerviosas en comparación con las hemorragias profundas las cuales son redondeadas y se localizan entre las capas plexiforme externa y nuclear interna<sup>5, 56</sup>. Otro hallazgo clínico es el desarrollo de exudados duros que son depósitos de lípidos ocasionados por el aumento de permeabilidad vascular, aparecen como depósitos blanco amarillentos principalmente localizados en el área macular<sup>55</sup>. Adicionalmente pueden aparecer los denominados exudados blandos que son de aspecto blanquecino y se localizan superficialmente en la capa de fibras nerviosas, se producen como resultado de la isquemia retiniana<sup>57</sup>. Puede observarse además otros signos de la RD como es el caso del arrosamiento venoso que corresponden a vénulas retinianas con zonas sucesivas de dilatación y estenosis. También durante la progresión de la RD se pueden desarrollar anomalías microvasculares intrarretinianas, las cuales son segmentos vasculares de la red capilar dilatados y

tortuosos, aparecen alrededor de zonas de no perfusión y se suelen localizar rodeando a los exudados blandos <sup>5</sup>. Finalmente, la falta de perfusión adecuada de oxígeno en la retina provoca la aparición de nuevos vasos sanguíneos, los cuales son capilares sin uniones estrechas entre sus células endoteliales <sup>56</sup>.

**Tabla 4.-** Clasificación de la retinopatía diabética según su nivel y características

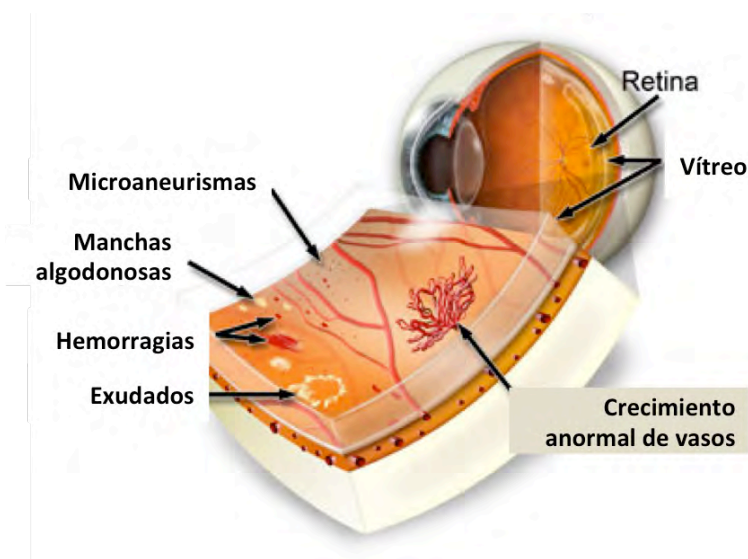
Retinopatía Diabética	Hallazgos clínicos observables en la oftalmoscopia con dilatación pupilar	Seguimiento
Sin retinopatía aparente	Sin anomalías	1 -2 años, optimizar control metabólico
Retinopatía diabética no proliferativa leve	Únicamente microaneurismas	1 año, optimizar control metabólico
Retinopatía diabética no proliferativa moderada	Mayor que la retinopatía diabética no proliferativa leve y menor en comparación a la retinopatía diabética no proliferativa severa	6 meses - 1 año, optimizar control metabólico
Retinopatía diabética no proliferativa severa	Una de las siguientes: hemorragias en retina en los cuatro cuadrantes, rosarios venosos en dos cuadrantes, e IRMA en 1 cuadrante	REGLA 4x2x1 Derivación para fotocoagulación
Retinopatía diabética no proliferativa post fotocoagulación	Cicatriz post láser: 3 meses. Detectar presencia de neovascularización	Evaluar la necesidad de mas láser
Retinopatía diabética proliferativa sin signos de alto riesgo	Presencia de neovasos en uno a cuatro cuadrantes y menos de 1/3 de papila	Derivación para fotocoagulación
Retinopatía diabética proliferativa con signos de alto riesgo	Presencia de neovasos en mas de 1/3 de papila, hemorragia preretinal o vítrea	Derivación para panfotocoagulación y/o vitrectomía
Retinopatía diabética proliferativa post fotocoagulación	Cicatriz post láser 3 meses: detectar presencia de neovascularización	Evaluar tratamiento láser o vitrectomía
Retinopatía diabética difícil de clasificar	No es posible de clasificar: opacidad de medios (cristalino, vítreo, córnea).	Derivación con retinólogo
Edema macular	Edema macular dentro de un diámetro de disco del centro de la fovea	Láser, inyección de medicamento intravítreo o vitrectomía

IRMA, Anomalías microvasculares intraretinianas. La regla 4x2x1 consiste en encontrar hemorragias y/o microaneurismas en **4** cuadrantes, rosarios venosos en **2** cuadrantes así como IRMAs en **1** cuadrante.

La retinopatía diabética pueden ser clasificada en dos grados : 1) RD no proliferativa la cuál es la fase mas temprana y su reconocimiento permite una predicción del riesgo de pérdida de agudeza visual, 2) retinopatía diabética proliferativa, la cual representa una fase severa de la RD y consiste en una respuesta angiogénica de la retina



ante la isquemia y el cierre capilar ocasionados por la elevación sistémica de glucosa<sup>58</sup>. Por su localización, la neovascularización retiniana ha sido dividida en dos grupos, cuando los neovasos se encuentran sobre el nervio óptico (NVD) y cuando los neovasos se encuentran en una región distinta al nervio óptico<sup>59</sup> 5.



**Figura 6.- Esquema de un ojo con retinopatía diabética proliferativa (RDP).** Se pueden observar las principales anomalías que presentan los pacientes en esta etapa de la enfermedad.

Se han propuesto varias clasificaciones para reflejar la evolución natural de la retinopatía diabética. La clasificación más utilizada es la Clasificación Internacional de Retinopatía Diabética<sup>5</sup> (Tabla 3). Por otra parte, el EMD es una importante complicación que se evalúa independientemente, ya que puede estar relacionado con cualquier grado de RD<sup>60</sup>. Es importante mencionar que el EMD temprano puede ocasionar una reducción en la agudeza visual de magnitud variable<sup>55</sup>.

### III.2.3 MECANISMOS Y MOLÉCULAS INVOLUCRADOS EN LA PROGRESIÓN DE LA RD

El conocimiento actual que se tiene sobre la fisiopatología de la RD muestra que es una enfermedad altamente compleja y multifactorial, que involucra la activación de una gran cantidad de vías de señalización interrelacionada, que eventualmente convergen en mecanismos claves como el estrés oxidativo, aumento de factores pro-inflamatorios e

incremento en la secreción de VEGF todo esto derivado de un desarreglo metabólico causado por la Diabetes Mellitus (DM). Adicionalmente la DM produce también cambios nocivos en la concentración de neurotransmisores y factores neuroprotectores en la retina. El resultado final de esta serie de modificaciones es el daño a los componentes vasculares y neuronales de la retina que se evidencian en la aparición del cuadro clínico de la RD <sup>61</sup>.

La evidencia clínica apunta a que la RD es un padecimiento predominantemente vascular, de ahí que gran parte del trabajo de investigación se enfocó inicialmente a este componente. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que también existen cambios tempranos que afectan la funcionalidad de todos los componentes tanto vasculares como neuronales. Estudios recientes muestran que la neurodegeneración está involucrada en los cambios microvasculares tempranos que ocurren durante la RD como la ruptura de la barrera hematoretiniana (BHR) (donde la excitotoxicidad mediada por glutamato estimula la liberación de VEGF) <sup>62</sup>.

Uno de los eventos patogénicos determinantes en el inicio de la RD es la ruptura de la BHR. El mecanismo principal que se ve afectado es el cambio en las características de las células endoteliales de la retina provocado por el desbalance en múltiples vías metabólicas desencadenadas por la hiperglucemia crónica, que incluyen la vía de los polioles, la de la hexosamina <sup>63</sup>, la síntesis de novo de diacilglicerol vía la sobreactivación de la proteína cinasa C <sup>64, 65</sup>, la producción de radicales libres y productos terminales de glicosilación avanzada (AGEs por sus siglas en inglés) <sup>66</sup>; todos tienen un papel central en la patogénesis de la RD <sup>4</sup>. Otros mecanismos adicionales de los que se ha obtenido evidencia que participan en el desarrollo de la RD son: la activación del sistema renina-angiotensina (RAS por sus siglas en inglés), la neurodegeneración, la neuroinflamación <sup>62, 67, 68</sup> y el estrés del retículo endoplásmico <sup>69</sup>. A continuación se describirán las principales vías involucradas en la progresión de la RD.

### **III.2.3.1 Producción intracelular de precursores de productos terminales de la glicosilación avanzada.**

Los AGEs productos terminales de glicosilación avanzada (del inglés "advanced glycation end products") son un grupo complejo de compuestos que se forman a través de reacciones no enzimáticas entre azúcares reducidos y residuos de amina de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. El papel de los AGEs en la fisiopatología de la RD se ha puesto en evidencia mediante trabajos donde se ha demostrado que en el vítreo existen niveles elevados de estas moléculas en etapas avanzadas de la RD <sup>70-72</sup>. Adicionalmente se ha demostrado la importancia de los AGEs en modelos animales, donde al inhibir la producción de estos compuestos es posible prevenir parcialmente algunas manifestaciones de alteraciones microvasculares ocasionadas por la diabetes en los nervios, riñones y retina <sup>73-75</sup>. La producción de los AGEs puede producir daño celular a través de al menos 3 mecanismos generales: (1) modificando y alterando la función de proteínas intracelulares, dentro de las que se encuentran las involucradas en la regulación de la transcripción génica <sup>76,77</sup>; (2) difundiendo fuera de la célula e interfiriendo con la estructura y funcionalidad de proteínas de la matriz extracelular <sup>78, 79</sup> y <sup>31</sup> alterando a proteínas de la circulación sanguínea como la albúmina. Las proteínas alteradas se pueden unirse a receptores de AGEs que se localizan en diversos tipos celulares y promover la producción de citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento, que a su vez inducen alteraciones vasculares <sup>80-82</sup>.

### **III.2.3.2.Vía de biosíntesis de la hexosamina.**

Evidencias recientes sugieren que el metabolismo de la glucosa ocurre a través de la vía de biosíntesis de la hexosamina (HBP por sus siglas en inglés "hexosamine biosynthesis pathway") es responsable en parte de la resistencia a la insulina y la subsecuente RD <sup>83</sup>. Una vez dentro de la célula, la glucosa se convierte en glucosa-6-fosfato que es transformada a su vez en fructosa-6-fosfato. Bajo condiciones normales de glucemia, solo una pequeña porción de la glucosa es metabolizada por esta vía. Sin embargo, en condiciones de hiperglicemia, la vía de biosíntesis de la hexosamina está sobreactivada con el propósito de

consumir el exceso de fructosa-6-fosfato formado<sup>84</sup>. El paso inicial y limitante en la vía HBP es la conversión de fructosa-6-fosfato a N-acetilglucosamina-6-fosfato el cual se lleva a cabo por la enzima glutamina fructosa 6-fosfato amidotransferasa<sup>85</sup>. El flujo de la glucosa a través de esta vía lleva a la formación de uridina difosfato n-acetilglucosamina, que es el sustrato para la O-glicosilación en residuos de serina o treonina de una gran cantidad de proteínas provocando cambios en la expresión de genes y modificando la función de las proteínas afectando negativamente la retina<sup>86, 87</sup>. Estudios previos han demostrado el efecto protector de la inhibición de la vía HBP<sup>88</sup>, usando por ejemplo benfotiamina que actúa convirtiendo la fructosa-6-fosfato a pentosa-5-fosfato.

### **III.2.3.3.Vía de los polioles o del sorbitol.**

En personas que no padecen diabetes el exceso de glucosa se metaboliza por la vía glucolítica y por la vía de las pentosas. En el caso de los diabéticos, estas vías se encuentran saturadas por lo que el exceso de glucosa se metaboliza a través de vías alternativas como la vía de la hexosamina descrita anteriormente; y por la vía de los polioles, también conocida como la vía del sorbitol. En esta última, la enzima aldosa reductasa, reduce la glucosa produciendo sorbitol que más tarde es convertido a fructosa. En ese proceso, la aldosa reductasa utiliza la coenzima NADPH, cuya concentración es vital para la generación de un antioxidante intracelular muy importante, el glutatión reducido. Al tener baja concentración de glutatión reducido, las células se vuelven muy susceptibles al estrés oxidativo y el estrés oxidativo en etapas tempranas de la diabetes produce la disfunción de las células endoteliales. De hecho, se ha demostrado que inhibidores de la aldosa reductasa disminuyen la presencia de microaneurismas en la retina de pacientes diabéticos<sup>89</sup>. Múltiples estudios han examinado el efecto protector de la inhibición farmacológica o genética de la aldosa reductasa obteniendo productos prometedores como es el caso del Fidarastat, cuyos efectos contra la RD han sido probados tanto in vitro como in vivo<sup>90, 91</sup>. Un reporte reciente demostró que el flujo de glucosa a través de la vía del sorbitol conlleva a la acetilación de histonas y a la expresión prolongada de genes relacionados con respuestas proinflamatorias en ratones diabéticos<sup>92</sup>. Estos estudios ponen en evidencia la importancia

de esta vía clásica involucrada en el daño celular debido a la hiperglucemia como un posible blanco terapéutico de la RD.

#### **III.2.3.4. Activación de la proteína cinasa C (PKC).**

La PKC es una cinasa de serina/treonina que está involucrada en la transducción de señales como respuesta a estímulos hormonales, neuronales y factores de crecimiento específicos. La alta concentración de glucosa dentro de la célula promueve un incremento en el flujo de glucosa por la vía de glicólisis que aumenta la síntesis de novo de diacilglicerol<sup>59</sup>, que es el activador fisiológico clave de la PKC<sup>93</sup>. Cuando la PKC es activada por la alta concentración de glucosa intracelular, tiene varios efectos en la expresión de genes que incluyen la estimulación de la expresión de la sintasa endotelial de óxido nítrico<sup>94</sup>, la endotelina-1 (ET-1), el VEGF, el factor transformante beta (TGF- $\beta$ ), el inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), etc. En general, la activación de la PKC por hiperglucemia favorece la expresión de factores relacionados con el daño celular mientras que disminuye la de factores relacionados con el mantenimiento de la función normal<sup>4</sup>.

Existen diez isoformas moleculares de la PKC, de las cuales (la isoforma  $\beta$ 1/2 se ha asociado con el desarrollo de la RD<sup>64</sup>. Investigaciones usando un inhibidor específico de la PKC- $\beta$  1/2, el LY333531 o ruboxistaurina mesilato (RBX) han demostrado resultados positivos reduciendo la leucostasis, un signo temprano de disfunción vascular, en pacientes diabéticos. La RBX es una droga bien tolerada que se ha usado ampliamente para el tratamiento de la RD tanto en modelos experimentales como en ensayos clínicos. Apartir de estos estudios se ha sugerido que la RBX reduce la progresión de la RD<sup>95-97</sup>. Este inhibidor de la PKC ha llegado a la fase 3 en dos ensayos clínicos diferentes; el estudio de la retinopatía diabética y PKC en el 2005<sup>98</sup> y el estudio de la PKC y el edema macular diabético en el año 2007<sup>99</sup>. A pesar de que esta droga ha demostrado reducir la pérdida visual en los pacientes, la inhibición de la PKC no es capaz de prevenir la RD<sup>100</sup>, no se ha podido trasladarse su uso a la práctica clínica rutinaria debido a que se desconocen posibles efectos adversos de la inhibición prolongada de esta vía sobre la fisiología normal.

### III.2.3.5. Estrés en el retículo endoplásmico.

El retículo endoplásmico (RE) es un organelo celular con múltiples funciones; entre las que destacan la síntesis, plegamiento y tráfico de proteínas. Se ha involucrado el estrés de este organelo en diferentes patologías incluyendo enfermedades neurodegenerativas y metabólicas<sup>43, 101, 102</sup>. El estrés en el RE se manifiesta cuando existe una perturbación en la capacidad de plegamiento de proteínas que realiza este organelo, esto ocasiona una acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE; la respuesta ante este estrés es la activación de una respuesta de proteínas no plegadas (UPR "unfolded protein response" por sus siglas en inglés). La respuesta UPR es iniciada por 3 diferentes transductores: la enzima que requiere inositol 1, el factor activador de transcripción 6 y la proteína cinasa tipo RNA del retículo endoplásmico. Cuando estas proteínas no son capaces de restablecer la homeostasis del RE se desencadena la muerte celular programada o apoptosis<sup>69, 103</sup>. Estudios *in vivo* e *in vitro* reportan que la hiperglicemia produce estrés en el RE en las células de Müller de la retina, esta respuesta se asocia además con la inducción de la expresión génica de factores como el VEGF y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1). Un dato muy interesante que surgió de estos estudios es que al aplicar periocularmente un inhibidor del estrés del RE, el ácido 4-fenil butírico, se disminuyó la expresión retiniana de VEGF y la permeabilidad vascular en ratones diabéticos<sup>104</sup>. Trabajos adicionales evaluando el efecto de inductores de estrés en el RE ocular demostraron que la inyección intravitreal de tunicamicina (un inductor de estrés en el RE) producía la sobre-expresión de VEGF, que se asocia con un incremento en la permeabilidad vascular<sup>105</sup>; además el tratamiento con tunicamicina en un modelo de retinopatía inducida por oxígeno provocaba la exacerbadón del cuadro neovascular en este modelo animal<sup>106</sup>. Estos hallazgos señalan la contribución que tiene el estrés en el RE durante la inflamación y problemas vasculares que se desarrollan en la retinopatía diabética.

### **III.2.3.6. Estrés oxidativo**

La hiperglicemia es un elemento clave en el desarrollo del cuadro patológico de la RD. Michael Brownlee propuso recientemente un mecanismo unificador por el cual se podría explicar el abanico de efectos que tiene la hiperglicemia crónica y este mecanismo es el incremento en el estrés oxidativo, dado a través de un incremento en la producción de superóxido a partir de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria <sup>63</sup>. La retina humana tiene un consumo de oxígeno entre 300-600% mayor que la corteza cerebral o el músculo <sup>39</sup>, de ahí que la retina y su vasculatura sea tan propensa al daño provocado por el estrés oxidativo. Se cree que el estrés oxidativo es un elemento río arriba que lleva al aumento en el flujo de las vías descritas anteriormente: la vía de los polioles, la producción intracelular de AGEs, la activación de la PKC y el incremento en la actividad de la vía de la hexosamina. La activación de todas estas vías de señalización provocan el aumento en la producción de moléculas pro-inflamatorias. El estrés oxidativo en los diabéticos se exacerba aún más debido a que hay una disminución de moléculas inhibitoras que contrarrestan el estrés oxidativo, como el glutatión, dejando a las células más vulnerables al daño. Evidencias provenientes tanto de modelos animales como muestras clínicas respaldan la importancia del estrés oxidativo en la RD <sup>107, 108</sup>. A pesar de toda la evidencia obtenida hasta el momento, los ensayos clínicos a gran escala probando el efecto de la terapia antioxidante no han tenido el impacto benéfico esperado en pacientes diabéticos <sup>59, 109</sup>.

### **III.2.3.7. Factores de crecimiento**

La importancia que tienen diversos factores de crecimiento en la progresión de la RD proviene tiempo atrás de evidencia clínica que raramente se observaban grados avanzados de este padecimiento en personas con enanismo producido por deficiencia de la hormona de crecimiento <sup>110</sup>. Además otros hallazgos obtenidos en los años 70's demostraron que la ablación de la hipófisis disminuía la progresión de la RD <sup>111, 112</sup>. Sin embargo, hasta ese momento no se conocía exactamente que factores eran los involucrados en los efectos observados. Actualmente existe una gran variedad de factores

de crecimiento que se han asociado con el desarrollo de la RD entre ellos se pueden incluir el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1)<sup>113, 114</sup>, la angiopoietina 1 y 2<sup>115-117</sup>, el factor de crecimiento epidérmico (EGF)<sup>118</sup>, el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF)<sup>119</sup>, el factor de crecimiento transformante beta 2 (TGF-β2)<sup>120</sup>, los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGFs)<sup>121</sup> y la eritropoyetina<sup>122</sup>.

El factor de crecimiento que ha recibido mayor atención en relación con su papel en la retinopatía diabética es el factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF. El VEGF existe en 4 especies homodiméricas distintas, cada monómero tiene respectivamente 121,165,189 o 206 aminoácidos<sup>123</sup>. Las funciones celulares del VEGF ocurren a través de la activación de dos receptores de membrana de unión a tirosinas cinasas<sup>124</sup>. La unión a estos receptores produce la activación de dos posibles vías de señalización: una vía que promueve la entrada de calcio intracelular mientras que la otra es la vía de activación de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK). Ambas vías están relacionadas con las diferentes acciones que tiene el VEGF, que incluyen la angiogénesis, la ruptura de la BHR (tanto del componente externo como del componente vascular interno), y la supervivencia de las células endoteliales<sup>94, 125, 126</sup>. Cabe aclarar que la cantidad y duración de la exposición al VEGF que se requiere para la ruptura de la BHR es menor que la necesaria para inducir la neovascularización<sup>127</sup>. El VEGF también funciona como una molécula pro-inflamatoria y sus niveles en el vítreo se encuentran directamente correlacionados con la neovascularización y el edema retiniano<sup>67</sup>.

### **III.2.4 TRATAMIENTO DE LA RD**

Las acciones iniciales para prevenir o detener la progresión de la RD son el control de los niveles de glucosa en sangre así como mantener niveles adecuados de la presión sanguínea. Sin embargo, muchos pacientes no son capaces de alcanzar los niveles óptimos recomendados por lo cual la RD suele progresar. Con el objetivo de minimizar la pérdida de visión en etapas avanzadas de la enfermedad se utilizan como estrategias la fotocoagulación laser, la vitrectomía y el uso de la farmacoterapia.



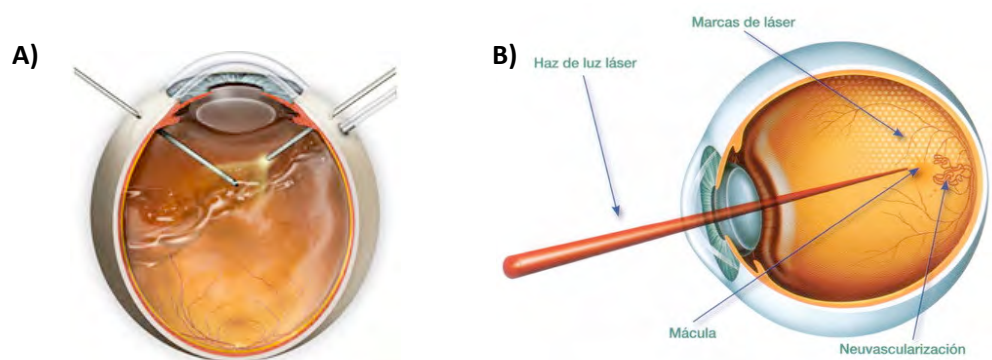
### III.2.4.1. Fotocoagulación láser y vitrectomía

La fotocoagulación láser ha sido por varias décadas el tratamiento estándar para el edema macular diabético así como para los casos de retinopatía diabética proliferativa<sup>31, 128</sup>. Este procedimiento consiste en hacer incidir un láser en la retina periférica provocando quemaduras que promueven la regresión de la neovascularización en las regiones tratadas con lo cual disminuye la posibilidad de que se produzcan hemorragias en el vítreo así como el desprendimiento por tracción de los neovasos de la retina. La fotocoagulación láser es un proceso térmico mediante el cual la energía luminosa es absorbida por los tejidos pigmentados y convertida en calor produciendo la desnaturalización proteica. El mecanismo de acción de la fotocoagulación láser no está del todo comprendido aún, pero han surgido varias hipótesis al respecto. Una de ellas propone que este procedimiento provoca la destrucción de una alta proporción de fotorreceptores (30%) de esta forma disminuye la demanda metabólica de oxígeno lo que contrarresta la hipoxia local y en consecuencia la producción de factores angiogénicos como el VEGF. Otra posibilidad es que el láser absorbido principalmente por la melanina que se encuentra en el epitelio pigmentario de la retina (EPR), provoque la muerte de algunas de estas células por la acción térmica<sup>129</sup> y puesto que estas células son una fuente importante de factores angiogénicos<sup>130</sup>, este estímulo disminuye la angiogénesis.

Las evidencias más importantes que sentaron el uso benéfico de la fotocoagulación láser para el tratamiento de la retinopatía diabética fueron obtenidas por dos ensayos clínicos distintos. El Estudio de Retinopatía Diabética (DRS por sus siglas en inglés) el cual demostró que la fotocoagulación láser focal reduce el riesgo de pérdida severa de la visión de un 33% a un 13.9% en pacientes con RD proliferativa o no proliferativa severa<sup>5</sup>. El otro es el Estudio del Tratamiento Temprano de la Retinopatía Diabética (ETDRS por sus siglas en inglés), el cual mostró que la fotocoagulación láser focal reduce el riesgo de pérdida de visión en pacientes con Edema Macular clínicamente significativo del 24% al 12% aunque no elimina del todo el riesgo<sup>5, 6</sup>. La fotocoagulación láser no está exenta de complicaciones y efectos colaterales. Debido a su naturaleza destructiva inherente, uno de sus efectos

adversos más frecuentes es la inducción de escotomas (formación de un punto ciego), también es posible el desarrollo de cicatrices, así como de aparición de neovascularización secundaria al tratamiento.

En etapas avanzadas, una gran cantidad de pacientes con retinopatía diabética proliferativa que no responden al tratamiento con fotocoagulación laser así como aquellas personas que llegan a presentar una pérdida visual severa debido a hemorragias vítreas y desprendimiento de la retina <sup>131</sup> deben someterse a un tratamiento quirúrgico, la vitrectomía (remoción del cuerpo vítreo). La vitrectomía consiste en remover una porción o todo el vítreo del ojo mediante succión y su substitución por gas (que se reabsorbe naturalmente dentro de las primeras 2-3 semanas), aceite (como el aceite de silicona; que no se absorbe y debe ser retirado quirúrgicamente en un futuro) o por combinaciones entre estos dos elementos. Conforme el gas es absorbido, el ojo va llenando la cámara vítreo con un fluido transparente, el humor acuoso.



**Figura 7. Principales tratamientos utilizados para la RD.** En A se muestra la extracción del cuerpo vítreo por succión durante la vitrectomía, en B se observa la fotocoagulación laser.

La vitrectomía es un procedimiento quirúrgico que no solo tiene el propósito de remover opacidades del ojo sino que también tiene el beneficio adicional de liberar la posible tracción vitreoretiniana que se genera durante la progresión de la RD. En no pocos casos de RD proliferativa la vitrectomía se combina con la fotocoagulación láser, de hecho esta última permite una separación menos traumática del vítreo. En los últimos años con

el advenimiento de nuevas técnicas así como avances en la instrumentación quirúrgica se ha mejorado los resultados en los pacientes a los que se les realiza esta intervención. No obstante un inconveniente que presenta esta cirugía es el aumento en el riesgo de formación de cataratas en alrededor de un 44% de los pacientes<sup>8</sup>.

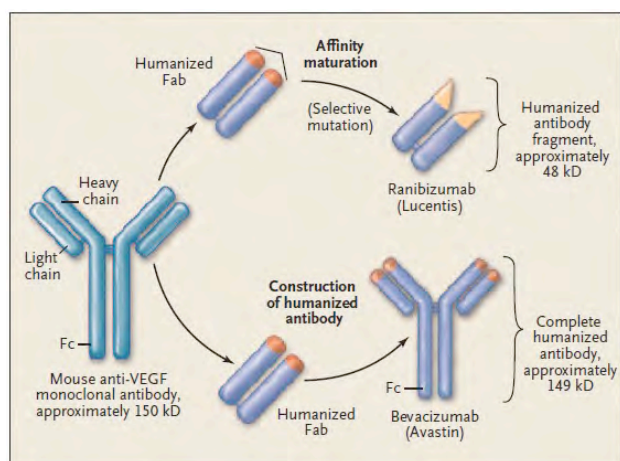
Para los pacientes que reciben ya sea la terapia con láser o la vitrectomía (Figura 7) el principal objetivo es preservar la visión y prevenir la ceguera más que revertir la pérdida de visión. Dado que la angiogénesis es una vía común en la patógenesis de la RD, más aún en sus etapas avanzadas, el desarrollo de estrategias terapéuticas que puedan interferir con la disfunción vascular en la RD ha sido uno de los principales enfoques de la investigación científica aplicada en este campo. Al respecto en los últimos años se ha incrementado drásticamente el desarrollo de terapias antiangiogénicas experimentales que se basan fundamentalmente en el bloqueo de la acción del VEGF a través de diferentes estrategias: anticuerpos anti-VEGF, RNA de interferencia, quimeras de proteínas receptoras así como receptores solubles a dicho factor<sup>132</sup>.

#### **III.2.4.2. Terapia anti-VEGF**

##### **Anticuerpos anti-VEGF**

Comercialmente existen dos fármacos anti-VEGF para el tratamiento de la RD que han sido explorados ampliamente: el ranibizumab (Lucentis) (fragmentos Fab de un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado anti-VEGF); el bevacizumab (anticuerpo monoclonal humanizado anti-VEGF) conocido comercialmente como Avastin (Figura 8). El ranibizumab, se produce por un sistema de expresión basado en bacterias (*Escherichia coli*), y se desarrolló específicamente para su uso intra-ocular, por lo cual tiene un tamaño considerablemente más pequeño (alrededor de 48 kD) en comparación con el bevacizumab (149 kD), con el objetivo de tener un índice de penetración más alto en la retina al aplicarse mediante inyecciones intravitreales. Su uso para el tratamiento de la degeneración macular asociada con la edad fue aprobado en el año 2006 por la FDA en EUA.

El bevacizumab se produce en la línea celular ovárica de hámster chino, se diseñó para ser administrado por vía sistémica (intravenosa) para el tratamiento de pacientes con cáncer metastásico de colon. Si bien su uso se ha extendido a personas con RD, aún no cuenta con la aprobación de la FDA para utilizarlo en enfermedades oculares distintas a la degeneración macular asociada con la edad. Ambos anticuerpos inhiben la acción de todas las formas biológicamente activas de VEGF, no obstante, el ranibizumab fue diseñado genéticamente para tener una mayor afinidad por el VEGF165 (VEGF de 165 aminoácidos que es la forma más activa en angiogénesis), esto se logró al realizar un cambio de únicamente 6 aminoácidos en la región de unión al ligando <sup>133</sup>.



**Figura 8 .- Estructura de 2 diferentes anticuerpos anti-VEGF, Ranibizumab y Bevacizumab**  
Tomado de Steinbrook 2006 <sup>133</sup>.

### **Inhibidores de la transcripción intracelular del VEGF**

El primer RNA de interferencia (RNAi) que se diseñó para el silenciamiento de los genes responsables de la producción del VEGF fue el Bevasiranib. Se probó su efecto en un ensayo clínico que involucró pacientes con edema macular diabético, en este estudio encontraron que su administración tenía una tendencia a disminuir el grosor macular (signo de edema en la retina) y que el efecto del RNAi era mayor con dosis más altas <sup>134</sup>.

### **Inhibidores extracelulares del VEGF**

Un inhibidor extracelular del VEGF es el sodio Pegaptanib, desarrollado por la compañía farmacéutica Eyetech, comercialmente recibe el nombre de Macugen. Es un aptámero de 28 nucleótidos que se une y bloquea específicamente a la isoforma del VEGF-A<sub>165</sub>, los aptámeros no producen inmunogenicidad y tienen menos probabilidades de provocar problemas de tolerabilidad <sup>135</sup>. El ensayo clínico del "Grupo de Estudio de Macugen en la Retinopatía Diabética" evaluó los efectos del Pegaptanib sobre el edema macular diabético que involucra la fovea. Después de 36 semanas de seguimiento, los pacientes que recibieron Pegaptanib mostraron una mayor agudeza visual, una reducción significativa en el grosor retiniano central y un número menor de ellos tuvieron la necesidad de recurrir a la fotocoagulación láser en comparación con los pacientes que recibieron el placebo <sup>136</sup>.

### **Inhibidores de la expresión del VEGF**

Aflibercept, es una proteína de fusión recombinante humana que se puede unir a todas las isoformas de VEGF-A y al factor de crecimiento placentario (PGF) <sup>137</sup>. El uso de esta droga en ensayos clínicos demostró una mejora significativa en la agudeza visual además de una reducción en el grosor de la retina medido mediante tomografía óptica computarizada (OCT) en pacientes con EMD <sup>138</sup>.

Mientras que la mayoría de los fármacos anti-VEGF son eficaces, no todos los pacientes son responsivos. Además, evidencia reciente señala que el VEGF es un factor importante en la sobrevivencia neuronal por lo que el uso indiscriminado de este tipo de fármacos podría ser contraproducente <sup>139</sup>. Aunado a esto, se requieren inyecciones intravitreales periódicas (1 cada mes o cada dos meses) por períodos prolongados (6 o más meses) de los agentes anti-VEGF lo que aumenta el riesgo de provocar la neurodegeneración del resto de la retina sana y de presentar efectos colaterales como la endoftalmitis, cataratas y glaucoma <sup>49</sup>.

Alternativamente al bloqueo de factores proangiogénicos como el VEGF, experimentalmente se ha tratado de inhibir la angiogénesis, usando agentes virales como

medio de transferencia de un amplio rango de compuestos antiangiogénicos que incluyen al PEDF<sup>140-142</sup> a los inhibidores de metaloproteinasas 3, y a los péptidos como la endostatina, la angiostatina, y las vasoinhibinas<sup>13, 142, 143</sup>. La administración intraocular de vectores virales permite la expresión de un gen terapéutico por un período prolongado, evitando de esta manera inyecciones intraoculares recurrentes en el tratamiento de la RD.

**Tabla 5 .- Principales vectores virales usados en la terapia génica**

VECTOR	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<b>Adenovirus</b>	Altos niveles de transfección. Eficiencia <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . Transfecta células que están o no en proliferación.	Fuerte respuesta inmunológica. Corta duración de la expresión. Límite a insertos de 7.5 kb
<b>Retrovirus</b>	Expresión prolongada del transgen. Alta eficiencia de transfección <i>ex vivo</i> . Baja inmunogenicidad.	Baja eficiencia de transfección <i>in vivo</i> . Límite a insertos de 8 kb. Transfección únicamente de células en proliferación. Peligro de mutagénesis insercional.
<b>AAV</b>	Transfección eficiente de una amplia variedad de células <i>in vivo</i> . Expresión prolongada. Baja inmunogenicidad. No patogénicos	Límite a inserto de 4.5 kb

### III.2.5 TERAPIA GÉNICA PARA LA RD

La terapia génica ha tenido grandes avances en las últimas décadas, particularmente en cuanto a su aplicación a nivel ocular. El ojo es un sitio ideal para este tipo de terapia gracias a su accesibilidad anatómica, su transparencia (que permite la visualización directa de cambios en la retina) y su naturaleza de sitio inmunoprivilegiado (gracias a la BHR) por lo que las respuestas inmunes no son tan potentes como en otros órganos<sup>144</sup>.

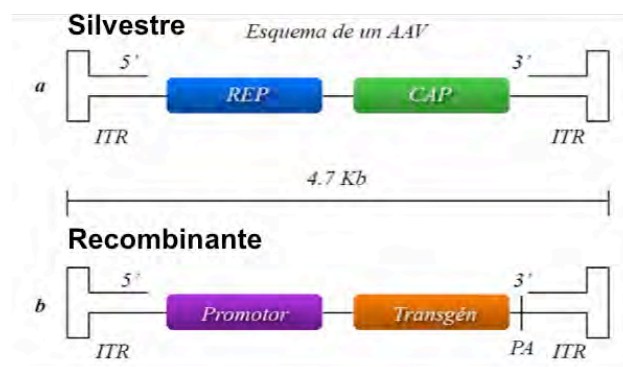
En la búsqueda del tratamiento ideal, varios vectores se han probado para la transferencia génica a partir de retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados (AAV)<sup>145</sup>, algunas de sus ventajas y limitaciones se encuentran en la Tabla 5. La racional detrás del uso de los virus para la terapia génica, es el hecho de que poseen de manera natural la

capacidad de transferir eficientemente sus genes en las células huésped, lo cual los hace deseables en términos de ingería de vectores.

En comparación con otras estrategias virales y no virales de transferencia génica en el ojo, los vectores derivados de virus adenoasociados (AAV) son los que se usan con mucho más frecuencia tanto en investigación básica como en estudios translacionales y ensayos preclínicos. Los AAV tienen varias características atractivas: son capaces de transducir células que estén tanto en proliferación o ya diferenciadas, el transgen se expresa por períodos prolongados de tiempo (años), además de que tienen un perfil de toxicidad y generación de una respuesta inmune bajo.

### III.2.5.1 AAV

Los AAV son virus no patogénicos de DNA de cadena sencilla, forman parte de la familia Parvoviridae, tienen una estructura icosaédrica y no poseen una envoltura viral. Fueron identificados como contaminantes en preparaciones de adenovirus hace casi un siglo <sup>146</sup>. Son de los virus más pequeños con un cápside de aproximadamente 22 nm, en su forma silvestre contiene únicamente 2 genes, rep y cap, los cuales son los encargados de codificar las proteínas necesarias para la replicación y la encapsidación. Las secuencias terminales invertidas repetidas <sup>121</sup>, se encuentran flanqueando los genes rep y cap, para el caso de los AAV recombinantes (rAAV), serán las únicas secuencias del genoma viral que se conservarán y el resto estará ocupado por el transgén de interés así como por promotores de la expresión en caso de requerirse <sup>147</sup> (Figura 9).



**Figura 9.- Estructura básica del genoma de AAV silvestres (a) y recombinantes (b).** Modificado de Sandoval 2005 <sup>148</sup>. ITR: terminales invertidas repetidas.

Existe una gran variedad de diferentes serotipos de rAAV, el cual está definido por un perfil característico de proteínas de la cápside <sup>149</sup>. Entre los serotipos más utilizados para la transducción retiniana se encuentran los AAV2. Después de una inyección subretiniana los vectores rAAV2 generalmente transducen el epitelio pigmentario retiniano así como fotorreceptores <sup>150, 151</sup>, mientras que si se administran de manera intravitreal transducen eficientemente a las células ganglionares <sup>152</sup>. De hecho la administración subretiniana ha sido la más utilizada tanto en ensayos clínicos como en experimentos usando primates no humanos <sup>153, 154</sup>, este procedimiento requiere un nivel de especialización alto, en especial cuando se realiza cercano a la región de la mácula. Una complicación adicional para este tipo de administración es que el volumen de inyección es muy bajo. La inyección intravitreal en este sentido es un método mas sencillo, sin embargo, usualmente una sola inyección no es capaz de transducir regiones amplias de la retina.

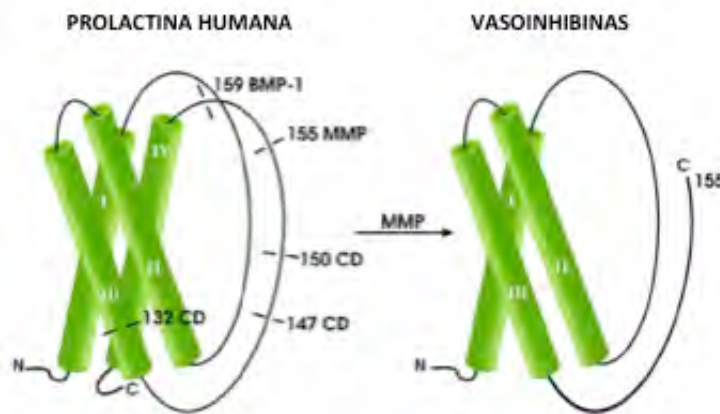
Para el bloqueo de la neovascularización retiniana, como la que se observa durante las fases tardías de la RD, se han utilizado rAAV para expresar diferentes factores antiangiogénicos como por ejemplo el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) <sup>155</sup>, el receptor soluble del VEGF (sFlt-1) <sup>156</sup>, y la angiostatina<sup>157</sup>. En el caso del rAAV2-sFlt-1, que es un vector que codifica para una proteína soluble quimérica capaz de secuestrar al VEGF, demostró una expresión persistente después de una sola inyección intravitreal, y disminuyó la neovascularización en un modelo murino de retinopatía inducido por isquemia<sup>158</sup>. La eficacia de este vector se corroboró en otros modelos animales adicionales de neovascularización, el modelo de retinopatía inducida por oxígeno y el de neovascularización coroidea inducida por láser <sup>159, 160</sup>. Tomando en cuenta los resultados positivos en cuanto a la bioseguridad y eficacia del uso del AAV2-sFlt-1 se ha iniciado un ensayo clínico fase 1 por parte de la compañía Sanofi inicialmente enfocado para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (AMD) en su forma neovascular (NCT01024998; clinicaltrials.gov).



Estudios recientes han mostrado la participación de las vasoinhibinas, péptidos derivados de la proteólisis de la hormona (PRL), en el control de la angiogénesis ocular y de la permeabilidad excesiva de la BHR debida a la diabetes<sup>161, 162</sup>. La PRL es una proteína de 23kDa de masa molecular, producida principalmente por la hipófisis anterior, que regula una multiplicidad de procesos en la reproducción, el crecimiento, la osmorregulación, la función neural, el metabolismo, la respuesta inmune y la angiogénesis. La PRL inhibe la proliferación, la permeabilidad y la dilatación ocular a través de su conversión proteolítica a fragmentos de 12 a 18 kDa denominadas, por nuestro grupo, como vasoinhibinas<sup>163</sup>. En este trabajo de tesis investigamos el potencial de la terapia génica con AAV2 que transducen vasoinhibinas para revertir alteraciones de la BHR asociadas a la RD experimental.

## IV. ANTECEDENTES INMEDIATOS

Las vasoinhibinas son una familia de derivados peptídicos que se generan a partir del corte proteolítico de la prolactina (PRL) que se lleva a cabo por diferentes enzimas como la catepsina D (CD)<sup>164</sup>, metaloproteasas de matriz (MMP)<sup>165</sup> y la proteína morfogénica de hueso tipo 1 (BMP-1)<sup>166</sup>. En la hipófisis la principal proteasa que procesa a la PRL es la catepsina D <sup>167</sup>, mientras que a nivel de los tejidos y espacio extracelular la generación de vasoinhibinas se da a través de la acción de las metaloproteasas de matriz<sup>165</sup>.



**Figura 10.-Representación esquemática de la estructura tridimensional de la prolactina (PRL).** Se indican los sitios de procesamiento proteolítico de la PRL que originan a las vasoinhibinas. La BMP-1 corta a la PRL en la posición 159, las MMPs en el sitio 155 mientras que la CD cortan en el sitio 132,147 y 150. C, carboxilo terminal; N, aminoterminal. Modificado de Clapp 2006 <sup>168</sup>.

Una serie de estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio han mostrado el papel que juegan las vasoinhibinas (Vi) en la regulación de la angiogénesis ocular tanto en procesos fisiológicos como patológicos<sup>169</sup>. Su papel como factores endógenos inhibidores de la vascularización ocular se basa en estudios que demuestran que la PRL y las vasoinhibinas se encuentran de manera natural en la retina<sup>162</sup> y es posible que provengan tanto de la síntesis local de PRL por diferentes tipos neuronales y gliales<sup>170</sup>; o bien que

provenzan de la incorporación al ojo de la PRL sistémica. Evidencia de su origen sistémico se obtuvo al inyectar intracardiácamente PRL marcada radiactivamente y encontrarla presente en la retina, la coroides y el cuerpo ciliar<sup>171</sup>. Consistentemente con este hallazgo, se reportó que la elevación de los niveles sistémicos de la PRL resulta en una acumulación de vasoinhibinas en la retina que inhibe el aumento en la permeabilidad vascular retiniana inducida por la inyección intravitreal de VEGF, como también la vasopermeabilidad excesiva que ocurre en el modelo de ratas diabéticas inyectada con estreptozotocina<sup>161</sup>. En ambos casos el efecto sobre la vasopermeabilidad se bloquea cuando se reducen los niveles altos de PRL en sangre mediante el tratamiento con bromocriptina, un agonista de los receptores D2 de la dopamina que inhiben la secreción hipofisiaria de la hormona a la circulación<sup>161</sup>. En otros trabajos se evaluó el papel endógeno funcional de las vasoinhibinas bajo condiciones normales. Implantes conteniendo anticuerpos capaces de inmunosequestrar a las vasoinhibinas o la inyección intravitreal de dichos anticuerpos estimuló la angiogénesis en la córnea<sup>172</sup> y en la retina<sup>162</sup>. Asimismo, la administración intravitreal de RNA de interferencia para PRL bloquearon la expresión local del RNA mensajero de esta hormona en la retina y estimularon tanto angiogénesis como la vasodilatación retinianas<sup>162</sup>.

Otra evidencia de la función fisiológica de las vasoinhibinas en el ojo quedó demostrada al inmunodepletar estas moléculas en ratas neonatas. Esto produjo una disminución en la apoptosis de la vasculatura hialoidea, que es la vasculatura que nutre el tejido ocular durante las primeras etapas embriológicas e involuciona de manera natural para dar paso a la vasculatura de la retina<sup>173</sup>. Las vasoinhibinas son capaces de prevenir la angiogénesis inducida por VEGF y promover la regresión vascular mediante apoptosis, como se observa en la retinopatía del prematuro<sup>173</sup>. Adicionalmente al bloqueo de la acción del VEGF, las Vi actuando directamente sobre células endoteliales pueden inhibir la vasopermeabilidad, vasodilatación y angiogénesis inducida por otros factores vasoactivos como: el bFGF, interleucina 1- $\beta$  (IL1- $\beta$ ), bradicinina y acetilcolina<sup>16</sup>. Las vasoinhibinas actúan directamente sobre el endotelio vascular a través de activar

receptores membranales, de naturaleza desconocida pero diferentes a los receptores de la PRL<sup>174</sup> y bloquean la activación de la vía Ras-Raf-MAPK<sup>175</sup>, la vía Ras-Tiam1-Rac1-Pak1<sup>176</sup>; además bloquea la activación de la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS) y la subsecuente producción de óxido nítrico (NO) endotelial<sup>177,178</sup>.

El antecedente directo de este proyecto mostró que la administración intravitreal de AAV2 que contenían el transgén para una vasoinhibina (AAV2-Vi) es capaz de prevenir el aumento en la vasopermeabilidad de la retina que tiene lugar en las ratas diabéticas<sup>13</sup>. No obstante, en este trabajo los vectores AAV2-Vi fueron administrados un mes antes de la inducción experimental de diabetes con estreptozotocina, en otras palabras la terapia génica con dichos vectores tuvo un carácter preventivo y no se evaluó si estos mismos vectores eran capaces de bloquear la permeabilidad vascular en la retina cuando la diabetes ya estaba instaurada.

Conocer los efectos curativos de los vectores AAV2-Vi, en animales diabéticos es importante para sentar las bases de su posible utilidad clínica. Los estudios recientes nos exhortan a ser cautelosos con las dosis intravitreales utilizadas de los vectores debido al riesgo que puede existir de provocar la diseminación de los mismos y la activación del sistema inmune, efectos ambos observados con dosis muy altas<sup>179</sup>. Por lo cual lograr una transducción eficiente, evaluar la dosis mínima necesaria para obtener los efectos deseados y posibles efectos adversos de la terapia génica de los AAV2-Vi son requerimientos primarios que abordamos en el trabajo experimental de esta tesis.

## V. HIPÓTESIS

Los vectores adenoasociados tipo 2 que codifican para las vasoinhibinas (AAV2-Vi) y sFlt-1 (AAV2-sFlt-1) tienen un efecto inhibitorio sobre alteraciones vasculares en la retina, cuando son administrados una vez instaurado el cuadro diabético. Dichos vectores no modifican propiedades histológicas y funcionales de la retina.

## VI. OBJETIVOS

Demostrar que las vasoinhibinas y sFlt-1 expresadas mediante AAV2 tienen potencial terapéutico sobre la retinopatía diabética experimental.

### Objetivos particulares

- Verificar la expresión en la retina de los transgenes codificados por los AAV2-Vi, los AAV2- sFlt-1 y los AAV2-GFP inyectados en el vítreo de ratas controles y diabéticas.
- Determinar el efecto curativo de las vasoinhibinas expresadas mediante AAV2 sobre la vasopermeabilidad retiniana debida a la diabetes usando una dosis de vector menor a la utilizada en un estudio previo.
- Comparar los efectos de los AAV2 Vi y de los AAV2 sFlt-1 sobre la inhibición de la vasopermeabilidad retiniana debida a la diabetes.
- Evaluar si los vectores AAV2-Vi modifican alteraciones microvasculares y electrofisiológicas inducidas por el cuadro diabético.
- Analizar la bioseguridad de la administración intravitreal de los AAV2-Vi y expresión de los transgenes en la retina, mediante estudios histológicos.
- Investigar si el perfil de células transducidas en la retina por los vectores AAV2 se modifica en condiciones de diabetes.
- Evaluar la expresión en la retina de animales diabéticos y controles de los receptores y co-receptores de los AAV2.

## VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### VII.1 ANIMALES

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 250 a 280 gramos. Para la realización de los diferentes procedimientos experimentales, las ratas fueron sometidas a anestesia general mediante la inyección intraperitoneal de ketamina (70%) y xilacina (30%) (1 $\mu$ l/g de peso corporal). El cuidado y tratamiento de los animales fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM y se sujeta a las normas establecidas por la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO).

### VII.2 METODOLOGÍA

#### VII.2.1 Modelo experimental de retinopatía diabética

La diabetes se indujo mediante una dosis única de estreptozotocina (STZ 60 mg/kg de peso corporal) inyectada intraperitonealmente, como se ha descrito previamente<sup>177</sup>. Se consideraron diabéticos a los animales que presentaban glucemias superiores a 250 mg/dl (medición realizada 3 días después de la inyección con estreptozotocina y corroborada al final del experimento). Usamos dos esquemas experimentales distintos, animales a los cuales se les administró la STZ y 15 días después se les inyectaron intravitrealmente los vectores (Grupo terapéutico) y otro grupo de animales inyectados con los vectores un mes antes de la inducción de diabetes con STZ (Grupo profiláctico). Los grupos se sacrificaron; 4 o 6 semanas después de la inyección con STZ en el grupo terapéutico o en el profiláctico, respectivamente.

#### VII.2.2 Construcción de plásmidos y producción de AAV-2 recombinantes

El cDNA de la vasoinhibina humana (codones 1-142 de la PRL humana) se amplificó a partir de una construcción modificada en la cual el codón 58 fue cambiado de una cisteína por una serina. El producto se clonó entre los sitios Bam HI y NotI del pcDNA3 entre el promotor del citomegalovirus y el sitio de poliadenilación del SV40. Además, se insertó un intrón de la  $\beta$ -globina del conejo en el extremo 5' del péptido señal de la

vasoinhibina. La construcción del plásmido se secuenció, y se verificó que no tuvieran errores inducidos por la PCR; posteriormente se enviaron al Dr. Peter Colosi del National Eye Institute (NIH en Bethesda MD) donde las construcciones se empacaron en AAV2 por el método previamente descrito<sup>180</sup>. El Dr. Colosi también nos donó AAV2 que codificaban para sFlt-1 y la proteína verde fluorescente intensificada (EGFP) generados bajo construcciones (promotores e insertos) similares. El AAV2 GFP fue utilizado para verificar la incorporación y transducción de los vectores virales en la retina.

### **VII.2.3 Inyección intravitreal de AAV2 Vi, AAV2 sFlt-1 y AAV2-GFP.**

Los vectores AAV2 Vi, AAV2 sFlt-1 y AAV2 GFP se inyectaron intravitrealmente en las ratas control y en ratas diabéticas siguiendo los esquemas terapéutico o profiláctico descrito anteriormente. Cada rata recibió un volumen final por ojo de 2  $\mu$ l ( $2.8 \times 10^9$  genomas virales) de los AAV2 o de vehículo (10 mM Tris 180mM NaCl, pH 7.3). Cuatro semanas o seis semanas después de la inyección de los vectores, se evaluó la vasopermeabilidad de la retina mediante el ensayo de azul de Evans, adicionalmente analizamos la expresión en la retina de los diferentes transgenes esto mediante qRT-PCR e inmunohistoquímica.

### **VII.2.4 Cuantificación de los genomas virales**

Se aisló el DNA genómico de las muestras de retinas de ratas controles y diabéticas que fueron inyectados intravitrealmente con los virus AAV2. Se utilizaron 100 ng de muestra de DNA en el que se evaluó la presencia del genoma viral mediante PCR cuantitativa utilizando oligonucleótidos de unión específica al promotor de citomegalovirus (CMV). Para la normalización de las muestras se realizó una PCR cuantitativa del DNA ribosomal 28S. Se usaron las siguientes condiciones de amplificación para el CMV: 30 s a 94° C, 30 s a 60.5° C y 30 s a 72° C durante 40 ciclos, mientras que para el DNA ribosomal 28S la temperatura de alineación fue de 56.5° C. Para obtener la cuantificación absoluta se hicieron curvas estándar de los dos plásmidos usando concentraciones en el rango de  $10^7$ - $10^9$  moléculas por microlitro y espectrofotometría.

### **VII.2.5 Ensayo de azul de Evans**

El aumento en la vasopermeabilidad retiniana se valoró mediante el ensayo de azul de Evans, un colorante ampliamente utilizado como un trazador intravascular ya que cuando se inyecta intravenosamente se une irreversiblemente a la albúmina circulante. Dado que la vasopermeabilidad aumenta la fuga de proteínas plasmáticas a través de las uniones estrechas de las células endoteliales, un aumento en la salida del complejo azul de Evans-albúmina en el espacio extracelular es un indicativo de incremento en la vasopermeabilidad. Brevemente este ensayo consistió en lo siguiente: el azul de Evans (45 mg/Kg de peso) se inyectó en la vena yugular izquierda y, luego de 2 horas, el animal fue sacrificado y perfundido con solución amortiguadora de fosfatos pH 3.5 a 37°C para eliminar el colorante del torrente circulatorio. Se obtuvieron las retinas y se extrajo el complejo albumina-colorante extravasado mediante la incubación con formamida durante 18 h a 70°C. El extracto se centrifugó a 70,000 rpm durante 1 h y se cuantificó el colorante presente en el sobrenadante midiendo la absorbancia a 620 nm, que es la longitud de onda de máxima absorbancia del azul de Evans.

### **VII.2.6 Montajes planos de retina**

Los ojos se fijaron usando una solución de paraformaldehído al 4%, preparada en fresco, se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos y se lavaron con PBS. Posteriormente, se retiró el PBS y, bajo un microscopio estereoscópico, se realizó una incisión a nivel del limbo (la unión entre la córnea y la esclera) para disociar el segmento anterior del ojo (cornea, procesos ciliares) del segmento posterior (retina neural, epitelio pigmentario, coroides, esclera). El cristalino también fue removido procurando no perturbar la retina. El epitelio pigmentario, la coroides, la esclera y la retina neural se aplanaron haciendo 4 incisiones ortogonales a intervalos de alrededor de 90°, desde la *ora serrata* y extendiéndose centralmente hacia la papila óptica. Finalmente, la retina neural se separó cuidadosamente del complejo epitelio pigmentario-coroides-esclera. La retina se colocó en un portaobjetos y fue cubierta con medio de montaje (Vectashield) y cubreobjetos para la posterior observación directa de la fluorescencia producto de la GFP



en las retinas transducidas con AAV2 GFP. La observación y captura de imágenes se realizó en un microscopio confocal (LSM 780). Se capturaron secciones ópticas en serie en el eje z en tres diferentes áreas de la capa de células ganglionares en la cercanía del nervio óptico. La fluorescencia de GFP por unidad de área se cuantificó usando un programa de análisis de imágenes (Image Pro-Plus).

## **VII. 2.7 Extracción del mRNA**

Para extraer el RNA y cuantificar la expresión de los transgenes en la retina de las ratas (controles y diabéticas) inyectadas intravitrealmente con los diferentes AAV2, se utilizó Trizol® (Life Technologies, Carlsbad, CA) y se siguió el protocolo proporcionado por el proveedor. Brevemente, el extracto de cada retina se procesó por separado utilizando 100 µl de Trizol, se agitó vigorosamente por 15 segundos, se le agregaron 50 µl de cloroformo y se dejó incubando por 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 12000 rpm a 4°C y se recuperó la fase acuosa. A esta fase acuosa se le adicionaron 50 µl de isopropanol al 100% se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó por 10 minutos a 12000 rpm y 4°C. El precipitado se lavó con 50 µl de etanol y se centrifugó nuevamente, ahora a 7500 rpm por 5 minutos y a 4°C; finalmente de manera muy cuidadosa se retiró el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 30 µl de agua libre de RNAsas y se midió la concentración de RNA espectrofotométricamente.

## **VII.2.8 Síntesis del DNA complementario (cDNA)**

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 500 nanogramos de RNA purificado, utilizando un kit comercial para la retrotranscripción (Applied Biosystems, Warrington, UK). Para este propósito, la mezcla de reacción contuvo 1 µl de desoxinucleótidos 100mM (dNTPs), 2 µl de “random primers”, 1 µl de enzima transcriptasa reversa Superscript III RT (200 U/µl) y 4 µl de solución amortiguadora (5X). La mezcla se ajustó con agua a un volumen final de 12 µl, se incubó 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C y 5 minutos a 85°C y se almacenó a 4°C hasta su uso.

### **VII.2.9 qRT-PCR**

La PCR en tiempo real es una variante de la PCR convencional que permite la cuantificación del producto de amplificación mediante la detección de la fluorescencia a una longitud de onda específica producida por un fluoróforo excitado. En este caso, se utilizó Maxima SYBR Green (Thermo Scientific, Auburn, AL) que es capaz de intercalarse en la doble cadena del DNA, y ser excitado a 530 nm. El DNA amplificado se cuantificó en un aparato de PCR cuantitativo (Biorad, Hércules, California) para conocer el nivel de expresión del mRNA de cada muestra. Para llevar a cabo la reacción se utilizó una mezcla maestra para amplificación con SYBR Green. La mezcla contuvo 65  $\mu$ l de solución amortiguadora, 0.65  $\mu$ l de oligonucleótidos sentido y antisentido para los diferentes genes evaluados y 65  $\mu$ l de cDNA. El aparato se programó de acuerdo a la temperatura específica para los oligonucleótidos y la fluorescencia se detectó a 530 nm. El nivel de expresión fue analizado mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , y los CTs se normalizaron al gen constitutivo hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HPRT).

### **VII.2.10 Fluoroangiografía de la retina**

Bajo condiciones de anestesia, se inyectó isotiocianato de fluoresceína dextran (100 mg/kg de peso FITC-Dextran, 50 mg/ml Sigma Aldrich) por vía I.V. Después de una hora de circulación del trazador, las ratas fueron sacrificadas y las retinas se procesaron para montajes planos. Para ello las retinas se mantuvieron en una solución de paraformaldehído 4% preparada en fresco con PBS 0.1 M a temperatura ambiente durante 4 horas, pasado el tiempo de incubación se procedió a lavar con PBS. Las retinas se montaron en portaobjetos con medio de montaje (Vectashield) y cubreobjetos. Los montajes planos se observaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX60) bajo el objetivo 4X. Las imágenes se digitalizaron y la retina se reconstruyó a partir de las imágenes capturadas. La densidad capilar se analizó utilizando el software de análisis de imágenes "AngioTool" usando como parámetros fijos el diámetro de vasos (1-5 unidades) y de intensidad de fluorescencia (15-22 unidades).

### VII.2.11 Evaluación de la expresión de los transgenes en la retina

Los productos de PCR fueron separados usando un gel de 1.2% de agarosa y se visualizaron con bromuro de etidio o fueron detectados y cuantificados por qPCR. Las secuencias que se usaron se pueden consultar en la Tabla 6.

**Tabla 6.-** Lista de oligonucleótidos utilizados y sus secuencias correspondientes

GEN	SECUENCIA	
HPRT	sentido	5'-GACCGTTCTGTCATGTCG-3'
	antisentido	5'-ACCTGGTTCATCATCACTAATCAC-3'
hVi	sentido	5'-CTGCCCGATGCCAGGTGA-3'
	antisentido	5'-GAAAGTCTTTTTGATTCATCTGT-3'
hsFlt-1	sentido	5'-GACCTGGAGTTACCCTGATGA-3'
	antisentido	5'-ATGGTCCACTCCTTACACGAC-3'
Glipicano 1	sentido	5'-TGGCGCCTACGGTGGAAATGATGT-3'
	antisentido	5'-GAGTGGCGGCCGAGGTCTTCTGTC-3'
Sindecano 4	sentido	5'-GAACCATGGCGCCTGTCTGC-3'
	antisentido	5'-CCTGGGCTCCTCCGTGTCATCT-3'
Perlecano 1	sentido	5'-CTGCCACCTGACAGTCGC-3'
	antisentido	5'-GCTCTGGCACCTGCAG-3'
HGFR c-Met	sentido	5'-TCGTTTCCTTGGGATTATTGC-3'
	antisentido	5'-TGTTTTGTTTTGGCACAGGA-3'
$\alpha\beta$ 5 Integrina	sentido	5'-CACCTGAATGAAGCCAATGA-3'
	antisentido	5'-TCCATGCAAAATCTCCACAG-3'
FGFR1	sentido	5'-CAACACCAAACCAAACCGTA-3'
	antisentido	5'-GTTTTTCAACCAGCGCAAAG-3'
CMV	sentido	5'-TGCCCAGTACATGACCTTAT-3'
	antisentido	5'-AATGGGGCGGAGTTGTTAC-3'
ribosomal 28S	sentido	5'-CAGTACGAATACAGACCG-3'
	antisentido	5'-GGCAACAACACATCATCAG-3'

### VII.2.12 Electroretinograma

El electroretinograma (ERG) es un registro de campo que representa la suma de la actividad eléctrica de toda la retina y constituye una prueba de la actividad neuronal. El ERG se registra a partir de electrodos puestos en la córnea, que actúa como una antena que colecta y suma todas las señales eléctricas de la retina<sup>181</sup>. El ERG está compuesto por 3 respuestas principales, denominadas onda A, onda B y onda C. La onda A conocida también a veces como "potencial tardío de receptor", refleja el estado de salud de los

fotorreceptores. En contraste la onda B, refleja el estado en que se encuentran las células de Müller<sup>182</sup>. Por su lado la onda C se origina del epitelio pigmentario<sup>183</sup> en algunos casos se puede registrar una onda adicional, la onda D la cual indica la actividad de las células bipolares "off".

Para llevar a cabo esta prueba sometimos a los animales a un período de adaptación a la oscuridad de 12 horas, seguido de su anestesia (ketamina/xilacina) y con la ayuda de un equipo estereotáxico se colocaron en las condiciones óptimas para realizar el registro, todo ello manteniendo un ambiente de iluminación mínima con luz roja (que no es capaz de provocar la activación de los fotorreceptores). La temperatura corporal de las ratas se mantuvo constante a 37° C mediante un colchón térmico, y sus pupilas se dilataron con una gota de una solución de 0.5% tropicamida y 0.5% fenilefrina. Se hizo el registro electrofisiológico de ambos ojos utilizando electrodos anulares de plata clorurada con un diámetro de 2 mm los cuales fueron posicionados en la región de la córnea y dos electrodos de referencia se situaron de manera subcutánea cercanos a los ojos. Utilizando un fotoestimulador (PhotoStimulador, GRASS Technologies, Warwick, RI, USA) se aplicaron 16 pulsos (en serie) de una duración de 0.7 milisegundos. Cada serie fue realizó a 4 intensidades de fotoestimulación distintas (0.3, 0.6, 0.9, y 1.2 log cd.s/m<sup>2</sup>). La señal obtenida fue amplificada 200 veces y se utilizaron filtros para ajustarla de 0.3 kHz a 3 Hz (P511AC Amplifier, GRASS Technologies). El análisis de los registros se realizó de manera cuantitativa utilizando el programa Polyview 16 (Grass Telefactor) y se evaluó la amplitud de la onda A, y de la onda B.

### **VII.2.13 Evaluación del grosor retiniano mediante cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina.**

La evaluación de posibles cambios en la estructura de la retina se realizó en cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina, para lo cual los ojos usando fueron fijados en 4% de paraformaldehído por 24 horas a temperatura ambiente, posteriormente se deshidrataron y embebieron en parafina. Se obtuvieron cortes seriales (8µm) manteniendo la orientación del ojo teniendo como referencia el nervio óptico. Las

secciones obtenidas fueron colocadas en portaobjetos. Se procedió a desparafinar las secciones a 60°C durante 30 minutos y ha realizar lavados de 5 minutos con xileno. Las secciones se deshidrataron con distintas concentraciones de alcoholes (100% etanol, 96% y 80% durante 5 minutos cada uno); se tiñeron las laminillas con soluciones de hematoxilina (10 minutos) y eosina (2 minutos) para después deshidratarlas con concentraciones crecientes de alcoholes y xileno, por último se cubrieron usando medio Entellan (Merck Darmstadt, Germany). Las imágenes se capturaron mediante un escáner digital (Scancope Digital Scanner) a una magnificación de 20X y se evaluaron con la ayuda del programa Image Scope (aperio Technologies, Vista, CA) midiendo el grosor de la capa nuclear interna y externa, así como el grosor total de la retina. Se realizaron 3 mediciones por cada retina en la misma zona (a una distancia de 1mm del nervio óptico).

#### **VII.2.14 Inmunohistoquímica en criosecciones de retina**

Los ojos de los animales fueron fijados en 4% paraformaldehído por 4 horas a temperatura ambiente y posteriormente fueron crioprottegidos con una solución de sacarosa 15% por un día a -8°C. Los ojos fueron alineados en moldes plásticos e incluidos con medio de congelación OCT (Tissue-Tek; Sakura Finetech Torrance, CA); los moldes fueron sumergidos cuidadosamente en nitrógeno líquido. Secciones de 12 µm se obtuvieron y montaron en laminillas gelatinizadas, se mantuvieron almacenadas a -70°C hasta su procesamiento. Las laminillas fueron lavadas con PBS para remover restos de OCT, y se incubaron durante 2 horas con una solución bloqueadora (PBS 0.1 M pH7.4, 3% albúmina sérica bovina BSA , 5% suero normal de cabra NGS, y 0.1% Tritón X-100) a temperatura ambiente; pasado el tiempo de incubación se les colocó el anticuerpo monoclonal anti-FGFR-1 (ab823 Abcam PLC, Cambridge, UK) en una concentración 1:50 durante toda la noche. Posteriormente las laminillas fueron lavadas tres veces con PBS durante 15 minutos, para después adicionarles el anticuerpo secundario acoplado a fluorescencia a una concentración de 1:500 (Alexa Fluor 488, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Subsecuentemente finalmente se realizaron tres lavados con PBS y se les colocaron las secciones en medio de montaje que protege la fluorescencia

acoplado con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA) que contratiñe los núcleos. Como control negativo utilizamos secciones a las cuales se omitió el anticuerpo primario para evaluar una posible reacción no específica. Se capturaron imágenes mediante microscopía confocal (Zeiss LSM780 live DUO, Carl Zeiss) bajo un objetivo 25X. Las imágenes obtenidas fueron digitalizadas y analizadas con el programa Zeiss LSM Image Examiner.

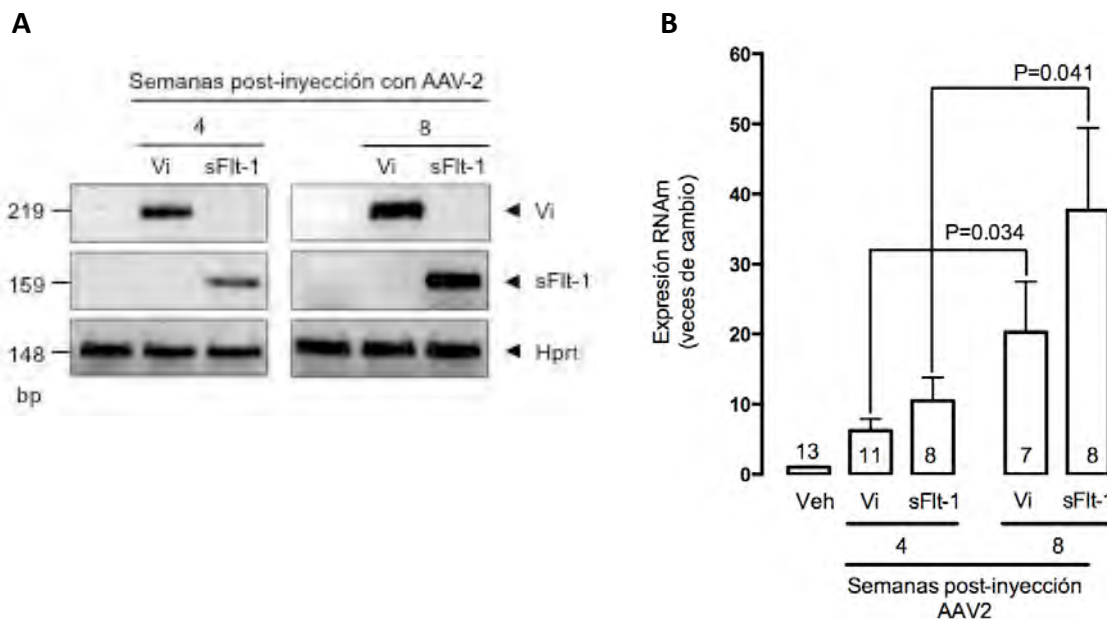
#### **VII.2.15 Análisis Estadístico**

Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de al menos 4 mediciones independientes. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos fueron determinadas mediante análisis de varianza (ANOVA) seguida de una t de Student no pareada de dos colas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para valores de  $p < 0.05$ . El análisis estadístico fue realizado usando un software analítico comercial (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

## VIII. RESULTADOS

### VIII. 1 Verificación de la expresión del transgen de vasoinhibinas y sFlt-1 en la retina.

El RNA total proveniente de ojos inyectados con vehículo o con vectores AAV2 fue tratado con DNAsa para eliminar cualquier contaminación con DNA genómico. En los ojos de ratas controles inyectados con vehículo no se observó ningún transcrito que correspondiera al tamaño de vasoinhibinas o sFlt-1 humanos (Figura 11A), confirmando que los primers no amplifican las vasoinhibinas o sFlt-1 endógenos de la rata. Se amplificaron productos del tamaño esperado para vasoinhibinas y sFlt-1 a partir de retinas obtenidas a las 4 y 8 semanas después de la inyección intravitreal con el vector respectivo (Figura 11A). La expresión de ambos transgenes fue significativamente mayor a las 8 semanas que a las 4 semanas post-transducción como se puede observar en la (Figura 11B).



**Figura 11.- Verificación de la expresión de los transgenes de AAV2 Vi y sFlt-1 en la retina.** Análisis del mRNA de vasoinhibinas (Vi) y sFlt-1 en la retina de ratas controles obtenidas a las 4 u 8 semanas después de la administración intravitreal del vehículo (Veh) o de los vectores de AAV2 Vi o AAV2 sFlt-1. El tamaño de los productos de RT-PCR se muestran en

pares de bases (bp). **(B)** Cuantificación de los niveles de mRNA mediante qRT-PCR en retinas de ratas controles obtenidas a las 4 u 8 semanas de la administración intravitreal con Veh, AAV2 Vi o AAV2 sFlt-1. Las barras representan los promedios  $\pm$  EE. El número de retinas independientes por grupo esta indicado dentro de cada barra.

## VII.2 Los vectores de AAV2 vasoinhibinas y AAV2 sFlt-1 revierten la patología de la barrera hemato-retiniana (BHR) inducida por la diabetes.

En la tabla 7 se muestra el peso corporal y los niveles de glucosa de las ratas controles y diabéticas analizadas en el proyecto. Los animales diabéticos muestran un menor peso corporal a partir de la cuarta semana y hasta las ocho semanas después del tratamiento con STZ en comparación con los animales controles de la misma edad. Adicionalmente se midieron los niveles de glucosa y se encontró que también son significativamente más altos los de las ratas diabéticas en cualquiera de los tiempos analizados.

**Tabla 7. Peso corporal y niveles de glucosa de ratas no diabéticas y diabéticas**

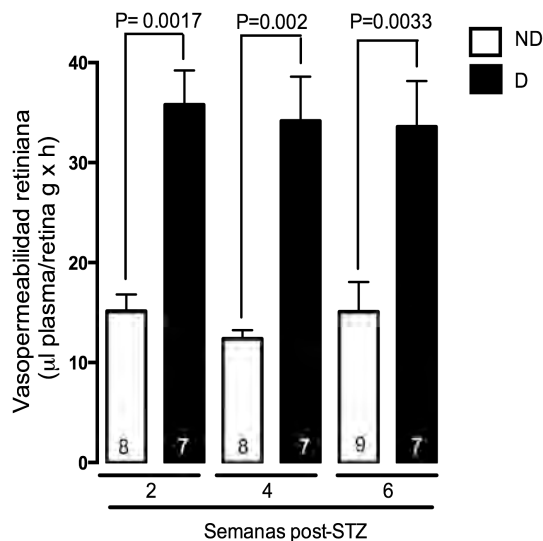
Duración de diabetes (semanas)	Tratamiento	n	Peso (g)	Niveles de glucosa (mg/dl)
2	ND (NI)	4	334.5 $\pm$ 8.9	100.0 $\pm$ 3.3
	D (NI)	4	325.9 $\pm$ 6.9	478.6 $\pm$ 30.8*
4	ND (NI)	20	363.1 $\pm$ 6.3	98.6 $\pm$ 2.5
	D (NI)	20	274.4 $\pm$ 9.6*	469.7 $\pm$ 17.9*
	ND (Veh)	28	341.6 $\pm$ 5.8	103.9 $\pm$ 2.8
	D (Veh)	20	263.5 $\pm$ 4.5*	486.6 $\pm$ 15.3 *
	ND (Vi)	9	348.9 $\pm$ 7.7	100.6 $\pm$ 5.12
	D (Vi)	3	275.9 $\pm$ 6.8*	496.0 $\pm$ 8.5*
	ND (sFlt-1)	3	359.4 $\pm$ 5.9	99.0 $\pm$ 4.8
	D (sFlt-1)	4	285.8 $\pm$ 7.2*	491.3 $\pm$ 19.5*
6	ND (NI)	5	442.9 $\pm$ 6.3	105.1 $\pm$ 4.81
	D (NI)	4	345.2 $\pm$ 10.4*	464.4 $\pm$ 16.3*
	ND (Veh)	16	449.9 $\pm$ 6.9	103.8 $\pm$ 3.5
	D (Veh)	14	327.0 $\pm$ 10.6*	463.3 $\pm$ 11.7*
	ND (Vi)	25	463.2 $\pm$ 12.9	101.8 $\pm$ 3.3
	D (Vi)	25	341.1 $\pm$ 11.2*	505.5 $\pm$ 10.4*
	ND (sFlt-1)	6	430.6 $\pm$ 14.6	102.3 $\pm$ 3.5
	D (sFlt-1)	6	319.4 $\pm$ 13.4*	469.2 $\pm$ 18.5*
	ND (GFP)	10	460.7 $\pm$ 9.7	110.5 $\pm$ 4.5
	D (GFP)	11	321.0 $\pm$ 21.2*	468.1 $\pm$ 24.9*



8	ND (Vi)	7	507.2 ± 8.8	108.9 ± 4.9
	D (Vi)	8	370.1 ± 7.8*	482.2 ± 16.7*

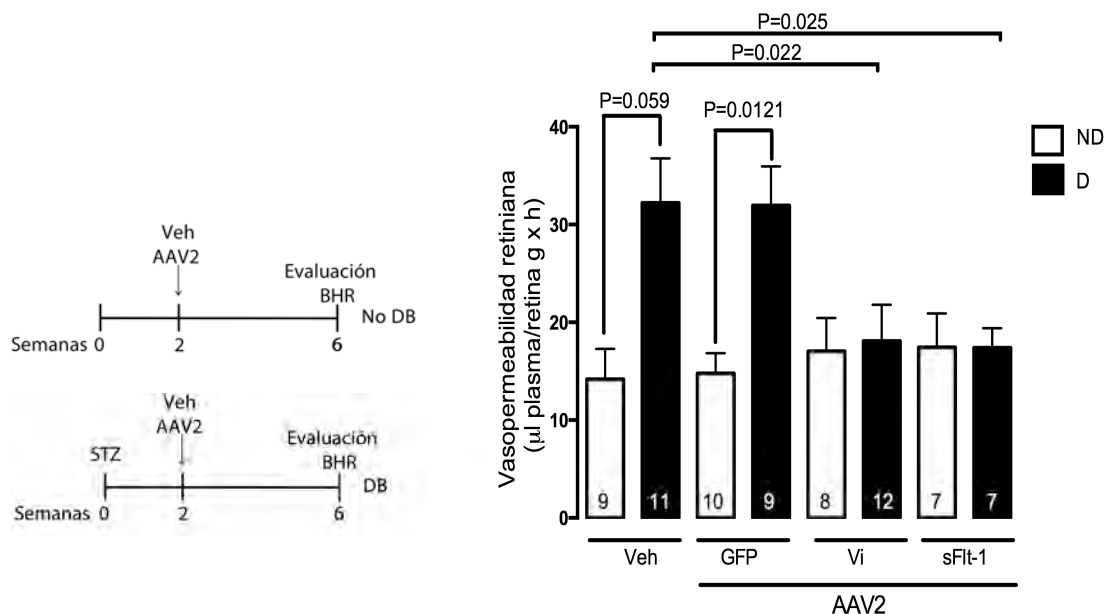
Ratas tratadas (D) o no tratadas (ND) con estreptozotocina (STZ), fueron inyectadas intravitrealmente con vehículo (Veh), AAV2 vasoinhibinas (Vi), AAV2 sFlt-1 o AAV2-Proteína Verde Fluorescente (GFP) y evaluadas a las 2, 4, 6 u 8 semanas después de la STZ. \*P<0.001 contra el respectivo control ND. El peso corporal y los valores de glucosa fueron similares dentro de los distintos grupos de animales ND y D durante el mismo período semanal. Los valores representan el promedio ± error estándar. Número de ratas (n).

El modelo de diabetes inducido por estreptozotocina en la rata refleja algunos de los cambios que se dan de manera temprana en la RD humana, dentro de los que se incluyen la ruptura de la barrera hemato-retiniana (BHR), que se ha reportado inclusive a partir de los 5 días después del tratamiento con la STZ<sup>13, 15, 161, 184-187</sup>. Confirmamos el daño temprano y sostenido en la barrera hemato-retiniana a través del incremento en la acumulación de azul de Evans acoplado a la albúmina a partir de las 2 semanas después de la inyección con STZ que se mantiene a un nivel alto durante las siguientes 4 y 6 semanas (Figura 12).



**Figura 12.- Evaluación de la integridad de la barrera hemoretiniana (BHR).** Determinación de la vasopermeabilidad de la retina mediante el ensayo de azul de Evans en ratas controles no diabéticas (ND) y ratas diabéticas (D) a las 2, 4 y 6 semanas después del tratamiento con STZ. Los valores representan el promedio ± error estándar. Los números dentro de las barras indican la cantidad de retinas evaluadas. STZ, estreptozotocina.

Para evaluar si se restaura la función de la BHR, las ratas diabéticas y no diabéticas (dos semanas después de su tratamiento con STZ) se inyectaron intravitrealmente con vehículo o con  $2.8 \times 10^9$  genomas virales de los vectores AAV2 Vi, AAV2 sFlt-1 o AAV2 GFP. Cuatro semanas después de la inyección de los vectores se les realizó la prueba de azul de Evans para investigar la integridad de la BHR. Los resultados se muestran en la Figura 13. Como era de esperarse la diabetes indujo un aumento significativo en la vasopermeabilidad retiniana en las ratas inyectadas con vehículo. El tratamiento con los vectores de AAV2 Vi o AAV2 sFlt-1 revirtieron la ruptura de la BHR debida a la diabetes (Figura 13). Este efecto fue específico de los transgenes de vasoinhibinas y sFlt-1 ya que el vector que codificaba para la proteína verde fluorescente (AAV2 GFP) no mostró este efecto. Ninguno de los vectores administrados intravitrealmente modificó la vasopermeabilidad retiniana basal en las ratas no diabéticas (Figura 13). Estos hallazgos apoyan el potencial terapéutico de ambos vectores (AAV2 vasoinhibinas y AAV2 sFlt-1).

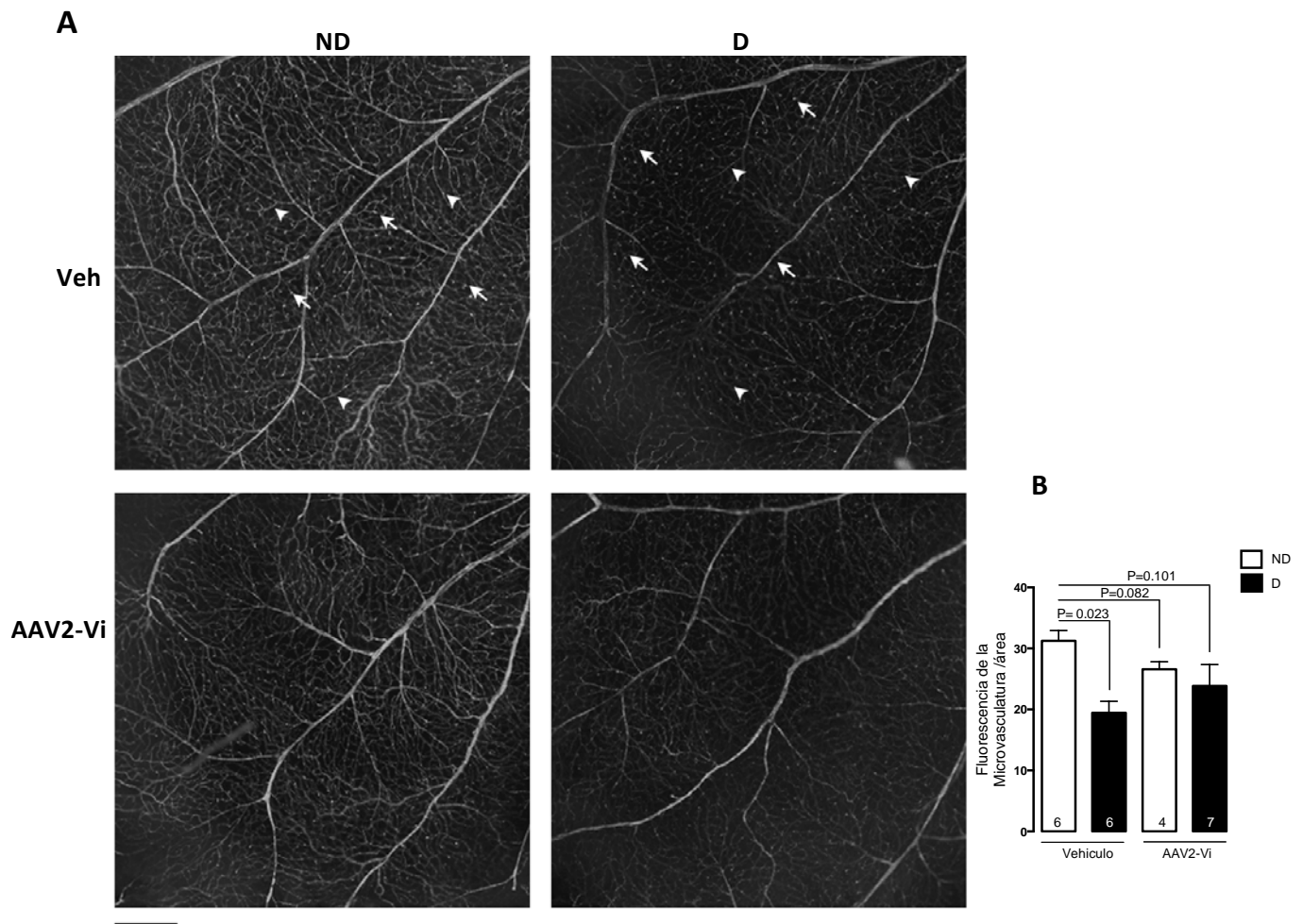


**Figura 13.-Los vectores de AAV2-vasoinhibinas y AAV2-sFlt-1 revierten la ruptura de la barrera hemoretiniana (BHR) inducida por la diabetes.** Diagrama del esquema experimental curativo (post-diabetes): vehículo (Veh) o los vectores AAV2 Vi, AAV2 sFlt-1 o

AAV2 GFP fueron inyectados intravitrealmente en ratas diabéticas (D) o no diabéticas (ND) dos semanas después de su tratamiento con STZ; la integridad de la BHR fue evaluada 4 semanas después de la administración de los vectores. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE. Los números dentro de las barras indican la cantidad de retinas evaluadas.

### **VIII.3 El vector de AAV2-vasoinhibinas reduce anomalías en la microvasculatura retiniana ocasionadas por la diabetes**

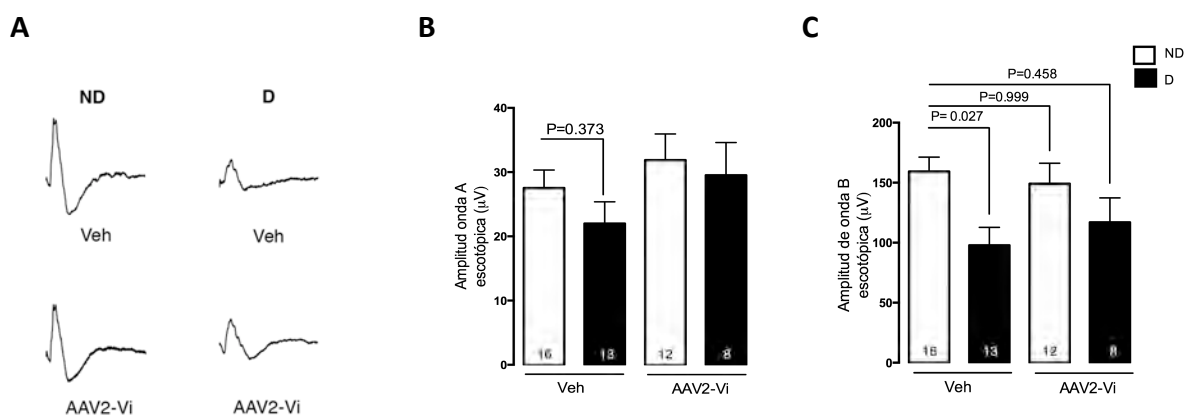
En este proyecto analizamos otras posibles propiedades terapéuticas así como la bioseguridad de los vectores de AAV2-vasoinhibinas. Para ello evaluamos en primer lugar la red vascular en la retina de animales tratados bajo el régimen terapéutico (esquema Figura 13). En la figura 14 A se muestran imágenes representativas de la vasculatura de la retina de ratas no diabéticas y diabéticas obtenidas por fluoroangiografía. En consistencia con hallazgos previos usando esta técnica<sup>188, 189</sup>, las retinas de ratas tratadas con STZ mostraron una red vascular intacta. No obstante, la intensidad de la señal fluorescente dentro de los vasos capilares (indicada mediante cabezas de flecha) fue menor en la retina de ratas diabéticas en comparación con la retina de ratas controles no diabéticas inyectadas con vehículo (Figura 14 A). Los capilares de la retina menos intensos en la condición diabética permiten una mejor visualización de los segmentos cortos verticales capilares (señalados en las imágenes con flechas completas) los cuales conectan las capas superficiales y profundas de las capas de la retina interna<sup>190</sup>. La menor fluorescencia en la microvasculatura retiniana de ratas diabéticas no fue tan evidente en los animales inyectados intravitrealmente con los AAV2 vasoinhibinas. Consistentemente, la densidad de la fluorescencia vascular por área de la retina disminuyó significativamente en las ratas diabéticas en relación a las ratas controles no-diabéticas y esta diferencia no se observó en las ratas diabéticas inyectadas con los vectores de AAV2-vasoinhibinas (Figura 14B).



**Figura 14.-El vector AAV2 Vasoinhibinas reduce anomalías en la microvasculatura de la retina inducidas por la diabetes. (A)** Imágenes representativas de retinas marcadas con fluoresceína de ratas controles no diabéticas (ND) y ratas diabéticas (D) inyectadas intravitrealmente con vehículo (Veh) o el vector AAV2 Vasoinhibinas (Vi) dos semanas después del tratamiento con STZ y sometidas a fluoroangiografía 4 semanas después de la administración del vector. Las cabezas de flechas indican los microvasos. Las flechas indican los segmentos capilares cortos verticales que conectan las capas superficiales y profundas de la capa interna de la retina. Barra de calibración 200  $\mu$ m. **(B)** Cuantificación de la señal fluorescente proveniente de la microvasculatura de la retina por área. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE. Los números dentro de las barras indican la cantidad de retinas evaluadas.

#### VIII.4 El vector de AAV2-vasoinhibinas reduce la disfunción electrofisiológica de la retina producida por la diabetes

Otro parámetro importante es el estado funcional de la retina esto lo llevamos a cabo mediante electroretinograma. En la Figura 15 A se muestran registros electrofisiológicos representativos obtenidos bajo condiciones escotópicas (en oscuridad ambiental) en animales no diabéticos y diabéticos inyectados con vehículo o con los vectores AAV2-vasoinhibinas. El análisis cuantitativo de los electroretinogramas mostró que la amplitud de la onda A permanece similar en todos los grupos analizados (Figura 15B), pero que la amplitud de la onda B disminuye en las ratas diabéticas controles (inyectadas intravitrealmente con vehículo) (Figura 15 C). Es importante mencionar que la reducción en la onda B que se observa en las ratas diabéticas tratadas con los vectores AAV2-vasoinhibinas no fue estadísticamente diferente en comparación con los animales controles no diabéticos inyectados con vehículo; adicionalmente los vectores no modificaron la amplitud de la onda B en los animales no diabéticos.

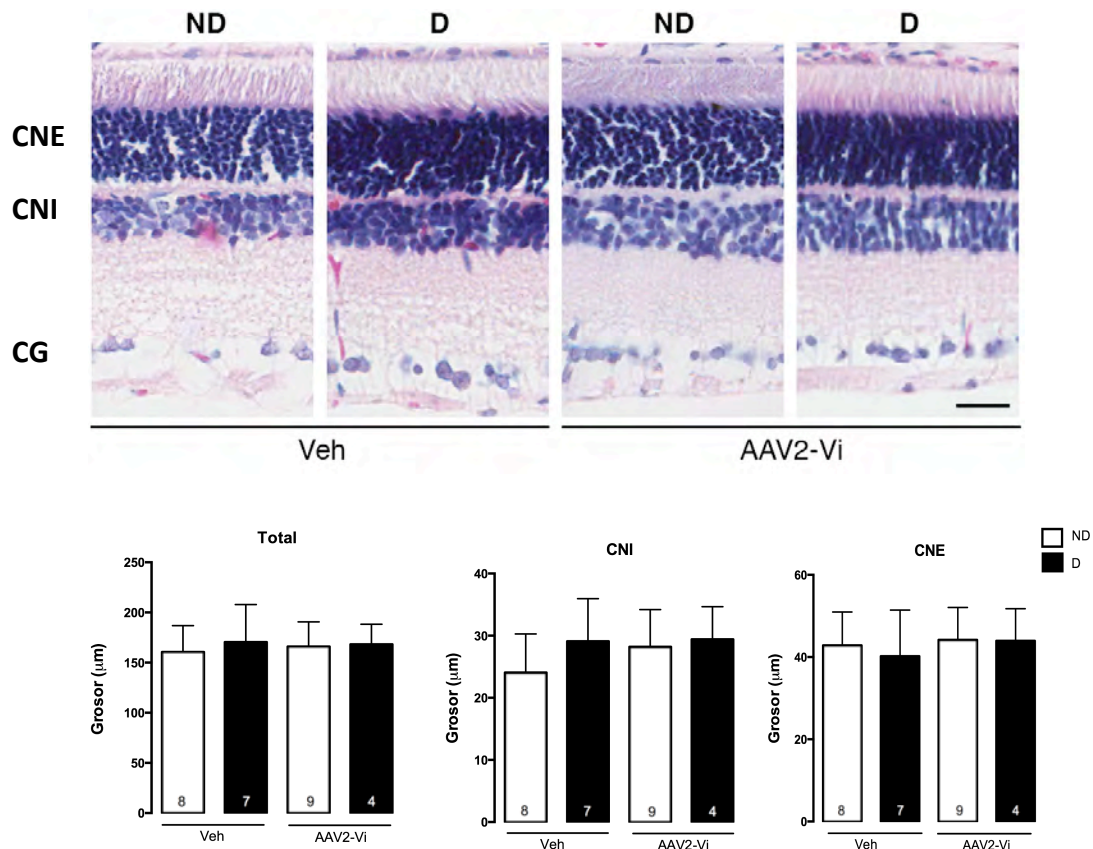


**Figura 15.- El vector AAV2-vasoinhibinas reduce la disfunción electrofisiológica en la retina debida a la diabetes. (A)** Registros de electroretinograma (ERG) representativos de las ratas controles no diabéticas (ND) y diabéticas (D) inyectadas intravitrealmente con vehículo (Veh) o con el vector AAV2-vasoinhibinas (Vi) dos semanas después del tratamiento con STZ y sometidas al electroretinograma (ERG) 4 semanas después de la

administración del vector. Promedio  $\pm$  EE de la amplitud de la onda A escotópica **(B)** y la onda B escotópica **(C)**. El número de retinas independientes por grupo se indicada dentro de cada barra.

### VIII.5 Los vectores AAV2-vasoinhibinas no producen cambios en la histología de la retina

Para continuar con el análisis de la bioseguridad de los vectores AAV2-vasoinhibinas, también evaluamos la histología retiniana después de 4 semanas de la inyección intravitreal (con AAV2 Vi o vehículo) tanto en animales controles no diabéticos como diabéticos. Para ello realizamos tinción con hematoxilina y eosina de secciones retinianas y cuantificamos el grosor total de la retina así como de la capa nuclear interna y externa; posteriormente hicimos las comparaciones entre los diferentes grupos de animales. Como se observa en las imágenes representativas de los diferentes grupos (Figura 16A), la estructura y grosor de las capas retinianas fue similar entre los grupos. El análisis cuantitativo del grosor total y del grosor de las capas nucleares externa e interna corroboró estos hallazgos.



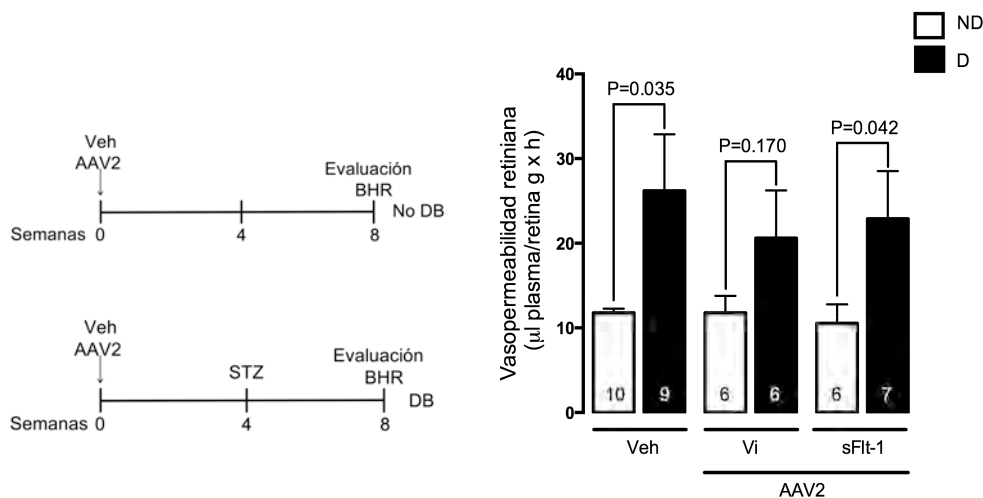
**Figura 16.- Análisis histológico de la retina.** Imágenes representativas de secciones de retina teñidas con hematoxilina y eosina de ratas controles no diabéticas (ND) y ratas diabéticas (D) inyectadas intravítreamente con vehículo (Veh) o vectores AAV2-vasoinhibinas (Vi) **(A)**. 2 semanas después del tratamiento con STZ y 4 semanas después de la administración del vector se cuantificó el grosor total de la retina y de la capa nuclear interna (CNI) y externa (CNE) **(B)**. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE. Los números dentro de las barras indican la cantidad de retinas evaluadas.

#### **VIII.6 La diabetes aumenta la eficacia de transducción y la expresión de los transgenes y transducción de los vectores AAV2 en la retina.**

La protección contra la ruptura de la BHR observada cuando el vector se aplica en el protocolo terapéutico (después de la inducción del cuadro diabético) no se observó cuando utilizamos el protocolo profiláctico (cuando los vectores se inyectaron antes de inducir la diabetes). En este experimento, la misma dosis de cada vector ( $2.8 \times 10^9$  gv), usada en el protocolo terapéutico, se inyectó 4 semanas antes de inducir diabetes, y la ruptura de la BHR se evaluó 4 semanas después de la inducción de la diabetes (Figura 17). El aumento en la ruptura de la BHR debida a la diabetes no fue estadísticamente diferente en las retinas que fueron transducidas con los vectores de AAV2 Vi, sugiriendo un posible efecto protector, aunque pequeño de las vasoinhibinas. Sin embargo, los vectores que codificaba para el AAV2 sFlt1 no fueron capaces de inhibir la ruptura de la BHR debida a la diabetes (Figura 17). Esto sugiere que la diabetes aumenta la eficacia de los vectores AAV2-vasoinhibinas y AAV2 sFlt-1 para reducir la ruptura de la BHR.

Diferencias en el diseño experimental entre los protocolos preventivo y terapéutico en relación al tiempo de diabetes y a las semanas de exposición a los vectores no parecen responsables de su eficacia desigual. El tiempo diferente de diabetes (6 y 4 semanas) después de la inyección con STZ resulta en niveles similares en la medición de la vasopermeabilidad de la retina por el método de azul de Evans (Figura 12). Además, como se mostró en la Figura 13 el tiempo menor después de la administración de AAV2 (4 vs 8

semanas) en el grupo terapéutico tuvo una mayor eficacia aún cuando la expresión de los transgenes aumenta con el tiempo posterior a su administración (Figura 11B).



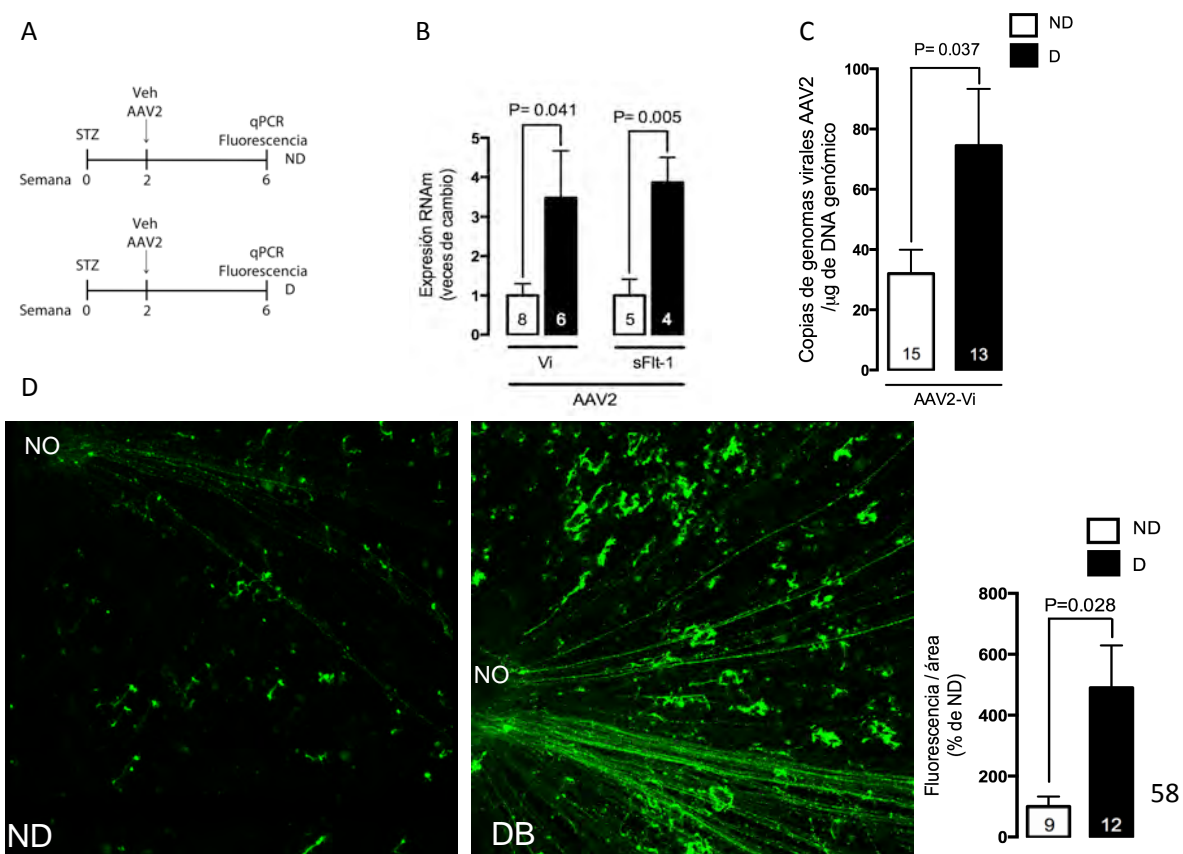
**Figura 17.- Los vectores AAV2-vasoinhibinas y AAV2-sFlt-1 son incapaces de reducir la ruptura de la BHR cuando se administran antes de inducir el cuadro diabético.** Esquema experimental profiláctico (pre-diabetes): vehículo (Veh) o los vectores AAV2-vasoinhibinas (Vi) o AAV2-sFlt-1 fueron administrados intravitrealmente en ratas diabéticas (DB) o no diabéticas (No DB) cuatro semanas antes del tratamiento con STZ. La evaluación de la integridad de la BHR se realizó 8 semanas después de la administración de los vectores. Las barras representan los promedios  $\pm$  EE. El número de retinas independientes por grupo está indicado dentro de cada barra.

Para poner a prueba la posibilidad de que el aumento en la eficacia de los vectores pudiera deberse a un aumento en la expresión de los transgenes en la retina de las ratas diabéticas, comparamos los niveles de expresión del RNAm de vasoinhibinas y sFlt-1 codificados por los vectores AAV2, cuatro semanas después de haberlos administrados intravitrealmente en las ratas no diabéticas y diabéticas (Figura 18A). El análisis de la expresión mediante PCR cuantitativa (qPCR) mostró que la expresión retiniana de los transgenes de vasoinhibinas y sFlt-1 fue 4 veces mayor en las retinas de ratas diabéticas en comparación con la de las retinas de las ratas no diabéticas (Figura 18B). Con el objetivo de analizar el efecto de la diabetes sobre la transducción de los vectores AAV2, decidimos utilizar un AAV2 que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) como



gen reportero. El AAV2-GFP fue inyectado intravitrealmente en ratas no diabéticas o en ratas diabéticas dos semanas después del tratamiento con STZ y los niveles de GFP se evaluaron mediante fluorescencia directa en montajes planos de retinas cuatro semanas después de la administración de los vectores. La marca fluorescente se observó en múltiples somas y proyecciones celulares. Una gran cantidad de estas células corresponden a las neuronas ganglionares debido a la presencia de fluorescencia en los axones en camino de constituir el nervio óptico (Figura 18D). En la retina de ratas diabéticas hubo un aumento de 5 veces la intensidad de fluorescencia en relación a la observada en las ratas controles no diabéticas (Figura 18D).

Para investigar la posibilidad de que el aumento en la expresión de los transgenes pudiera deberse a una mayor incorporación viral en la retina de animales diabéticos, cuantificamos las copias de los genomas virales por qPCR a las 4 semanas después de que los vectores se aplicaron intravitrealmente en ratas diabéticas y no diabéticas (Figura 18C). Los niveles de genomas virales de los AAV2 aumentaron de manera significativa en la retina de ratas diabéticas al compararlos contra los de ratas controles no diabéticas.

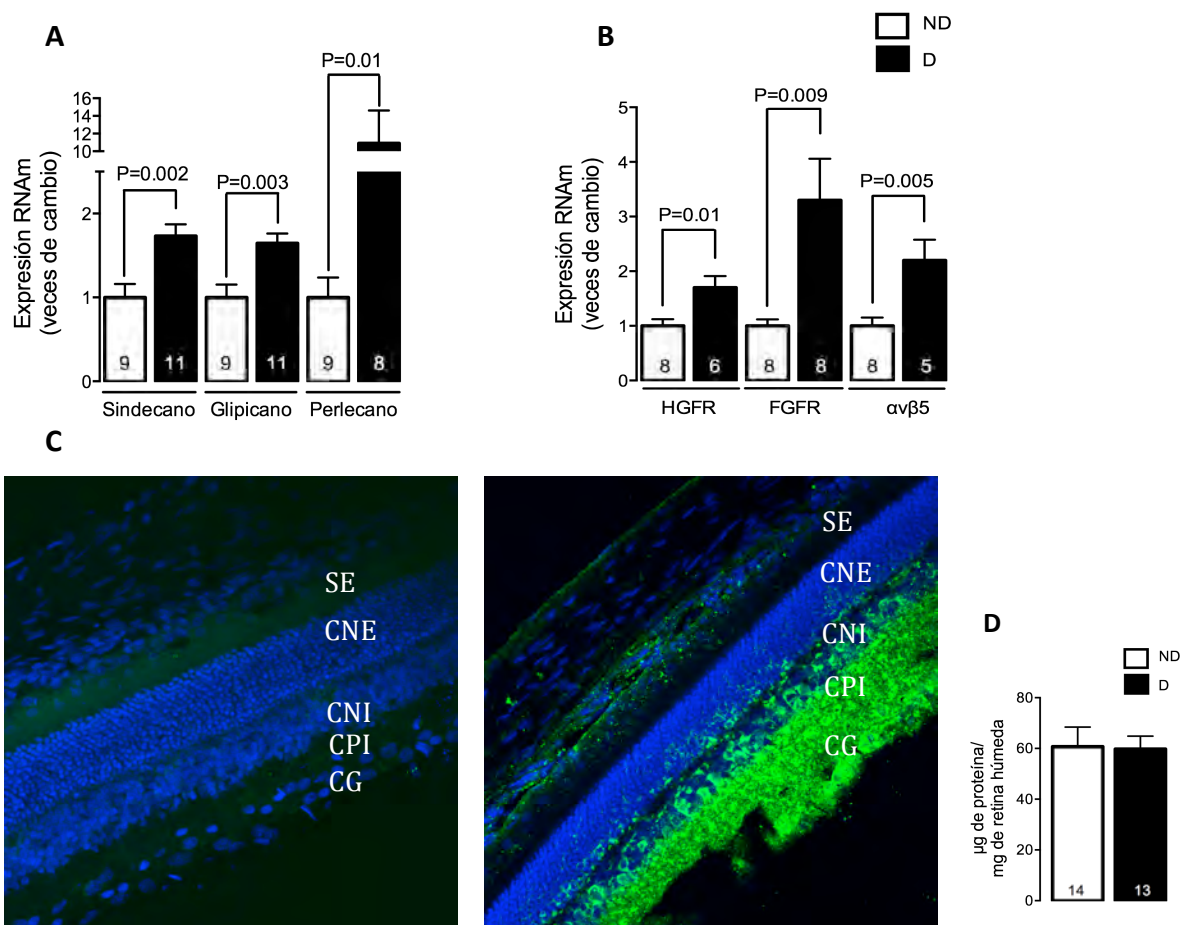


**Figura 18.- La diabetes aumenta la expresión y transducción de los AAV2 en la retina. (A)** Diagrama experimental del protocolo curativo (post-diabetes): vectores de AAV2-vaso-inhibinas (Vi), AAV2-sFlt-1, o AAV2-EGFP se administraron intravitrealmente en ratas controles no diabéticas (ND) o en ratas diabéticas (D) dos semanas después del tratamiento con STZ y la expresión del RNAm de Vi y de sFlt-1 y los niveles de GFP fueron evaluados por qPCR y fluorescencia directa en montajes planos de retina, respectivamente. **(B)** Cuantificación del RNAm de Vi y sFlt-1 por qRT-PCR en retinas de ratas ND y D transducidas con vectores AAV2 Vi y AAV2 sFlt-1. **(C)** Cuantificación por qPCR de la cantidad de copias de genoma viral en retinas de ratas ND y D transducidas con los vectores AAV2 **(D)** Imágenes representativas obtenidas por microscopia confocal donde se visualiza la fluorescencia directa emitida por la EGFP en la capa de células ganglionares de retinas en montajes planos provenientes de ratas ND y D transducidas con el vector AAV2-GFP. Nervio óptico, NO. Las barras representan los promedios  $\pm$  EE. El número de retinas independientes por grupo está indicado dentro de cada barra.

#### **VIII.7. La expresión de los receptores primarios y co-receptores de los AAV2 se eleva en la retina de ratas diabéticas**

La eficiencia de la transducción está influenciada por la unión de los AAV2 mediada por los receptores y co-receptores<sup>149</sup>. Investigamos si la abundancia de los receptores y co-receptores de los AAV2 es mayor en la retina de una rata diabética en relación con la de una rata no diabética. Para esto, evaluamos mediante qPCR los niveles del RNAm de los receptores primarios de los AAV2 (glipicano, sindecano y perlecano)<sup>191</sup> y de co-receptores [FGFR1 (receptor para el factor de crecimiento fibroblástico 1)<sup>192</sup>, integrina  $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ <sup>193</sup>, y el receptor para factor de crecimiento hepático c-Met, (HGFR)<sup>194</sup>] de los AAV2 en retinas de ratas no diabéticas y ratas diabéticas por 6 semanas. La expresión de los tres receptores primarios (Figura 19A) y la de los 3 co-receptores (Figura 19B) aumentó de manera significativa en la retina de ratas diabéticas en comparación con la condición no diabética. De manera consistente con estos hallazgos, la inmunoreactividad para FGFR1 en las retinas de ratas no diabéticas fue tenue y difusa en los segmentos externos de los fotorreceptores mientras que se incrementó de manera significativa en toda la retina de las ratas diabéticas (Figura 19C). La marca fluorescente anti-FGFR1 fue intensa en la retina

interna (capa nuclear interna, capa plexiforme interna, y capa de células ganglionares) y menos marcada en la retina externa (capa nuclear externa y segmentos externos de los fotorreceptores) así como en la coroides de ratas diabéticas. El aumento en la expresión de los receptores y co-receptores para los AAV2 no refleja un aumento general inespecífico en la síntesis de proteínas ya que los niveles de proteína total permanecieron similares en las retinas de ratas diabéticas y ratas no diabéticas (Figura 19D).



**Figura 19.- La expresión de los receptores primarios y co-receptores de los AAV2 es mayor en la retina de ratas diabéticas.** Cuantificación de los niveles del RNAm mediante qRT-PCR de los receptores de los AAV2 (glipicano, sindecano y perlecano) **(A)** y de los co-receptores (receptor del factor de crecimiento fibroblástico 1 (FGFR1)), integrina  $\alpha\beta 5$  y receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR) **(B)**. **(C)** Imágenes representativas de secciones de retina reveladas mediante inmunofluorescencia contra el FGFR1 provenientes de una rata control (izquierda) y una rata con 6 semanas de diabetes (derecha). SE, segmentos externos de los fotorreceptores; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CG, capa de células ganglionares. **(D)** Nivel total de proteína en

retinas de ratas no diabéticas (ND) o de ratas de 6 semanas de diabetes (D). Las barras representan los promedios  $\pm$  EE. El número de retinas por grupo se indica dentro de las barras.

## IX. DISCUSIÓN

La RD, es una de las complicaciones más comunes de la diabetes mellitus, es la principal causa de ceguera en el mundo en personas en edad laboral. En la RD tiene lugar un aumento en el transporte a través de la BHR que es responsable en gran medida de la pérdida de la visión provocada por la diabetes<sup>195</sup>. Al producir una expresión estable de moléculas antiangiogénicas e inhibidoras de la vasopermeabilidad, los vectores derivados de AAV, son capaces de eliminar los riesgos asociados con la farmacoterapia intraocular repetida, y de esta manera ofrecen una opción alternativa para el tratamiento de la RD. Nuestros resultados muestran que la disrupción que se observa en la patología de la BHR debida a la diabetes es revertida con la inyección intravitreal de los vectores AAV2 que codifican para los factores antiangiogénicos e inhibidores de la permeabilidad vascular, sFlt-1 y las vasoinhibinas. Además, encontramos que la condición de diabetes aumenta de manera substancial la transducción retiniana y la efectividad de los transgenes codificados por los AAV2.

El VEGF tiene una participación muy importante en el desarrollo de las alteraciones vasculares observadas en la RD<sup>132</sup>. Es el principal promotor de la ruptura de la BHR, por ello lo que se ha llevado a cabo un esfuerzo importante para analizar el impacto de moléculas anti-VEGF en la clínica con resultados promisorios<sup>196, 197</sup>. Dentro de los agentes anti-VEGF se encuentra el sFlt-1, que corresponde al dominio extracelular secretado del receptor de VEGF 1 y que bloquea la acción del VEGF a través de secuestrarlo<sup>198</sup>. Las vasoinhibinas son una familia de péptidos generados a partir del corte proteolítico específico de la hormona prolactina y tienen efectos antiangiogénicos, vasoconstrictores e inhibidores de la vasopermeabilidad muy potentes<sup>16</sup>. Las vasoinhibinas se encuentran de manera endógena en la retina y su concentración sistémica se reduce en pacientes con RD<sup>199</sup>. Las Vi son capaces de inhibir la angiogénesis retiniana en un modelo de retinopatía proliferativa inducida por oxígeno en ratones<sup>200</sup>; además, reducen los efectos de la diabetes sobre la

ruptura de la BHR a través de acciones sobre componentes tanto de la barrera hemato-retiniana interna (células endoteliales vasculares) y de la barrera hemato-retiniana externa (epitelio pigmentario retiniano)<sup>177, 201</sup>.

Los efectos de las vasoinhibinas<sup>13, 177, 201</sup> y de el sFlt-1<sup>202, 203</sup> están bien documentados usando tanto la técnica de azul de Evans así como una gran variedad de técnicas tanto in vivo como in vitro que demuestran los mecanismo de señalización involucrados en sus acciones. Por mencionar algunos ejemplos, los antagonistas de VEGF y vasoinhibinas bloquean el flujo intracelular de calcio que se da através de los canales iónicos receptores de potencial transitorio; adicionalmente inhiben la activación de la fosfolipasa C gamma y mecanismos del fosfatidilinositol 3-kinasa-Akt, que llevan al bloqueo abajo de la activación de la sintasa de oxido nítrico endotelial (eNOS) y el reforzamiento de las proteínas de unión a la actina del citoesqueleto<sup>177, 178, 201, 204, 205</sup>.

La transferencia génica de sFlt-1 mediada por los AAV, reduce de manera exitosa la ruptura de la BHR cuando el vector es administrado antes que el cuadro diabético se manifieste en la rata diabética Torii<sup>202</sup>. Los vectores AAV2 que codifican para sFlt-1 o para las vasoinhibinas reducen la ruptura de la barrera hemato-retiniana cuando son inyectados antes de inducir el padecimiento diabético con STZ<sup>13</sup>. Si bien estos resultados demuestran el efecto preventivo de los vectores en contra de la pérdida de la integridad de la BHR debida a la diabetes, surge la pregunta de si los vectores AAV2 son capaces no sólo de prevenir la ruptura de la BHR sino también de revertirla.

Los AAV2-vasoinibinas reducen otros aspectos de la enfermedad retiniana que se observan en el modelo murino de diabetes inducida por estreptozotocina. Son capaces de inhibir la reducción en la intensidad de fluorescencia dentro de los capilares sanguíneos de la retina, que puede estar causado por diversos factores asociados con anormalidades en la perfusión; como disminución en el flujo sanguíneo<sup>188</sup>, la baja oxigenación en la retina<sup>206</sup> y la ruptura de la BHR<sup>188</sup> presentes resultados. Adicionalmente, la amplitud de la onda B, pero no la de la onda A del ERG, generalmente se encuentra disminuida en el modelo murino de diabetes inducida por STZ<sup>189, 207, 208</sup>, y con la administración intravitreal de los

AAV2-vasoinhibinas se mejoró este aspecto. Apoyando la bioseguridad del uso del vector de AAV2-vasoinhibinas al probarlo en ratas no diabéticas no provocó ninguna modificación ni en el lecho vascular de la retina ni a nivel electrofisiológico evaluado mediante el ERG. Por último nosotros estudiamos el efecto sobre el grosor retiniano, dado por la neurodegeneración de la retina interna, que provoca una disminución en el grosor, observado en pacientes diabéticos<sup>209-212</sup> y en algunos<sup>23, 213-215</sup> pero no en todos<sup>216</sup> los estudios con roedores diabéticos. Nosotros confirmamos que el adelgazamiento en la retina no se da a las 6 semanas después del tratamiento con estreptozotocina<sup>214, 215</sup> y mostramos que los vectores de AAV2-vasoinhibinas tampoco modifican este parámetro en ratas no diabéticas. Estos hallazgos sugieren que la expresión de vasoinhibinas por los AAV2, como se ha reportado para el sFlt-1<sup>217</sup>, es un procedimiento seguro, que no provoca cambios retinianos evidentes y además protegen en contra de alteraciones microvasculares en la retina así como de cambios y pérdida de la función electrofisiológica en la retina en condiciones de diabetes.

Los resultados de la presente tesis demuestran que los vectores AAV2- vasoinhibinas y sFlt-1, a una dosis 10 veces menor a la usada en el estudio previo referido arriba ( $2.8 \times 10^9$  gv vs  $2.8 \times 10^{10}$ )<sup>13</sup>, revierten la ruptura de la BHR cuando son inyectados una vez que la diabetes está establecida. Por lo tanto, ambos vectores revierten una alteración retiniana causante de disfunción visual en la RD. El hecho de que la inhibición ocurra a una dosis 10 veces menor que la anteriormente probada, resalta la eficacia de esta terapia génica. Sin embargo, con esta misma dosis pequeña y los mismos parámetros experimentales de nuestro reporte previo<sup>13</sup>, no fuimos capaces de observar un efecto preventivo con ninguno de los dos vectores. Este resultado puede estar relacionado con la dosis baja que utilizamos y/o a la menor cantidad de animales que utilizamos en el estudio en curso. Sin embargo, los vectores de vasoinhibinas y sFlt-1 revirtieron completamente la ruptura de la BHR cuando fueron administrados después de la inducción de diabetes. La mayor eficacia no se debió al menor tiempo de acción que tuvieron los vectores posterior a su administración en el protocolo terapéutico vs el protocolo profiláctico, ya que la transducción de ambos

vectores aumenta con el tiempo. Por lo cual es muy probable que la eficacia de los vectores AAV2 este siendo potenciada por la condición de la diabetes.

La expresión de los transgenes aumentó en la retina de los animales diabéticos. Los niveles de RNAm (vasoinhibinas y sFlt-1) y de la proteína (GFP) aumentaron 4 y 5 veces en las retinas de ratas diabéticas vs. las no diabéticas. En consistencia con el tropismo reportado para los vectores AAV2 que se administran de manera intravitreal, el aumento en la transducción de los AAV2 ocurrió a nivel de la retina interna, particularmente en los somas de células ganglionares y en sus proyecciones que conforman el nervio óptico. Estos datos apuntan a que la condición de diabetes potencia la acción de los vectores AAV2 al aumentar su transducción en células permisivas. Esta expresión del transgen puede estar facilitada en parte por un incremento en la abundancia de los receptores y co-receptores para los AAV2 que favorecen su incorporación celular.

Los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) son glicoproteínas que contienen una o más cadenas de heparán sulfato (HS), y se ha descrito que determinantes estructurales de las cadenas de HS interactúan con las proteínas de la cápside de los AAV2<sup>218</sup>. Los HSPG asociados con las membranas celulares (sindecanos y glipicanos) sirven como receptores primarios permitiendo la interacción inicial con el vector; asimismo la entrada endosomal se ve favorecida con la ayuda de los co-receptores de los AAV2 (el FGR1, la integrina  $\alpha\beta5$ , y el HGFR c-Met). Además, los HSPG que se encuentran anclados a la matriz extracelular (perlecanos) ayudan a almacenar y concentrar los vectores AAV2, permitiendo de esta manera la presentación de los vectores para su unión y entrada mediada por los receptores<sup>219</sup>. Encontramos de manera interesante que los niveles de RNAm de los componentes proteicos del sindecano 4, glipicano 1 y perlecano 1; y de los tres co-receptores (FGFR1,  $\alpha\beta5$ , y HGFR c-Met) aumentan en la retina de la rata diabética en relación a la de los animales no diabéticos.

El aumento en los niveles de HSPG y de los co-receptores para AAV2 en la RD no es del todo inesperado y existen evidencias de que estas moléculas podrían contribuir a su progresión. Los niveles altos de glucosa aumentan la expresión de proteoglicanos en

pericitos retinianos<sup>220</sup> y promueven la secreción de cadenas de HS por parte de las células endoteliales<sup>221</sup>; además el VEGF aumenta la expresión en la retina de cadenas de HS de los HSPG<sup>222</sup>. El perlecano se une al bFGF<sup>223, 224</sup> y se ha descrito que los almacenes intraretinianos de bFGF inmunoreactivo y HSPG aumentan en pacientes con RD<sup>225</sup>. Es de notar que la expresión y estructura anormal de los HSPG pueden contribuir a la permeabilidad vascular y a la liberación de factores proangiogénicos en la RD<sup>226</sup> y que el bFGF, la integrina  $\alpha\beta 5$ , y el factor de crecimiento de hepatocitos son capaces de promover la angiogénesis en la RD<sup>227</sup>. Sin embargo contrario a lo esperado tomando en cuenta nuestros hallazgos, cuando se usan ratas después de 6 semanas con STZ, los niveles de RNAm del perlecán, la incorporación de sulfato en los HSPG<sup>228</sup> (<sup>35</sup>S) y la inmunolocalización de HSPG<sup>229</sup> disminuye en las ratas diabéticas después de 5 y 11 meses del tratamiento con STZ, respectivamente. Estos resultados sugieren que la síntesis de HSPG puede cambiar conforme la diabetes progresa y apoya la necesidad de examinar la eficacia a largo plazo de los vectores AAV2.

Aunque la abundancia de los receptores y co-receptores para los AAV2 se correlaciona directamente con la eficacia de los vectores AAV2<sup>145, 230, 231</sup> existen otros eventos importantes que pueden favorecer la entrada de los vectores y su transducción en la diabetes. La diabetes altera la función y estructura de todos los tipos celulares de la retina<sup>232</sup> y la pérdida de la integridad y cambios en la arquitectura retiniana son procesos que se sabe aumentan la transducción de los vectores AAV<sup>233</sup>. La disrupción de la membrana interna causada por la digestión proteolítica moderada<sup>234</sup> por cambios estructurales en las células de Müller<sup>235</sup>, por el pre-tratamiento con láser<sup>233</sup> o debido a la degeneración de la retina<sup>234</sup> permite un aumento en la transducción de los AAV en la región de la retina externa después de una administración intravitreal de los vectores.

Además, los eventos que conllevan a la entrada nuclear, desensamble de la cápside y síntesis de la doble cadena de DNA aunado a la unión al receptor de entrada son los principales pasos limitantes en la transducción de los AAV<sup>236, 237</sup> que se necesitan continuar investigando.



## X. CONCLUSIONES

El presente trabajo demuestra el potencial terapéutico de dos vectores AAV2 que codifican para factores inhibidores de la vasopermeabilidad y anti-angiogénesis cuando se administran durante las manifestaciones de la RD (ruptura de la BHR). Si bien la inyección intravitreal de los vectores es un procedimiento seguro, la eficacia de su transducción en la retina puede ser deficiente<sup>145</sup> y el uso de dosis altas del vector incrementa el riesgo de una diseminación sistémica y de la activación del sistema inmune<sup>179</sup>. El hecho que hayamos demostrado que la eficacia y transducción del vector después de su administración intravitreal aumenta bajo condiciones de diabetes provee una manera de superar estos problemas y apoya el uso de los AAV2 como vehículos de transferencia génica para el tratamiento de la RD y del EMD.

Estudios en curso están validando el uso de dosis inclusive menores de AAV2-Vi y AAV2-sFlt-1 en animales diabéticos. De manera paralela continuamos dilucidando mecanismos alternativos que podrían estar involucrados en el efecto que tiene la diabetes favoreciendo la eficacia y expresión de los AAV2. Adicionalmente nos interesa conocer si los mecanismos involucrados son exclusivos para el serotipo 2 de los AAV o si observaciones equivalentes se pueden trasladar al uso de otros serotipos.

## XI. REFERENCIAS

1. Wong TY, Cheung CM, Larsen M, Sharma S, Simo R. Diabetic retinopathy. *Nature reviews Disease primers* 2016;2:16012.
2. Song SJ, Wong TY. Current concepts in diabetic retinopathy. *Diabetes & metabolism journal* 2014;38:416-425.
3. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet* 2010;376:124-136.
4. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-820.
5. Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy. Clinical application of Diabetic Retinopathy Study (DRS) findings, DRS Report Number 8. The Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology* 1981;88:583-600.
6. Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology* 1991;98:766-785.
7. Ciulla TA, Amador AG, Zinman B. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema: pathophysiology, screening, and novel therapies. *Diabetes care* 2003;26:2653-2664.
8. Early vitrectomy for severe proliferative diabetic retinopathy in eyes with useful vision. Results of a randomized trial--Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Report 3. The Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group. *Ophthalmology* 1988;95:1307-1320.
9. Siemerink MJ, Augustin AJ, Schlingemann RO. Mechanisms of ocular angiogenesis and its molecular mediators. *Developments in ophthalmology* 2010;46:4-20.
10. Waisbourd M, Goldstein M, Loewenstein A. Treatment of diabetic retinopathy with anti-VEGF drugs. *Acta ophthalmologica* 2011;89:203-207.
11. Auricchio A, Rolling F. Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer and treatment of retinal diseases. *Current gene therapy* 2005;5:339-348.
12. Simonelli F, Maguire AM, Testa F, et al. Gene Therapy for Leber's Congenital Amaurosis is Safe and Effective Through 1.5 Years After Vector Administration. *Mol Ther* 2010;18:643-650.
13. Ramirez M, Wu Z, Moreno-Carranza B, et al. Vasoinhibin gene transfer by adenoassociated virus type 2 protects against VEGF- and diabetes-induced retinal vasopermeability. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011;52:8944-8950.

14. Verma A, Shan Z, Lei B, et al. ACE2 and Ang-(1-7) confer protection against development of diabetic retinopathy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2012;20:28-36.
15. Shyong MP, Lee FL, Kuo PC, et al. Reduction of experimental diabetic vascular leakage by delivery of angiostatin with a recombinant adeno-associated virus vector. *Molecular vision* 2007;13:133-141.
16. Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martinez De La Escalera G. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiological reviews* 2009;89:1177-1215.
17. Kolb H. Simple Anatomy of the Retina. 1995.
18. Hedberg-Buenz A, Christopher MA, Lewis CJ, et al. Quantitative measurement of retinal ganglion cell populations via histology-based random forest classification. *Experimental eye research* 2016;146:370-385.
19. Morris HJ, Blanco L, Codona JL, Li SL, Choi SS, Doble N. Directionality of individual cone photoreceptors in the parafoveal region. *Vision research* 2015;117:67-80.
20. Toomey MB, Collins AM, Frederiksen R, Cornwall MC, Timlin JA, Corbo JC. A complex carotenoid palette tunes avian colour vision. *Journal of the Royal Society, Interface* 2015;12:20150563.
21. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes care* 2012;35:556-564.
22. Linsenmeier RA, Braun RD, McRipley MA, et al. Retinal hypoxia in long-term diabetic cats. *Investigative ophthalmology & visual science* 1998;39:1647-1657.
23. Berkowitz BA, Roberts R, Stemmler A, Luan H, Gadianu M. Impaired apparent ion demand in experimental diabetic retinopathy: correction by lipoic Acid. *Investigative ophthalmology & visual science* 2007;48:4753-4758.
24. Liu J. The Anatomy and Physiology of Direction-Selective Retinal Ganglion Cells. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R (eds), *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT); 1995.
25. Shen L, You QS, Xu X, et al. Scleral Thickness in Chinese Eyes. *Investigative ophthalmology & visual science* 2015;56:2720-2727.
26. Leung LC, Harris WA, Holt CE, Piper M. NF-Protocadherin Regulates Retinal Ganglion Cell Axon Behaviour in the Developing Visual System. *PLoS one* 2015;10:e0141290.

27. Dona M, Bachmann-Gagescu R, Texier Y, et al. NINL and DZANK1 Co-function in Vesicle Transport and Are Essential for Photoreceptor Development in Zebrafish. *PLoS genetics* 2015;11:e1005574.
28. Pasovic L, Eidet JR, Brusletto BS, Lyberg T, Utheim TP. Effect of Storage Temperature on Key Functions of Cultured Retinal Pigment Epithelial Cells. *Journal of ophthalmology* 2015;2015:263756.
29. Grosche A, Hauser A, Lepper MF, et al. The Proteome of Native Adult Muller Glial Cells From Murine Retina. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2016;15:462-480.
30. Haines D. *Fundamental Neuroscience for basic and clinical applications*: Elsevier; 2006.
31. Bressler NM, Beck RW, Ferris FL, 3rd. Panretinal photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy. *The New England journal of medicine* 2011;365:1520-1526.
32. Jousseaume AM, Kirchoff B, Ryan SJ. *Retinal Vascular Disease*: Springer; 2007.
33. Agemy SA, Sripetchavan NK, Shah CM, et al. Retinal Vascular Perfusion Density Mapping Using Optical Coherence Tomography Angiography in Normals and Diabetic Retinopathy Patients. *Retina* 2015;35:2353-2363.
34. Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C. Blood-retinal barrier. *European journal of ophthalmology* 2011;21 Suppl 6:S3-9.
35. Korte GE, Burns MS, Bellhorn RW. Epithelium-capillary interactions in the eye: the retinal pigment epithelium and the choriocapillaris. *International review of cytology* 1989;114:221-248.
36. Yousif LF, Di Russo J, Sorokin L. Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. *Cell adhesion & migration* 2013;7:101-110.
37. Bharadwaj AS, Appukuttan B, Wilmarth PA, et al. Role of the retinal vascular endothelial cell in ocular disease. *Progress in retinal and eye research* 2013;32:102-180.
38. Hammes HP, Lin J, Renner O, et al. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* 2002;51:3107-3112.
39. Ye X, Wang Y, Nathans J. The Norrin/Frizzled4 signaling pathway in retinal vascular development and disease. *Trends in molecular medicine* 2010;16:417-425.
40. Paniagua AE, Herranz-Martin S, Jimeno D, et al. CRB2 completes a fully expressed Crumbs complex in the Retinal Pigment Epithelium. *Sci Rep* 2015;5:14504.
41. Dansingani KK, Balaratnasingam C, Klufas MA, Sarraf D, Freund KB. Optical Coherence Tomography Angiography of Shallow Irregular Pigment Epithelial Detachments In Pachychoroid Spectrum Disease. *American journal of ophthalmology* 2015;160:1243-1254 e1242.

42. Dansingani KK, Balaratnasingam C, Naysan J, Freund KB. En Face Imaging of Pachychoroid Spectrum Disorders with Swept-Source Optical Coherence Tomography. *Retina* 2015.
43. Group IDFDA. Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: Estimates for the year 2013. *Diabetes research and clinical practice* 2015;109:461-465.
44. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes research and clinical practice* 2014;103:137-149.
45. Donnelly R, Emslie-Smith AM, Gardner ID, Morris AD. ABC of arterial and venous disease: vascular complications of diabetes. *Bmj* 2000;320:1062-1066.
46. Ding J, Wong TY. Current epidemiology of diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Current diabetes reports* 2012;12:346-354.
47. Ryan Lee TYWaCS. Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss. *Eye and Vision* 2015;2.
48. Klein BE. Overview of epidemiologic studies of diabetic retinopathy. *Ophthalmic epidemiology* 2007;14:179-183.
49. Mohamed Q, Gillies MC, Wong TY. Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *Jama* 2007;298:902-916.
50. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *The New England journal of medicine* 1993;329:977-986.
51. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998;352:837-853.
52. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *Bmj* 1998;317:703-713.
53. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Archives of ophthalmology* 1984;102:527-532.
54. Kumari S, Panda S, Mangaraj M, Mandal MK, Mahapatra PC. Plasma MDA and antioxidant vitamins in diabetic retinopathy. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB* 2008;23:158-162.
55. Photocoagulation for diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report number 1. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study research group. *Archives of ophthalmology* 1985;103:1796-1806.

56. Early vitrectomy for severe vitreous hemorrhage in diabetic retinopathy. Two-year results of a randomized trial. Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study report 2. The Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group. *Archives of ophthalmology* 1985;103:1644-1652.
57. Treatment techniques and clinical guidelines for photocoagulation of diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report Number 2. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology* 1987;94:761-774.
58. Ribeiro L, Bandello F, Tejerina AN, et al. Characterization of Retinal Disease Progression in a 1-Year Longitudinal Study of Eyes With Mild Nonproliferative Retinopathy in Diabetes Type 2. *Investigative ophthalmology & visual science* 2015;56:5698-5705.
59. Mann JF, Lonn EM, Yi Q, et al. Effects of vitamin E on cardiovascular outcomes in people with mild-to-moderate renal insufficiency: results of the HOPE study. *Kidney international* 2004;65:1375-1380.
60. Stitt AW, Curtis TM, Chen M, et al. The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Progress in retinal and eye research* 2015.
61. Stem MS, Gardner TW. Neurodegeneration in the pathogenesis of diabetic retinopathy: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Current medicinal chemistry* 2013;20:3241-3250.
62. Simo R, Hernandez C, European Consortium for the Early Treatment of Diabetic R. Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2014;25:23-33.
63. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005;54:1615-1625.
64. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998;47:859-866.
65. Donnelly R, Idris I, Forrester JV. Protein kinase C inhibition and diabetic retinopathy: a shot in the dark at translational research. *The British journal of ophthalmology* 2004;88:145-151.
66. Kandarakis SA, Piperi C, Topouzis F, Papavassiliou AG. Emerging role of advanced glycation-end products (AGEs) in the pathobiology of eye diseases. *Progress in retinal and eye research* 2014;42:85-102.
67. Tang J, Kern TS. Inflammation in diabetic retinopathy. *Progress in retinal and eye research* 2011;30:343-358.
68. Wilkinson-Berka JL, Agrotis A, Deliyanti D. The retinal renin-angiotensin system: roles of angiotensin II and aldosterone. *Peptides* 2012;36:142-150.

69. Zhang SX, Sanders E, Fliesler SJ, Wang JJ. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein responses in retinal degeneration. *Experimental eye research* 2014;125:30-40.
70. Nakamura N, Hasegawa G, Obayashi H, et al. Increased concentration of pentosidine, an advanced glycation end product, and interleukin-6 in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes research and clinical practice* 2003;61:93-101.
71. Pachydaki SI, Tari SR, Lee SE, et al. Upregulation of RAGE and its ligands in proliferative retinal disease. *Experimental eye research* 2006;82:807-815.
72. Kakehashi A, Inoda S, Mameuda C, et al. Relationship among VEGF, VEGF receptor, AGEs, and macrophages in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes research and clinical practice* 2008;79:438-445.
73. Soulis-Liparota T, Cooper M, Papazoglou D, Clarke B, Jerums G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes* 1991;40:1328-1334.
74. Nakamura S, Makita Z, Ishikawa S, et al. Progression of nephropathy in spontaneous diabetic rats is prevented by OPB-9195, a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetes* 1997;46:895-899.
75. Hammes HP, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991;88:11555-11558.
76. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. *The Journal of clinical investigation* 1994;94:110-117.
77. Shinohara M, Thornalley PJ, Giardino I, et al. Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *The Journal of clinical investigation* 1998;101:1142-1147.
78. Charonis AS, Reger LA, Dege JE, et al. Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation. *Diabetes* 1990;39:807-814.
79. McLellan AC, Thornalley PJ, Benn J, Sonksen PH. Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clinical science* 1994;87:21-29.
80. Abordo EA, Westwood ME, Thornalley PJ. Synthesis and secretion of macrophage colony stimulating factor by mature human monocytes and human monocytic THP-1 cells induced by human serum albumin derivatives modified with methylglyoxal and glucose-derived advanced glycation endproducts. *Immunology letters* 1996;53:7-13.

81. Kirstein M, Aston C, Hintz R, Vlassara H. Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *The Journal of clinical investigation* 1992;90:439-446.
82. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, et al. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *The Journal of clinical investigation* 1995;96:1395-1403.
83. Semba RD, Huang H, Luttj GA, Van Eyk JE, Hart GW. The role of O-GlcNAc signaling in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Proteomics Clinical applications* 2014;8:218-231.
84. Buse MG. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2006;290:E1-E8.
85. Schleicher ED, Weigert C. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney international Supplement* 2000;77:S13-18.
86. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research* 2010;107:1058-1070.
87. Kitada M, Zhang Z, Mima A, King GL. Molecular mechanisms of diabetic vascular complications. *Journal of diabetes investigation* 2010;1:77-89.
88. Hammes HP, Du X, Edelstein D, et al. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nature medicine* 2003;9:294-299.
89. A randomized trial of sorbinil, an aldose reductase inhibitor, in diabetic retinopathy. Sorbinil Retinopathy Trial Research Group. *Archives of ophthalmology* 1990;108:1234-1244.
90. Drel VR, Pacher P, Ali TK, et al. Aldose reductase inhibitor fidarestat counteracts diabetes-associated cataract formation, retinal oxidative-nitrosative stress, glial activation, and apoptosis. *International journal of molecular medicine* 2008;21:667-676.
91. Obrosova IG, Maksimchyk Y, Pacher P, et al. Evaluation of the aldose reductase inhibitor fidarestat on ischemia-reperfusion injury in rat retina. *International journal of molecular medicine* 2010;26:135-142.
92. Vedantham S, Thiagarajan D, Ananthkrishnan R, et al. Aldose reductase drives hyperacetylation of Egr-1 in hyperglycemia and consequent upregulation of proinflammatory and prothrombotic signals. *Diabetes* 2014;63:761-774.
93. Wang QJ. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends in pharmacological sciences* 2006;27:317-323.



94. Zhang XL, Wen L, Chen YJ, Zhu Y. Vascular endothelial growth factor up-regulates the expression of intracellular adhesion molecule-1 in retinal endothelial cells via reactive oxygen species, but not nitric oxide. *Chinese medical journal* 2009;122:338-343.
95. Aiello LP, Clermont A, Arora V, Davis MD, Sheetz MJ, Bursell SE. Inhibition of PKC beta by oral administration of ruboxistaurin is well tolerated and ameliorates diabetes-induced retinal hemodynamic abnormalities in patients. *Investigative ophthalmology & visual science* 2006;47:86-92.
96. Nonaka A, Kiryu J, Tsujikawa A, et al. PKC-beta inhibitor (LY333531) attenuates leukocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats. *Investigative ophthalmology & visual science* 2000;41:2702-2706.
97. Joy SV, Scates AC, Bearely S, et al. Ruboxistaurin, a protein kinase C beta inhibitor, as an emerging treatment for diabetes microvascular complications. *The Annals of pharmacotherapy* 2005;39:1693-1699.
98. Group P-DS. The effect of ruboxistaurin on visual loss in patients with moderately severe to very severe nonproliferative diabetic retinopathy: initial results of the Protein Kinase C beta Inhibitor Diabetic Retinopathy Study (PKC-DRS) multicenter randomized clinical trial. *Diabetes* 2005;54:2188-2197.
99. Group P-DS. Effect of ruboxistaurin in patients with diabetic macular edema: thirty-month results of the randomized PKC-DMES clinical trial. *Archives of ophthalmology* 2007;125:318-324.
100. Clarke M, Dodson PM. PKC inhibition and diabetic microvascular complications. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 2007;21:573-586.
101. Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Role of endoplasmic reticulum stress in atherosclerosis and diabetic macrovascular complications. *BioMed research international* 2014;2014:610140.
102. Dunys J, Duplan E, Checler F. The transcription factor X-box binding protein-1 in neurodegenerative diseases. *Molecular neurodegeneration* 2014;9:35.
103. Maurel M, Chevet E. Endoplasmic reticulum stress signaling: the microRNA connection. *American journal of physiology Cell physiology* 2013;304:C1117-1126.
104. Zhong Y, Li J, Chen Y, Wang JJ, Ratan R, Zhang SX. Activation of endoplasmic reticulum stress by hyperglycemia is essential for Muller cell-derived inflammatory cytokine production in diabetes. *Diabetes* 2012;61:492-504.
105. Adachi T, Yasuda H, Nakamura S, et al. Endoplasmic reticulum stress induces retinal endothelial permeability of extracellular-superoxide dismutase. *Free radical research* 2011;45:1083-1092.

106. Nakamura S, Takizawa H, Shimazawa M, et al. Mild endoplasmic reticulum stress promotes retinal neovascularization via induction of BiP/GRP78. *PLoS one* 2013;8:e60517.
107. Caldwell RB, Bartoli M, Behzadian MA, et al. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: role of oxidative stress. *Current drug targets* 2005;6:511-524.
108. Ali TK, El-Remessy AB. Diabetic retinopathy: current management and experimental therapeutic targets. *Pharmacotherapy* 2009;29:182-192.
109. Williams M, Hogg RE, Chakravarthy U. Antioxidants and diabetic retinopathy. *Current diabetes reports* 2013;13:481-487.
110. Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C, et al. The efficacy of octreotide in the therapy of severe nonproliferative and early proliferative diabetic retinopathy: a randomized controlled study. *Diabetes care* 2000;23:504-509.
111. Zimmerman BR, Molnar GD. Prolonged follow-up in diabetic retinopathy treated by sectioning the pituitary stalk. *Mayo Clinic proceedings* 1977;52:233-237.
112. Kohner EM, Joplin GF, Blach RK, Cheng H, Fraser TR. Pituitary ablation in the treatment of diabetic retinopathy. (A randomized trial). *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom* 1972;92:79-90.
113. Haurigot V, Villacampa P, Ribera A, et al. Increased intraocular insulin-like growth factor-I triggers blood-retinal barrier breakdown. *The Journal of biological chemistry* 2009;284:22961-22969.
114. Wilkinson-Berka JL, Wraight C, Werther G. The role of growth hormone, insulin-like growth factor and somatostatin in diabetic retinopathy. *Current medicinal chemistry* 2006;13:3307-3317.
115. Patel JI, Hykin PG, Gregor ZJ, Boulton M, Cree IA. Angiotensin concentrations in diabetic retinopathy. *The British journal of ophthalmology* 2005;89:480-483.
116. Rangasamy S, Srinivasan R, Maestas J, McGuire PG, Das A. A potential role for angiotensin 2 in the regulation of the blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011;52:3784-3791.
117. Coxon A, Bready J, Min H, et al. Context-dependent role of angiotensin-1 inhibition in the suppression of angiogenesis and tumor growth: implications for AMG 386, an angiotensin-1/2-neutralizing peptidomimetic. *Molecular cancer therapeutics* 2010;9:2641-2651.
118. Lev-Ran A, Hwang DL, Miller JD, Josefsberg Z. Excretion of epidermal growth factor (EGF) in diabetes. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1990;192:201-206.

119. Hueber A, Wiedemann P, Esser P, Heimann K. Basic fibroblast growth factor mRNA, bFGF peptide and FGF receptor in epiretinal membranes of intraocular proliferative disorders (PVR and PDR). *International ophthalmology* 1996;20:345-350.
120. Min SH, Lee TI, Chung YS, Kim HK. Transforming growth factor-beta levels in human aqueous humor of glaucomatous, diabetic and uveitic eyes. *Korean journal of ophthalmology : KJO* 2006;20:162-165.
121. Praidou A, Klangas I, Papakonstantinou E, et al. Vitreous and serum levels of platelet-derived growth factor and their correlation in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Current eye research* 2009;34:152-161.
122. Eckardt KU. Erythropoietin and microvascular diabetic complications. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2009;24:388-390.
123. Simo R, Hernandez C. Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: hopes and fears for a new therapeutic strategy. *Diabetologia* 2008;51:1574-1580.
124. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical science* 2005;109:227-241.
125. Comer GM, Ciulla TA. Pharmacotherapy for diabetic retinopathy. *Current opinion in ophthalmology* 2004;15:508-518.
126. Ishida S, Usui T, Yamashiro K, et al. VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 2003;44:2155-2162.
127. Jain A, Saxena S, Khanna VK, Shukla RK, Meyer CH. Status of serum VEGF and ICAM-1 and its association with external limiting membrane and inner segment-outer segment junction disruption in type 2 diabetes mellitus. *Molecular vision* 2013;19:1760-1768.
128. Frank RN. Diabetic retinopathy. *The New England journal of medicine* 2004;350:48-58.
129. Suomalainen VP. Comparison of retinal lesions produced by transscleral krypton laser photocoagulation, transpupillar krypton laser photocoagulation and cryocoagulation. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1993;71:224-229.
130. Adamis AP, Shima DT, Yeo KT, et al. Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 1993;193:631-638.
131. Aaberg TM, Abrams GW. Changing indications and techniques for vitrectomy in management of complications of diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 1987;94:775-779.

132. Gupta N, Mansoor S, Sharma A, et al. Diabetic retinopathy and VEGF. *The open ophthalmology journal* 2013;7:4-10.
133. Steinbrook R. The price of sight--ranibizumab, bevacizumab, and the treatment of macular degeneration. *N Engl J Med* 2006;355:1409-1412.
134. Garba AO, Mousa SA. Bevasiranib for the treatment of wet, age-related macular degeneration. *Ophthalmology and eye diseases* 2010;2:75-83.
135. Lee JH, Canny MD, De Erkenez A, et al. A therapeutic aptamer inhibits angiogenesis by specifically targeting the heparin binding domain of VEGF165. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:18902-18907.
136. Cunningham ET, Jr., Adamis AP, Altaweel M, et al. A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2005;112:1747-1757.
137. Aflibercept: AVE 0005, AVE 005, AVE0005, VEGF Trap - Regeneron, VEGF Trap (R1R2), VEGF Trap-Eye. *Drugs in R&D* 2008;9:261-269.
138. Do DV, Nguyen QD, Shah SM, et al. An exploratory study of the safety, tolerability and bioactivity of a single intravitreal injection of vascular endothelial growth factor Trap-Eye in patients with diabetic macular oedema. *The British journal of ophthalmology* 2009;93:144-149.
139. Saint-Geniez M, Maharaj AS, Walshe TE, et al. Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on muller cells and photoreceptors. *PloS one* 2008;3:e3554.
140. Ishida K, Yoshimura N, Mandai M, Honda Y. Inhibitory effect of TNP-470 on experimental choroidal neovascularization in a rat model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1512-1519.
141. Mori K, Duh E, Gehlbach P, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 2001;188:253-263.
142. Mori K, Gehlbach P, Yamamoto S, et al. AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:1994-2000.
143. Meneses PI, Hajjar KA, Berns KI, Duvoisin RM. Recombinant angiostatin prevents retinal neovascularization in a murine proliferative retinopathy model. *Gene Ther* 2001;8:646-648.
144. Willett K, Bennett J. Immunology of AAV-Mediated Gene Transfer in the Eye. *Frontiers in immunology* 2013;4:261.
145. Coura Rdos S, Nardi NB. The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virology journal* 2007;4:99.

146. Atchison RW, Casto BC, Hammon WM. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 1965;149:754-756.
147. Walther W, Stein U. Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs* 2000;60:249-271.
148. Sandoval Rodriguez AS, Salazar Montes AM, Armendariz-Borunda J. [Viral vectors in gene therapy. Advantages of the adenoassociated vectors]. *Rev Gastroenterol Mex* 2005;70:192-202.
149. Schultz BR, Chamberlain JS. Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2008;16:1189-1199.
150. Ali RR, Reichel MB, De Alwis M, et al. Adeno-associated virus gene transfer to mouse retina. *Human gene therapy* 1998;9:81-86.
151. Bennett J, Maguire AM, Cideciyan AV, et al. Stable transgene expression in rod photoreceptors after recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer to monkey retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:9920-9925.
152. Dudas L, Anand V, Acland GM, et al. Persistent transgene product in retina, optic nerve and brain after intraocular injection of rAAV. *Vision research* 1999;39:2545-2553.
153. Maguire AM, High KA, Auricchio A, et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2009;374:1597-1605.
154. Mancuso K, Hauswirth WW, Li Q, et al. Gene therapy for red-green colour blindness in adult primates. *Nature* 2009;461:784-787.
155. Raisler BJ, Berns KI, Grant MB, Beliaev D, Hauswirth WW. Adeno-associated virus type-2 expression of pigmented epithelium-derived factor or Kringle 1-3 of angiostatin reduce retinal neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:8909-8914.
156. Bainbridge JW, Mistry A, De Alwis M, et al. Inhibition of retinal neovascularisation by gene transfer of soluble VEGF receptor sFlt-1. *Gene therapy* 2002;9:320-326.
157. Auricchio A, Behling KC, Maguire AM, et al. Inhibition of retinal neovascularization by intraocular viral-mediated delivery of anti-angiogenic agents. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2002;6:490-494.
158. Pechan P, Rubin H, Lukason M, et al. Novel anti-VEGF chimeric molecules delivered by AAV vectors for inhibition of retinal neovascularization. *Gene therapy* 2009;16:10-16.

159. Lai CM, Estcourt MJ, Wikstrom M, et al. rAAV.sFlt-1 gene therapy achieves lasting reversal of retinal neovascularization in the absence of a strong immune response to the viral vector. *Investigative ophthalmology & visual science* 2009;50:4279-4287.
160. Lukason M, DuFresne E, Rubin H, et al. Inhibition of choroidal neovascularization in a nonhuman primate model by intravitreal administration of an AAV2 vector expressing a novel anti-VEGF molecule. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2011;19:260-265.
161. Arnold E, Rivera JC, Thebault S, et al. High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. *Diabetes* 2010;59:3192-3197.
162. Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC, et al. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 2005;46:2947-2953.
163. Clapp C, Aranda J, Gonzalez C, Jeziorski MC, Martinez de la Escalera G. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2006;17:301-307.
164. Piwnica D, Touraine P, Struman I, et al. Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Molecular endocrinology* 2004;18:2522-2542.
165. Macotela Y, Aguilar MB, Guzman-Morales J, et al. Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *Journal of cell science* 2006;119:1790-1800.
166. Hopkins DR, Keles S, Greenspan DS. The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2007;26:508-523.
167. Cruz-Soto ME, Cosio G, Jeziorski MC, et al. Cathepsin D is the primary protease for the generation of adenohipophyseal vasoinhibins: cleavage occurs within the prolactin secretory granules. *Endocrinology* 2009;150:5446-5454.
168. Clapp C, Thebault S, Arnold E, Garcia C, Rivera JC, de la Escalera GM. Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2008;295:E772-778.
169. Triebel J, Macotela Y, de la Escalera GM, Clapp C. Prolactin and vasoinhibins: Endogenous players in diabetic retinopathy. *IUBMB life* 2011;63:806-810.
170. Rivera JC, Aranda J, Riesgo J, et al. Expression and cellular localization of prolactin and the prolactin receptor in mammalian retina. *Experimental eye research* 2008;86:314-321.

171. O'Steen WK, Sundberg DK. Patterns of radioactivity in the eyes of rats after injection of iodinated prolactin. *Ophthalmic research* 1982;14:54-62.
172. Duenas Z, Torner L, Corbacho AM, et al. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Investigative ophthalmology & visual science* 1999;40:2498-2505.
173. Duenas Z, Rivera JC, Quiroz-Mercado H, et al. Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Investigative ophthalmology & visual science* 2004;45:2049-2055.
174. Clapp C, Weiner RI. A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* 1992;130:1380-1386.
175. D'Angelo G, Martini JF, Iiri T, Fantl WJ, Martial J, Weiner RI. 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Molecular endocrinology* 1999;13:692-704.
176. Lee SH, Kunz J, Lin SH, Yu-Lee LY. 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway. *Cancer research* 2007;67:11045-11053.
177. Garcia C, Aranda J, Arnold E, et al. Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *The Journal of clinical investigation* 2008;118:2291-2300.
178. Gonzalez C, Corbacho AM, Eiserich JP, et al. 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology* 2004;145:5714-5722.
179. Vandenberghe LH, Auricchio A. Novel adeno-associated viral vectors for retinal gene therapy. *Gene therapy* 2012;19:162-168.
180. Grimm D, Zhou S, Nakai H, et al. Preclinical in vivo evaluation of pseudotyped adeno-associated virus vectors for liver gene therapy. *Blood* 2003;102:2412-2419.
181. Brandli A, Stone J. Using the Electroretinogram to Assess Function in the Rodent Retina and the Protective Effects of Remote Limb Ischemic Preconditioning. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2015;e52658.
182. Miller RF, Dowling JE. Intracellular responses of the Muller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to b-wave of the electroretinogram. *Journal of neurophysiology* 1970;33:323-341.
183. Marmor MF HP. A practical method for c-wave recording in man. *Documenta Ophthal Proc Ser* 1982;31:67-72.

184. Xu Q, Qaum T, Adamis AP. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Investigative ophthalmology & visual science* 2001;42:789-794.
185. Shi X, Liao S, Mi H, et al. Hesperidin prevents retinal and plasma abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecules* 2012;17:12868-12881.
186. Zhang J, Wu Y, Jin Y, et al. Intravitreal injection of erythropoietin protects both retinal vascular and neuronal cells in early diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science* 2008;49:732-742.
187. Kusari J, Zhou SX, Padillo E, Clarke KG, Gil DW. Inhibition of vitreoretinal VEGF elevation and blood-retinal barrier breakdown in streptozotocin-induced diabetic rats by brimonidine. *Investigative ophthalmology & visual science* 2010;51:1044-1051.
188. Clermont A, Chilcote TJ, Kita T, et al. Plasma kallikrein mediates retinal vascular dysfunction and induces retinal thickening in diabetic rats. *Diabetes* 2011;60:1590-1598.
189. Kern TS, Tang J, Berkowitz BA. Validation of structural and functional lesions of diabetic retinopathy in mice. *Molecular vision* 2010;16:2121-2131.
190. Paques M, Tadayoni R, Sercombe R, et al. Structural and hemodynamic analysis of the mouse retinal microcirculation. *Investigative ophthalmology & visual science* 2003;44:4960-4967.
191. Summerford C, Samulski RJ. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *Journal of virology* 1998;72:1438-1445.
192. Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nature medicine* 1999;5:71-77.
193. Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nature medicine* 1999;5:78-82.
194. Kashiwakura Y, Tamayose K, Iwabuchi K, et al. Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Journal of virology* 2005;79:609-614.
195. Boyer DS, Hopkins JJ, Sorof J, Ehrlich JS. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for diabetic macular edema. *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism* 2013;4:151-169.
196. Stewart MW. Anti-VEGF therapy for diabetic macular edema. *Current diabetes reports* 2014;14:510.
197. Stefanini FR, Badaro E, Falabella P, Koss M, Farah ME, Maia M. Anti-VEGF for the management of diabetic macular edema. *Journal of immunology research* 2014;2014:632307.



198. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* 2006;9:225-230; discussion 231.
199. Triebel J, Huefner M, Ramadori G. Investigation of prolactin-related vasoinhibin in sera from patients with diabetic retinopathy. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 2009;161:345-353.
200. Pan H, Nguyen NQ, Yoshida H, et al. Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 2004;45:2413-2419.
201. Arredondo Zamarripa D, Diaz-Lezama N, Melendez Garcia R, et al. Vasoinhibins regulate the inner and outer blood-retinal barrier and limit retinal oxidative stress. *Frontiers in cellular neuroscience* 2014;8:333.
202. Ideno J, Mizukami H, Kakehashi A, et al. Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. *International journal of molecular medicine* 2007;19:75-79.
203. Gehlbach P, Demetriades AM, Yamamoto S, et al. Periocular gene transfer of sFlt-1 suppresses ocular neovascularization and vascular endothelial growth factor-induced breakdown of the blood-retinal barrier. *Human gene therapy* 2003;14:129-141.
204. Bates DO. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovascular research* 2010;87:262-271.
205. Thebault S. Vasoinhibins Prevent Bradykinin-Stimulated Endothelial Cell Proliferation by Inactivating eNOS via Reduction of both Intracellular Ca<sup>2+</sup> Levels and eNOS Phosphorylation at Ser1179. *Pharmaceuticals* 2011;4:1052-1069.
206. Luan H, Roberts R, Sniegowski M, Goebel DJ, Berkowitz BA. Retinal thickness and subnormal retinal oxygenation response in experimental diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* 2006;47:320-328.
207. Zhang Y, Zhang J, Wang Q, et al. Intravitreal injection of exendin-4 analogue protects retinal cells in early diabetic rats. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011;52:278-285.
208. Bhatt LK, Addepalli V. Attenuation of diabetic retinopathy by enhanced inhibition of MMP-2 and MMP-9 using aspirin and minocycline in streptozotocin-diabetic rats. *American journal of translational research* 2010;2:181-189.
209. Biallostowski C, van Velthoven ME, Michels RP, Schlingemann RO, DeVries JH, Verbraak FD. Decreased optical coherence tomography-measured pericentral retinal thickness in patients with diabetes mellitus type 1 with minimal diabetic retinopathy. *The British journal of ophthalmology* 2007;91:1135-1138.

210. van Dijk HW, Kok PH, Garvin M, et al. Selective loss of inner retinal layer thickness in type 1 diabetic patients with minimal diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* 2009;50:3404-3409.
211. Oshitari T, Hanawa K, Adachi-Usami E. Changes of macular and RNFL thicknesses measured by Stratus OCT in patients with early stage diabetes. *Eye* 2009;23:884-889.
212. van Dijk HW, Verbraak FD, Kok PH, et al. Decreased retinal ganglion cell layer thickness in patients with type 1 diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science* 2010;51:3660-3665.
213. Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *The Journal of clinical investigation* 1998;102:783-791.
214. Park SH, Park JW, Park SJ, et al. Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia* 2003;46:1260-1268.
215. Martin PM, Roon P, Van Ells TK, Ganapathy V, Smith SB. Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 2004;45:3330-3336.
216. Feit-Leichman RA, Kinouchi R, Takeda M, et al. Vascular damage in a mouse model of diabetic retinopathy: relation to neuronal and glial changes. *Investigative ophthalmology & visual science* 2005;46:4281-4287.
217. Maclachlan TK, Lukason M, Collins M, et al. Preclinical safety evaluation of AAV2-sFLT01- a gene therapy for age-related macular degeneration. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2011;19:326-334.
218. Kern A, Schmidt K, Leder C, et al. Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids. *Journal of virology* 2003;77:11072-11081.
219. Vives RR, Lortat-Jacob H, Fender P. Heparan sulphate proteoglycans and viral vectors : ally or foe? *Current gene therapy* 2006;6:35-44.
220. Fisher EJ, McLennan SV, Yue DK, Turtle JR. Cell-associated proteoglycans of retinal pericytes and endothelial cells: modulation by glucose and ascorbic acid. *Microvascular research* 1994;48:179-189.
221. Han J, Zhang F, Xie J, Linhardt RJ, Hiebert LM. Changes in cultured endothelial cell glycosaminoglycans under hyperglycemic conditions and the effect of insulin and heparin. *Cardiovascular diabetology* 2009;8:46.
222. Witmer AN, van den Born J, Vrensen GF, Schlingemann RO. Vascular localization of heparan sulfate proteoglycans in retinas of patients with diabetes mellitus and in VEGF-induced retinopathy using domain-specific antibodies. *Current eye research* 2001;22:190-197.

223. Joseph SJ, Ford MD, Barth C, et al. A proteoglycan that activates fibroblast growth factors during early neuronal development is a perlecan variant. *Development* 1996;122:3443-3452.
224. Smith SM, West LA, Hassell JR. The core protein of growth plate perlecan binds FGF-18 and alters its mitogenic effect on chondrocytes. *Archives of biochemistry and biophysics* 2007;468:244-251.
225. Hanneken A, de Juan E, Jr., Luty GA, Fox GM, Schiffer S, Hjelmeland LM. Altered distribution of basic fibroblast growth factor in diabetic retinopathy. *Archives of ophthalmology* 1991;109:1005-1011.
226. Conde-Knape K. Heparan sulfate proteoglycans in experimental models of diabetes: a role for perlecan in diabetes complications. *Diabetes/metabolism research and reviews* 2001;17:412-421.
227. Friedlander M, Theesfeld CL, Sugita M, et al. Involvement of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93:9764-9769.
228. Bollineni JS, Alluru I, Reddi AS. Heparan sulfate proteoglycan synthesis and its expression are decreased in the retina of diabetic rats. *Current eye research* 1997;16:127-130.
229. Hammes HP, Weiss A, Hess S, et al. Modification of vitronectin by advanced glycation alters functional properties in vitro and in the diabetic retina. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1996;75:325-338.
230. Duan D, Li Q, Kao AW, Yue Y, Pessin JE, Engelhardt JF. Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *Journal of virology* 1999;73:10371-10376.
231. Duan D, Yue Y, Yan Z, Yang J, Engelhardt JF. Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *The Journal of clinical investigation* 2000;105:1573-1587.
232. Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK, et al. Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes* 2006;55:2401-2411.
233. Lee SH, Colosi P, Lee H, et al. Laser photocoagulation enhances adeno-associated viral vector transduction of mouse retina. *Human gene therapy methods* 2014;25:83-91.
234. Kolstad KD, Dalkara D, Guerin K, et al. Changes in adeno-associated virus-mediated gene delivery in retinal degeneration. *Human gene therapy* 2010;21:571-578.
235. Vacca O, Darche M, Schaffer DV, et al. AAV-mediated gene delivery in Dp71-null mouse model with compromised barriers. *Glia* 2014;62:468-476.

236. Ding W, Zhang L, Yan Z, Engelhardt JF. Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene therapy* 2005;12:873-880.

237. Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, Samulski RJ. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *Journal of virology* 1996;70:3227-3234.

## XII. ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> Esquema de la sección de un ojo humano mostrando sus diferentes componentes -----	5
<b>Figura 2</b> Células y capas de la retina-----	8
<b>Figura 3</b> Irrigación sanguínea del ojo-----	9
<b>Figura 4</b> Esquema de la vasculatura retiniana-----	11
<b>Figura 5</b> Esquema de la retina mostrando las regiones de la mácula y foveola-----	13
<b>Figura 6</b> Esquema de un ojo con retinopatía diabética proliferativa (RDP)-----	18
<b>Figura 7</b> Principales tratamientos utilizados para la RD-----	27
<b>Figura 8</b> Estructura de 2 diferentes anticuerpos anti-VEGF, Ranibizumab y Bevacizumab-----	29
<b>Figura 9</b> Estructura básica del genoma de AAV silvestres y recombinantes-----	32
<b>Figura 10</b> Representación esquemática de la estructura tridimensional de la prolactina (PRL)-----	35
<b>Figura 11</b> Verificación de la expresión retiniana de los transgenes de AAV2-Vi y sFlt-1-----	48
<b>Figura 12</b> Evaluación de la barrera hematoretiniana (BHR)-----	50
<b>Figura 13</b> Los vectores de AAV2-Vasoinhibinas y AAV2-sFlt-1 revierten la ruptura de la barrera hematoretiniana (BHR) inducida por la diabetes-----	51
<b>Figura 14</b> El vector AAV2 Vasoinhibinas reduce anomalías en la microvasculatura de la retina inducida por la diabetes-----	53
<b>Figura 15</b> El vector AAV2 Vasoinhibinas reduce la disfunción electrofisiológica en la retina debida a la diabetes-----	54
<b>Figura 16</b> Análisis histológico de la retina de rata-----	55
<b>Figura 17</b> Los vectores AAV2-Vi y AAV2-sFlt-1 son incapaces de reducir la ruptura de la BHR cuando se aplican antes de inducir el cuadro diabético-----	57
	86

<b>Figura 18</b>	La diabetes aumenta la expresión y transducción de los transgenes de la retina por los AAV2-----	58
<b>Figura 19</b>	La expresión de los receptores primarios y co-receptores de los AAV2 se eleva en la retina de ratas diabeticas-----	60

### XIII. ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1</b> Primeros 10 países/territorios con mayor número de personas con diabetes en 2013 -----	14
<b>Tabla 2</b> Proyección de los primeros 10 países/territorios con mayor número de personas con diabetes para 2015-----	14
<b>Tabla 3</b> Factores de riesgo involucrados para el desarrollo de la retinopatía diabética-----	15
<b>Tabla 4</b> Clasificación de la retinopatía diabética según su nivel e indicaciones----	17
<b>Tabla 5</b> Principales vectores virales usados en la terapia génica-----	32
<b>Tabla 6</b> Lista de oligonucleótidos utilizados y sus secuencias correspondientes---	44
<b>Tabla 7</b> Peso corporal y niveles de glucosa de ratas no diabéticas y diabéticas----	49

A continuación se enlistan las actividades académicas realizadas durante mis estudios doctorales.

### PUBLICACIONES

1. 2014; 10 Arredondo Zamarripa D, **Díaz-Lezama N**, Meléndez García R, Chávez Balderas J, Adán N, Ledesma-Colunga MG, Arnold E, Clapp C, Thebault S. **Vasoinhibins regulate the inner and outer blood-retinal barrier and limit retinal oxidative stress.** *Front Cell Neurosci.* 2014 Oct 20;8:333. doi:10.3389/fncel.2014.00333. eCollection 2014
2. 2015; 05 Lemini M, Ruiz-Herrera X, Ledesma-Colunga MG, **Díaz-Lezama N**, De Los Ríos EA, López-Barrera F, Méndez I, Martínez de la Escalera G, Macotela Y, Clapp C. **Prolactin anterior pituitary expression and circulating levels are reduced in obese and diabetic rats: role of TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$ .** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015 May 1;308(9):R792-9. doi: 10.1152/ajpregu.00327.2014. Epub 2015 Feb 25.
3. 2016; 03 **Díaz-Lezama N**, Wu Z, Adán-Castro E, Arnold E, Vázquez-Membrillo M, Arredondo-Zamarripa D, Ledesma-Colunga MG, Moreno-Carranza B, Martínez de la Escalera G, Colosi P, Clapp C. **Diabetes enhances the efficacy of AAV2 vector in the retina: therapeutic effect of AAV2 encoding vasoinhibin and soluble VEGF receptor 1.** *Lab Invest.* 2016 Mar;96<sup>31</sup>:283-95. doi: 10.1038/labinvest.2015.135. Epub 2015 Nov 16
4. 2017; 01 Zepeda-Romero L, Vazquez-Membrillo M, Adán-Castro E, Gomez-Aguayo F, Gutierrez-Padilla JA, Angulo-Castellanos E, Barrera de Leon JC, Quezada-Chalita A, Meza-Anguiano A, **Díaz-Lezama N**, Martínez de la Escalera G, Triebel Jakob, Clapp C. **Higher Prolactin and Vasoinhibins Serum Levels Associated with Incidence and Progression of Retinopathy of Prematurity.** *Pediatr Res.* 2017 Jan 4. doi: 10.1038/pr.2016.241.



## POSTER Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS

1. 2012;09 **Díaz-Lezama N**, Ramírez M, Moreno-Carranza B, Martínez de la Escalera G y Clapp C. Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla, Querétaro, México. Estudio sobre la expresión de virus adenoasociados tipo 2 en la retina de ratas diabéticas. XIX Aniversario de las Jornadas del Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, México.
2. 2012;11 **Díaz-Lezama N**, Ramírez M, Moreno-Carranza B, Martínez de la Escalera G, Co, Clapp C. Recombinant Adenoassociated virus serotype 2 expression in diabetic rat retina. I Congreso FALAN (Federación de Asociaciones Latinoamericanas y del Caribe de Neurociencias) 55 Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas . Cancún, México.
3. 2013;05 **Díaz-Lezama N**, Ramírez M, Moreno-Carranza B, Martínez de la Escalera G, Colosi P, Clapp C. Enhancement of AAV2-mediated retinal transduction in diabetic rats. ARVO (Association for research in vision and ophtalmology) meeting 2013. Seattle Washington USA.
4. 2013;05 **Díaz-Lezama N**, Wu Z, Ramírez M, Moreno-Carranza B, Martínez de la Escalera G, Colosi P, Clapp C. AAV2-mediated transduction is enhanced in the retina of diabetic rats. NASCE (North American Society for Comparative Endocrinology) meeting 2013. Querétaro, México.
5. 2013;05 Adán-Castro E, **Díaz-Lezama N**, Ramírez M, Triebel J, Moreno-Vega, Martínez de la Escalera G, Macotela Y, Clapp C. Analysis of retinal vasoINHIBINS and their ocular generation in diabetic and non-diabetic rats. NASCE (North American Society for Comparative Endocrinology) meeting 2013. Querétaro, México
6. 2013;09 **Díaz-Lezama N**, Wu Z, Ramírez M, Moreno-Carranza B, Martínez de la Escalera G, Colosi P y Clapp C. La transducción de los virus adenoasociados tipo 2 (AAV2) se incrementa en la retina de ratas diabéticas. XX Aniversario de las Jornadas del Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, México.
7. 2013;09 Adán E, **Díaz-Lezama N**, Ramírez M, Triebel J, Moreno-Vega A, Martínez de la Escalera G, Macotela Y, Clapp C. Análisis de las vasoINHIBINAS retinianas y de su generación ocular en ratas diabéticas y no diabéticas. XX Aniversario de las Jornadas del Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, México.

8. 2014; 05 **Díaz-Lezama N**, Arredondo-Zamarripa D, Martínez de la Escalera G, Thebault S, Colosi P, Wu Z, Clapp C. Diabetes enhances the efficacy of adeno-associated virus vectors in rat retina. ARVO (Association for research in vision and ophthalmology) 2014, meeting. Orlando Florida, USA.
9. 2014;05 Adán-Castro E, **Díaz-Lezama N**, Martínez de la Escalera G, Thebault S, Macotela Y, Clapp C. Analysis of retinal vasoinhibins and their ocular generation in diabetic and non-diabetic rats. ARVO (Association for research in vision and ophthalmology) 2014, meeting. Orlando Florida, USA.
10. 2014;09 Vázquez-Membrillo M, **Díaz-Lezama N**, Arredondo Zamarripa D, Martínez de la Escalera G, Colosi P, Clapp C. Análisis del efecto terapéutico de virus adenoasociados que transducen vasoinhibinas en la retinopatía diabética experimental. XXXIII Reunión Anual de Retina/Asociación Mexicana de Retina. Guadalajara, Jalisco México.  
**Awarded**
11. 2014; 09 **Díaz-Lezama N**, Wu Z, Adán-Castro E, Arredondo Zamarripa D, Vázquez-Membrillo M, Martínez de la Escalera G, Colosi P, Clapp C. La diabetes aumenta la eficacia de los virus adeno-asociados (AAV) en la retina de la rata. XXI Aniversario de las Jornadas del Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, México.
12. 2014;09 Arredondo-Zamarripa D, **Díaz-Lezama N**, Meléndez García R, Chávez Balderas J, Clapp C, Thebault S. Las vasoinhibinas regulan la permeabilidad de la barrera hematorretiniana interna/externa y reducen el estrés oxidativo en la retina. XXI Aniversario de las Jornadas del Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, México.
13. 2014;09 Arredondo Zamarripa, **Díaz-Lezama N**, Meléndez García R, Clapp C, Thebault S. Vasoinhibins regulate the inner and outer blood-retinal barrier and limit retinal oxidative stress. 17th International Symposium on signal transduction at the blood-brain and blood-retina barriers. Dublin, Irlanda.
14. 2015/06 Clapp C, Arnold E, Thebault S, **Díaz-Lezama N**, Arredondo-Zamarripa D, Vázquez Membrillo M, Adán-Castro E, Martínez de la Escalera G. Vascular and neuroprotective actions of vasoinhibins and prolactin in the retina NASCE (North American Society for Comparative Endocrinology) meeting 2015. Ottawa, Ontario, Canadá.

15. 2015; 07 **Díaz-Lezama N**, Wu Z, Adán-Castro E, Vazquez-Membrillo M, Arredondo-Zamarripa D, Ledesma-Colunga M, Moreno-Carranza B, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Diabetes enhances the efficacy of AAV2 vectors in the retina: therapeutic effect of AAV2 encoding vasoinhibin and soluble receptor 1 in experimental diabetic retinopathy. FASEB The Growth Hormone/Prolactin Family in Biology & Disease. Steamboat Springs, Colorado, USA. **Travel Award.**
16. 2015/09 **Díaz-Lezama N**, Wu Z, Adán-Castro E, Vázquez Membrillo M, Arredondo-Zamarripa D, Ledesma Colunga M, Moreno-Carranza B, Martínez de la Escalera G, Colosi P, Clapp C. XXII Aniversario de las Jornadas del Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, México.
17. 2016/05 **Díaz-Lezama N**, Wu Z, Adán-Castro E, Moreno-Carranza B, Martínez de la Escalera G, Clapp C. An AAV2 vector encoding prolactin reverses blood retinal barrier pathology when administered intravireally to diabetic rats. ARVO (Association for research in vision and ophtalmology) 2016, meeting. Seattle Washington, USA.
18. 2016/09 Vázquez-Membrillo M, **Díaz-Lezama N**, Adán Castro E, García-Franco Renata, Clapp C. ROP: Modelo en retina murina neonatal para la investigación de opciones terapéuticas in vivo. XXXV Reunión Anual de Retina/Asociación Mexicana de Retina. León, Guanajuato, México. **Awarded.**
19. 2016/09 **Díaz-Lezama N**, Wu Z, Adán-Castro E, Moreno-Carranza B, Martínez de la Escalera G, Clapp C. An AAV2 vector encoding prolactin reverses blood retinal barrier pathology when administered intravireally to diabetic rats. XXI Aniversario de las Jornadas del Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, México.
20. 2016/09 Adán-Castro E, Ramírez-Hernández G, **Díaz-Lezama N**, Ruíz-Herrera X, Arnold E, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Pharmacological hyperprolactinemia protects against diabetic retinopathy. XXI Aniversario de las Jornadas del Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, México.
21. 2016/09 Ramírez-Hernández G, Adán-Castro E, **Díaz-Lezama N**, Ruíz-Herrera X, Martínez de la Escalera G, Macotela Y, Clapp C. Prolactin protects against the diabetes induced by streptozotocin in mice.

## **ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN**

2016;05-08      Estancia realizada en el Departamento de Terapéutica del Instituto de la Visión, de la Universidad Pierre et Marie Curie, París, Francia. Bajo la supervisión del Dr. Xavier Guillonnet y Dr. Alvaro Rendon, se evaluó el "Efecto de la proteína distrofina 71 (Dp71) en la vascularización retiniana anormal". Duración de la estancia: 3 meses.

# Diabetes enhances the efficacy of AAV2 vectors in the retina: therapeutic effect of AAV2 encoding vasoinhibin and soluble VEGF receptor 1

Nundehui Díaz-Lezama<sup>1</sup>, Zhijian Wu<sup>2</sup>, Elva Adán-Castro<sup>1</sup>, Edith Arnold<sup>1</sup>, Miguel Vázquez-Membrillo<sup>1</sup>, David Arredondo-Zamarripa<sup>1</sup>, María G Ledesma-Colunga<sup>1</sup>, Bibiana Moreno-Carranza<sup>1</sup>, Gonzalo Martínez de la Escalera<sup>1</sup>, Peter Colosi<sup>3</sup> and Carmen Clapp<sup>1</sup>

Adeno-associated virus (AAV) vector-mediated delivery of inhibitors of blood–retinal barrier breakdown (BRBB) offers promise for the treatment of diabetic macular edema. Here, we demonstrated a reversal of blood–retinal barrier pathology mediated by AAV type 2 (AAV2) vectors encoding vasoinhibin or soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) when administered intravitreally to diabetic rats. Efficacy and safety of the AAV2 vasoinhibin vector were tested by monitoring its effect on diabetes-induced changes in the retinal vascular bed and thickness, and in the electroretinogram (ERG). Also, the transduction of AAV2 vectors and expression of AAV2 receptors and co-receptors were compared between the diabetic and the non-diabetic rat retinas. AAV2 vasoinhibin or AAV2 sFlt-1 vectors were injected intravitreally before or after enhanced BRBB due to diabetes induced by streptozotocin. The BRBB was examined by the Evans blue method, the vascular bed by fluorescein angiography, expression of the AAV2 EGFP reporter vector by confocal microscopy, and the AAV2 genome, expression of transgenes, receptors, and co-receptors by quantitative PCR. AAV2 vasoinhibin and sFlt-1 vectors inhibited the diabetes-mediated increase in BRBB when injected after, but not before, diabetes was induced. The AAV2 vasoinhibin vector decreased retinal microvascular abnormalities and the diabetes-induced reduction of the B-wave of the ERG, but it had no effect in non-diabetic controls. Also, retinal thickness was not altered by diabetes or by the AAV2 vasoinhibin vector. The AAV2 genome, vasoinhibin and sFlt-1 transgenes, and EGFP levels were higher in the retinas from diabetic rats and were associated with an elevated expression of AAV2 receptors (syndecan, glypican, and perlecan) and co-receptors (fibroblast growth factor receptor 1,  $\alpha\beta 5$  integrin, and hepatocyte growth factor receptor). We conclude that retinal transduction and efficacy of AAV2 vectors are enhanced in diabetes, possibly due to their elevated cell entry. AAV2 vectors encoding vasoinhibin and sFlt-1 may be desirable gene therapeutics to target diabetic retinopathy and macular edema.

*Laboratory Investigation* (2016) 96, 283–295; doi:10.1038/labinvest.2015.135; published online 16 November 2015

Blood–retinal barrier breakdown (BRBB) occurs in diabetic macular edema (DME), a complication of diabetic retinopathy (DR) where swelling of the central retina causes visual impairment.<sup>1</sup> The intravitreal delivery of anti-angiogenic and anti-vasopermeability factors can be an effective therapy to control DR and DME but often requires repeated treatments, which raise the risk of infection or other ocular complications.<sup>1</sup> By producing a more sustained therapy, viral vector-mediated gene transfer could avoid repeated intraocular administration and provide a permanent solution.

The most promising ocular gene therapy for DR is based on the intravitreal delivery of recombinant adeno-associated virus (AAV) vectors. They are generally safe, and the best characterized type 2 serotype (AAV2) produces long-term transgene expression in retinal ganglion cells after intravitreal delivery.<sup>2</sup> AAV2 vectors encoding inhibitors of vasopermeability such as soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1),<sup>3</sup> vasoinhibin,<sup>3</sup> angiostatin,<sup>4</sup> and angiotensin-(1–7)<sup>5</sup> reduce retinal vascular leakage in diabetic rats after intravitreal injection. In these studies the vectors were supplied before, not after, inducing diabetes. However, testing the efficacy of

<sup>1</sup>Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Mexico; <sup>2</sup>Ocular Gene Therapy Core, National Eye Institute, NIH, Bethesda, MD, USA and <sup>3</sup>BioMarin Pharmaceutical, Novato, CA, USA

Correspondence: Professor C Clapp, PhD, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro 76230, México. E-mail: clapp@unam.mx

Received 2 April 2015; revised 16 October 2015; accepted 20 October 2015

gene therapeutics after diabetes is well-established seems more medically relevant than developing prophylactic strategies. Recent studies have also emphasized the risk of systemic vector dissemination and immune activation following high doses of intravitreally delivered vectors,<sup>2</sup> so enhancing transduction efficiency is a primary goal.

In this study, we evaluated the inhibitory effect of AAV2 vectors encoding vasoinhibins and sFlt-1 on diabetes-induced BRBB when injected after BRBB is well-established. We found that the AAV2 vectors reverse BRB pathology and protect against retinal microvascular abnormalities and electrophysiological dysfunction; moreover, their retinal transduction is enhanced in the diabetic state by mechanisms that may include the upregulation of AAV2 primary receptors and co-receptors.

## MATERIALS AND METHODS

### Production of AAV2 Vectors

cDNAs encoding vasoinhibins (codons 1–142 of human prolactin), sFlt-1, and enhanced green fluorescent protein (EGFP) were obtained and cloned into AAV2 vectors downstream of a cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter as previously described.<sup>3</sup> AAV2 preparations were produced using a three-plasmid cotransfection system and purified by polyethylene glycol precipitation and cesium chloride density gradient fractionation using a previously described method.<sup>6</sup> The purified vectors were formulated in 10 mM Tris-HCl and 180 mM NaCl (pH 7.4) and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  before use. Quantification of vectors was done by real-time PCR using linearized plasmid standards. The titers of the vector preparations were  $1.4 \times 10^{12}$  vector genomes (vg) per ml for AAV2 vasoinhibin and AAV2 sFlt-1, and  $1.4 \times 10^{13}$  vg per ml for AAV2 EGFP. Two microliters of vector or vehicle was injected into the vitreous.

### Animals

Male Wistar rats (250 to 300 g) were cared for in accordance with the US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edn, National Academy Press, Washington, DC, USA). The Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology of the National University of Mexico (UNAM) approved all animal experiments.

### Groups without gene therapy

Animals were injected with a single intraperitoneal (i.p.) dose of streptozotocin (STZ; 60 mg/kg in 10 mM citrate buffer, pH 4.5) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) or vehicle after overnight fasting. Rats with a blood glucose concentration  $\geq 250$  mg/dl at 48 h were considered diabetic. Two, 4, and 6 weeks after STZ, rats were anesthetized with 70% ketamine and 30% xylazine (1  $\mu\text{l/g}$  body weight, i.p.), and the BRBB was examined by the Evans blue method.

### Groups with gene therapy after diabetes

Animals were injected with STZ or vehicle following the above procedures; 2 weeks later the diabetic and non-diabetic rats were anesthetized, and AAV2 vector ( $2.8 \times 10^9$  vg per eye) or vehicle was injected into the vitreous as previously described.<sup>7</sup> Four weeks after vector administration, some of the animals were anesthetized as above, and the BRBB was examined by the Evans blue method; other animals were subjected to fluorescein angiography, or to electroretinogram (ERG) examination and killed by decapitation to analyze retinal thickness. In addition, other rats were exposed to a  $\text{CO}_2$ -saturated inhalation chamber and killed by decapitation; their retinas were analyzed by quantitative PCR (qPCR) or flat-mounted for confocal microscopy evaluation.

### Groups with gene therapy before diabetes

Animals were injected intravitreally with AAV2 vector ( $2.8 \times 10^9$  vg per eye) or vehicle, and 4 weeks later diabetes was induced with STZ. Four weeks post-STZ, retinas were evaluated by the Evans blue method.

In other experiments, retinas from non-diabetic and six-week diabetic rats were processed for qPCR, immunohistochemistry, or dissected, weighed, and homogenized in 150  $\mu\text{l}$  lysis buffer (0.5% Igepal, 0.1% SDS, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin, and 100  $\mu\text{g/ml}$  PMSF, pH 7.4). Retinal homogenates were centrifuged (13 000 r.p.m. for 5 min), and the protein in the supernatant was evaluated by the Bradford method.<sup>8</sup>

### Evans Blue Method

The BRBB was evaluated by the Evans blue method, as previously reported.<sup>9</sup> Briefly, anesthetized rats were injected (intrajugularly) with the Evans blue tracer (45 mg/kg, Sigma-Aldrich). Two hours later, 1 ml of blood was drawn from the heart to measure the Evans blue concentration in plasma, and the rats were perfused for 2 min via the left ventricle with PBS (pH 3.5 at  $37^{\circ}\text{C}$ ) at a pressure that allowed a flow rate of 70 ml/min before insertion of catheter and start of perfusion. The retina was dissected and vacuum-dried (SPD 1010 SpeedVac System, ThermoSavant, USA) for 5 h. After weighing the tissue, the Evans blue tracer was extracted by incubating each retina in 100  $\mu\text{l}$  formamide (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ) for 18 h at  $72^{\circ}\text{C}$ . The extract was centrifuged at 300 000 g for 60 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Absorbance was measured in the supernatant at 620 nm using the NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE). The tracer concentration in the extracts was calculated from a standard curve of Evans blue in formamide and normalized to the retina and body weight and to the Evans blue concentration in plasma.

### Fluorescein Angiography

Anesthetized rats were injected intrajugularly with 100 mg/kg of fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (50 mg/ml, FITC-dextran: MW  $2 \times 10^6$  Da; Sigma-Aldrich). One hour

later, the rats were killed, and their retinas were flat-mounted, fixed for 4 h in freshly prepared 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS at room temperature, washed with PBS, mounted on glass slides with Vectashield (Vector Laboratories (Burlingame, CA), and coverslipped. Retinal flat-mounts were observed and digitalized with a  $\times 4$  objective under a fluorescence microscope (Olympus BX60 with a DP70 Olympus camera). Images were tiled to create a picture of the entire retina. The density of the capillary network was analyzed using the AngioTool image analysis software<sup>10</sup> having fixed settings for vessel diameter (1–5) and intensity (15–22).

### Electroretinogram

Rats were anesthetized after dark adaptation overnight, and pupils were fully dilated with a 0.5% tropicamide and 0.5% phenylephrin solution. Flash ERG responses were recorded from both eyes by a silver chloride ring electrode placed on the cornea. Two reference electrodes were positioned subcutaneously near the eyes. The light stimulation included a 1-ms flash with an intensity of 0.9 log cd.s/m<sup>2</sup> (PS33 Plus PhotoStimulator, GRASS Technologies, Warwick, RI). The bandpass was set at 3 Hz to 0.3 kHz (P511AC Amplifier, GRASS Technologies). Sixteen responses were averaged. The A-wave amplitude was measured from baseline to the trough of the A-wave, and the B-wave amplitude from the trough of the A-wave to the peak of the B-wave.

### Retinal Thickness

Eyes fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h at room temperature were then dehydrated and embedded in paraffin. Orientation of the serial sections (8  $\mu$ m) was assured by controlling that the cuttings passed through the optic nerve head and the cutting marker. Sections were stained with hematoxylin and eosin, and the total thickness of the retina and of both the inner and outer nuclear layers were measured at  $\times 20$  magnification using the ScanScope Digital Scanner and the Image Scope software (Aperio Technologies, Vista, CA). Images were taken at equivalent retinal eccentricities from the optic nerve head, and three measurements were taken on each retina within 1 mm of the optic nerve.

### Quantitative PCR

#### AAV transgene expression

Total RNA was isolated from frozen retinas using TRIzol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA), and cDNA was synthesized with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK). PCR products were separated on a 1.2% agarose gel and visualized using ethidium bromide, or detected and quantified with Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Auburn, AL) in a 10- $\mu$ l final reaction volume containing template and 0.5 mM of each of the following primer pairs for human *vasoinhibin*: 5'-CTGCCCGATGC CAGGTGA-3' (sense) and 5'-GAAAGTCTTTTTGATTC ATCTGT-3' (antisense); human *sFlt-1*: 5'-GACCTGGAGT

TACCCTGATGA-3' (sense) and 5'-ATGGTCCACTCCTTAC ACGAC-3' (antisense); *glypican 1*: 5'-TGGCGCCTACGGTG GAAATGATGT-3' (sense) and 5'-GAGTGGCGGCCGAGG TCTTCTGTGC-3' (antisense); *syndecan 4*: 5'-GAACCATGG CGCCTGTCTGC-3' (sense) and 5'-CCTGGGCTCCTCCGT GTCATCT-3' (antisense); *perlecan 1*: 5'-CTGCCACCTGA CAGTCGC-3' (sense) and 5'-GCTCTGGCACCTGCAG-3' (antisense); *hepatocyte growth factor receptor c-Met (hgfr c-Met)*: 5'-TCGTTTCCTGGGATTATTGC-3' (sense) and 5'-TGTTTTGTTTTGGCACAGGA-3' (antisense); *av $\beta$ 5 integrin*: 5'-CACCTGAATGAAGCCAATGA-3' (sense) and 5'-TCCATGCAAATCTCCACAG-3' (antisense); *fibroblast growth factor receptor 1 (fgfr 1)*: 5'-CAACACCAAACCAA ACCGTA-3' (sense) and 5'-GTTTTTCAACCAGCGCAAAG -3' (antisense) and *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (hprt)*: 5'-GACCGTTCTGTTCATGTTCG-3' (sense) and 5'-ACCTGGTTCATCATCACTAATCAC-3' (antisense). The amplification conditions were 10 s at 95 °C, 30 s at each primer pair-specific annealing temperature, and 30 s at 72 °C for 40 cycles. The PCR data were analyzed by the 2- $\Delta\Delta$ CT method, and cycle thresholds were normalized to the housekeeping gene *hprt* to calculate mRNA expression levels.

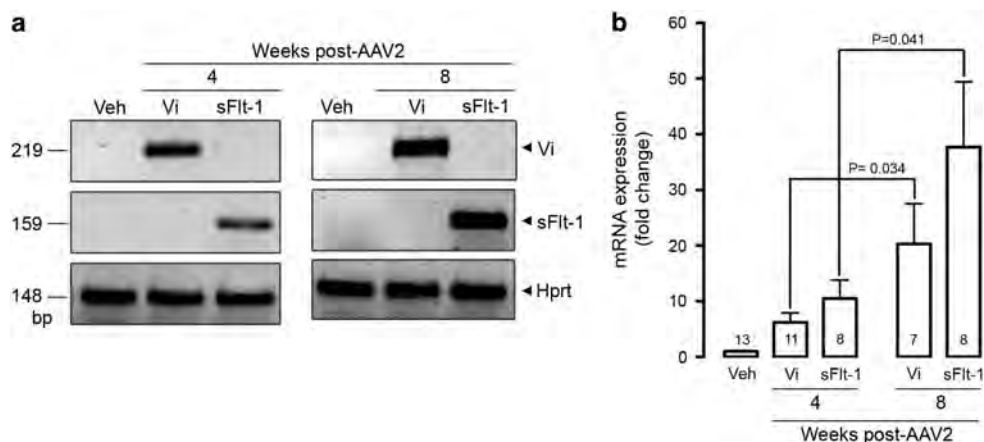
#### AAV genome copy number

Total genomic DNA was isolated from frozen, AAV2-injected control and diabetic rat retinas. A 100-ng sample of genomic DNA was tested for the presence of AAV2 DNA by qPCR using primers binding to the CMV promoter. qPCR for the 28S ribosomal DNA was used as loading control for normalization purposes. PCR products were detected and quantified with Maxima SYBR Green /ROX qPCR Master Mix using the following primer pairs for CMV: 5'-TGCC CAGTACATGACCTTAT-3' (sense) and 5'-AATGGGGCGG AGTTGTTAC-3' (antisense); and rat 28S ribosomal DNA: 5'-CAGTACGAATACAGACCG-3' (sense) and 5'-GGCAAC AACACATCATCAG-3' (antisense). The amplification conditions for the CMV were 30 s at 94 °C, 30 s at 60.5 °C, and 30 s at 72 °C for 40 cycles, whereas for 28S ribosomal DNA the annealing temperature was 56.5 °C. For absolute quantification, standard curves for the two plasmids were performed using concentrations ranging from 10<sup>7</sup>–10 molecules per  $\mu$ l as determined by spectrophotometry.

#### Histological Evaluation of EGFP

Eyes, without the lens, were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature and washed with PBS. The entire retinas were carefully dissected from the eyecups, flat-mounted on glass slides by making four radial cuts from the edges to the equator, and coverslipped with mounting media (Vectashield) to directly detect EGFP fluorescence by confocal microscopy (LSM 780, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany). An observer blind to the experiment captured and evaluated serial optical z-sections from three different areas throughout the retinal ganglion cell layer neighboring the optic nerve. EGFP fluorescence per area





**Figure 1** Verification of AAV2-mediated retinal transgene expression. **(a)** RT-PCR analysis of vasoinhibin (Vi) and sFlt-1 mRNA in retinas obtained from rats 4 and 8 weeks after they had been intravitreally injected with vehicle (Veh), AAV2 Vi, or AAV2 sFlt-1 vectors. The sizes of RT-PCR products are given in bp. Amplification of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (Hprt) was used as an internal standard. **(b)** qRT-PCR-based quantification of Vi and sFlt-1 mRNA levels in retinas from rats 4 and 8 weeks after they had been intravitreally injected with Veh, AAV2 Vi, or AAV2 sFlt-1 vectors. Bars represent mean  $\pm$  s.e.m. Numbers inside bars indicate the number of retinas evaluated. AAV2, adeno-associated virus type 2; qRT-PCR, quantitative reverse transcription PCR.

was quantified using the Pro-Plus image analysis software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

### Immunohistochemistry for FGFR1

Eyes were fixed in 4% paraformaldehyde for 4 h at room temperature and then cryo-protected with 15% sucrose for 1 day. Subsequently, eyes were frozen in optimal cutting temperature (OCT) compound (Tissue-Tek; Sakura Finetech Torrance, CA), and 12- $\mu$ m-thick cryostat sections were mounted on gelatin-coated slides. Sections were washed with PBS to remove OCT, blocked with PBS containing 3% bovine serum albumin, 5% normal goat serum, and 0.1% Triton X-100 for 2 h at room temperature, and immunostained overnight at 4°C with a 1:50 dilution of the anti-FGFR1 monoclonal antibody (ab823 from Abcam PLC, Cambridge, UK). After incubation, samples were washed three times with PBS for 15 min, labeled for 4 h with a 1:500 dilution of Alexa Fluor 488 goat anti-mouse secondary antibody (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), washed three times with PBS, coverslipped using DAPI Vectashield, and imaged by confocal microscopy.

### Statistical Analysis

The statistical analyses were performed using the Sigma Stat 7.0 software (Systat Software, San Jose, CA). Statistical differences between two and more than three groups were determined by the unpaired two-tailed Student's *t*-test and one-way ANOVA followed by Bonferroni's or Tukey's *post hoc* comparison tests, respectively. The threshold for significance was set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Verification of Vasoinhibin and sFlt-1 Transgene Expression in the Retina

Total retinal RNA from eyes injected with vehicle or with each one of the AAV2 vectors was treated with DNase to eliminate genomic DNA contamination. Amplification of DNase-treated RNA without reverse transcriptase generated no products for vasoinhibin or sFlt-1 (not shown). No human vasoinhibin or human sFlt-1 transcript was present in normal, vehicle-injected eyes (Figure 1a), confirming that the primers do not amplify endogenous vasoinhibin or sFlt-1 in the rat. Products of the expected size for human vasoinhibin and sFlt-1 were amplified in normal retinas 4 and 8 weeks after being transduced with the respective vectors (Figure 1a), and the expression of both transgenes was significantly higher at 8 weeks post transduction (Figure 1b).

### The AAV2 Vasoinhibin and AAV2 sFlt-1 Vectors Reverse Diabetes-Induced Blood-Retinal Barrier Pathology

Table 1 shows the body weight and blood glucose levels for diabetic rats and their matched non-diabetic controls. Diabetic rats showed a reduced weight from 4 to 8 weeks post-STZ treatment, and their blood glucose levels were significantly higher compared with non-diabetic controls at all times.

The STZ rat model of diabetes mimics some of the early changes of human DR, including BRBB. When evaluated using the retinal accumulation of Evans blue or other plasma tracers, BRBB was reported as early as 5 days and up to 10 weeks post-STZ treatment.<sup>3,4,9,11-14</sup> Here, we confirmed the early and sustained damage of the BRB in this diabetes model by showing that a significant increase in the retinal accumulation of Evans blue-stained albumin occurs at 2 weeks



**Table 1 Body weight and blood glucose concentrations of non-diabetic and diabetic rats**

Duration of diabetes (week)	Treatment	<i>n</i>	Weight (g)	Blood glucose (mg/dl)
2	ND (NI)	4	334.5 ± 8.9	100.0 ± 3.3
	D (NI)	4	325.9 ± 6.9	478.6 ± 30.8*
4	ND (NI)	20	363.1 ± 6.3	98.6 ± 2.5
	D (NI)	20	274.4 ± 9.6*	469.7 ± 17.9*
	ND (Veh)	28	341.6 ± 5.8	103.9 ± 2.8
	D (Veh)	20	263.5 ± 4.5*	486.6 ± 15.3*
	ND (Vi)	9	348.9 ± 7.7	100.6 ± 5.12
	D (Vi)	3	275.9 ± 6.8*	496.0 ± 8.5*
	ND (sFlt-1)	3	359.4 ± 5.9	99.0 ± 4.8
	D (sFlt-1)	4	285.8 ± 7.2*	491.3 ± 19.5*
6	ND (NI)	5	442.9 ± 6.3	105.1 ± 4.81
	D (NI)	4	345.2 ± 10.4*	464.4 ± 16.3*
	ND (Veh)	16	449.9 ± 6.9	103.8 ± 3.5
	D (Veh)	14	327.0 ± 10.6*	463.3 ± 11.7*
	ND (Vi)	25	463.2 ± 12.9	101.8 ± 3.3
	D (Vi)	25	341.1 ± 11.2*	505.5 ± 10.4*
	ND (sFlt-1)	6	430.6 ± 14.6	102.3 ± 3.5
	D (sFlt-1)	6	319.4 ± 13.4*	469.2 ± 18.5*
	ND (EGFP)	10	460.7 ± 9.7	110.5 ± 4.5
	D (EGFP)	11	321.0 ± 21.2*	468.1 ± 24.9*
8	ND (Vi)	7	507.2 ± 8.8	108.9 ± 4.9
	D (Vi)	8	370.1 ± 7.8*	482.2 ± 16.7*

Rats treated (D) or not (ND) with streptozotocin (STZ), were non-injected (NI) or injected intravitreally with vehicle (Veh), AAV2 vasoinhibin (Vi), AAV2 sFlt-1 (sFlt-1), or AAV2 EGFP (EGFP) and evaluated at 2, 4, 6, and 8 weeks after STZ. \**P* < 0.001 vs respective ND controls. Body weight and blood glucose values were similar within all ND and D groups at the same week period. Values represent mean ± s.e.m. Number of rats (*n*).

after STZ injection and is maintained at a similar level during the following 4 and 6 weeks (Figure 2a). To investigate the restoration of the BRB function, vehicle or  $2.8 \times 10^9$  vg of the AAV2 vasoinhibin vector or the AAV2 sFlt-1 vector was injected intravitreally into non-diabetic or diabetic rats 2 weeks after treatment with STZ, and the BRBB was quantified 4 weeks after vector administration by the retinal accumulation of Evans blue. As expected, diabetes induced a significant increase in tracer accumulation in vehicle-injected rats (Figure 2b). Treatment with either the AAV2 vasoinhibin vector or the AAV2 sFlt-1 vector reversed the diabetes-induced increase in BRBB. Evans blue accumulation was significantly lower in the diabetic rat retinas transduced with the AAV2 vasoinhibin vector or the AAV2 sFlt-1 vector than in vehicle-injected diabetic rat retinas (Figure 2b). Moreover, diabetic rat retinas transduced with

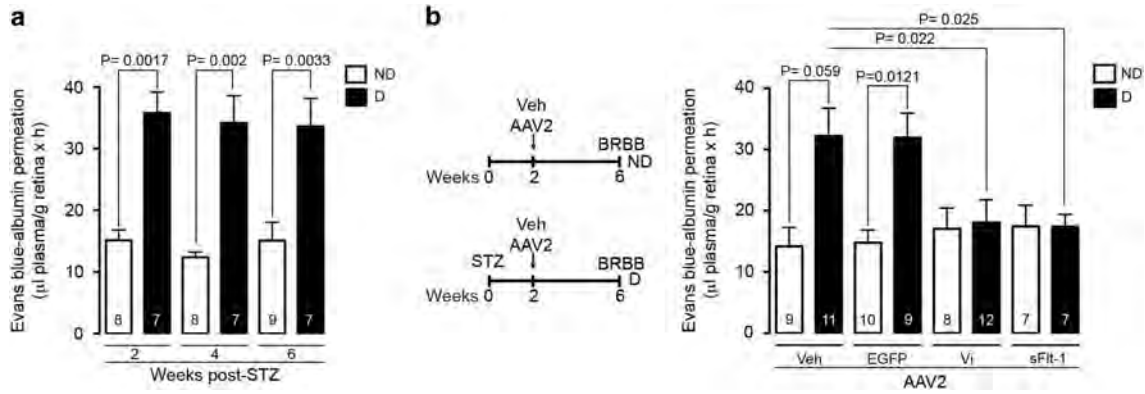
either one of these two vectors showed a level of Evans blue leakage similar to that in vehicle-injected, non-diabetic rats (Figure 2b). The reversal effect is specific to the vasoinhibin and the sFlt-1 transgenes, because the AAV2 EGFP vector had no effect, and none of the vectors modified Evans blue-stained albumin accumulation in non-diabetic rats (Figure 2b). These findings support the therapeutic potential of the AAV2 vasoinhibin and sFlt-1 vectors.

### The AAV2 Vasoinhibin Vector Reduces Diabetes-Induced Retinal Microvessel Abnormalities and Electrophysiological Dysfunction

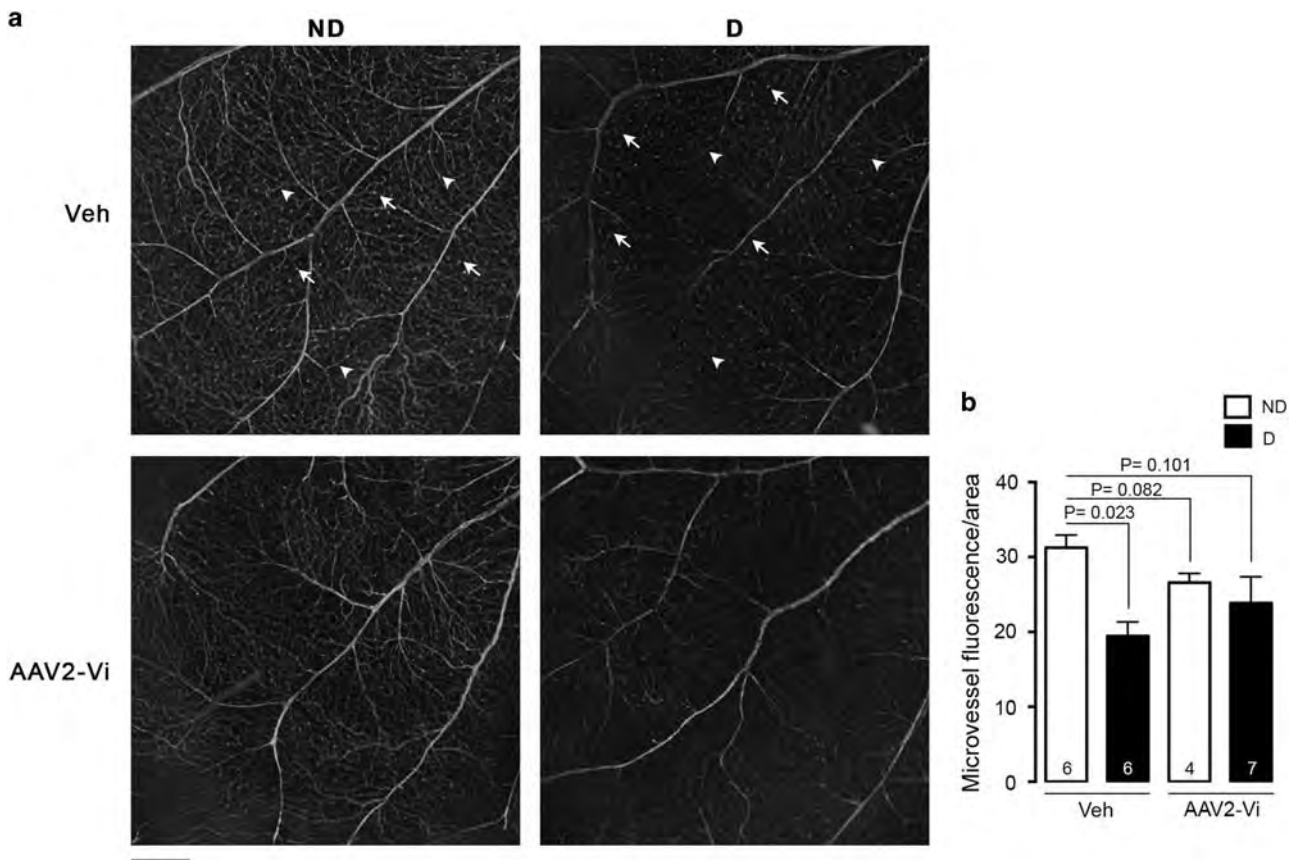
The therapeutic and safety properties of the AAV2 vasoinhibin vector were further investigated by evaluating the retinal vascular bed, electrophysiological function, and thickness of the retina in rats that had been diabetic for 6 weeks and injected with the vector or with vehicle 2 weeks after diabetes onset (as indicated in Figure 2b). Figure 3a shows representative images of the retinal vasculature of non-diabetic and diabetic rats obtained by fluorescein angiography. Consistent with previous findings using this technique,<sup>15,16</sup> the retinas of STZ-treated rats showed an intact vascular bed. However, the intensity of the fluorescein signal within the capillary vessels (arrow heads) was reduced in the vehicle-injected diabetic rat compared with the vehicle-injected non-diabetic control (Figure 3a). The fainter capillary vessels in the diabetic condition allowed better visualization of the short vertical capillary segments (indicated by arrows) connecting the superficial and the deep microvascular layers of the inner retina.<sup>17</sup> Accordingly, the microvessel fluorescein signal per area was significantly reduced in the diabetic rat compared with the non-diabetic control injected with vehicle (Figure 3b). No significant differences were observed in non-diabetic and diabetic rats injected with the AAV2 vasoinhibin vector with respect to the vehicle-injected non-diabetic control.

Next, we used the ERG to evaluate the functional status of the retina. Figure 4a shows representative ERG recordings under scotopic conditions of non-diabetic and diabetic rats injected with vehicle or with the AAV2 vasoinhibin vector. Quantitative analysis showed that the amplitude of the A-wave was similar among all groups (Figure 4b). However, the amplitude of the B-wave decreased significantly in vehicle-injected diabetic rats compared with the vehicle-injected non-diabetic controls (Figure 4c). The reduction of the B-wave was not statistically significant in diabetic rats treated with the AAV2 vasoinhibin vector, and this vector did not modify the B-wave amplitude of non-injected diabetic animals.

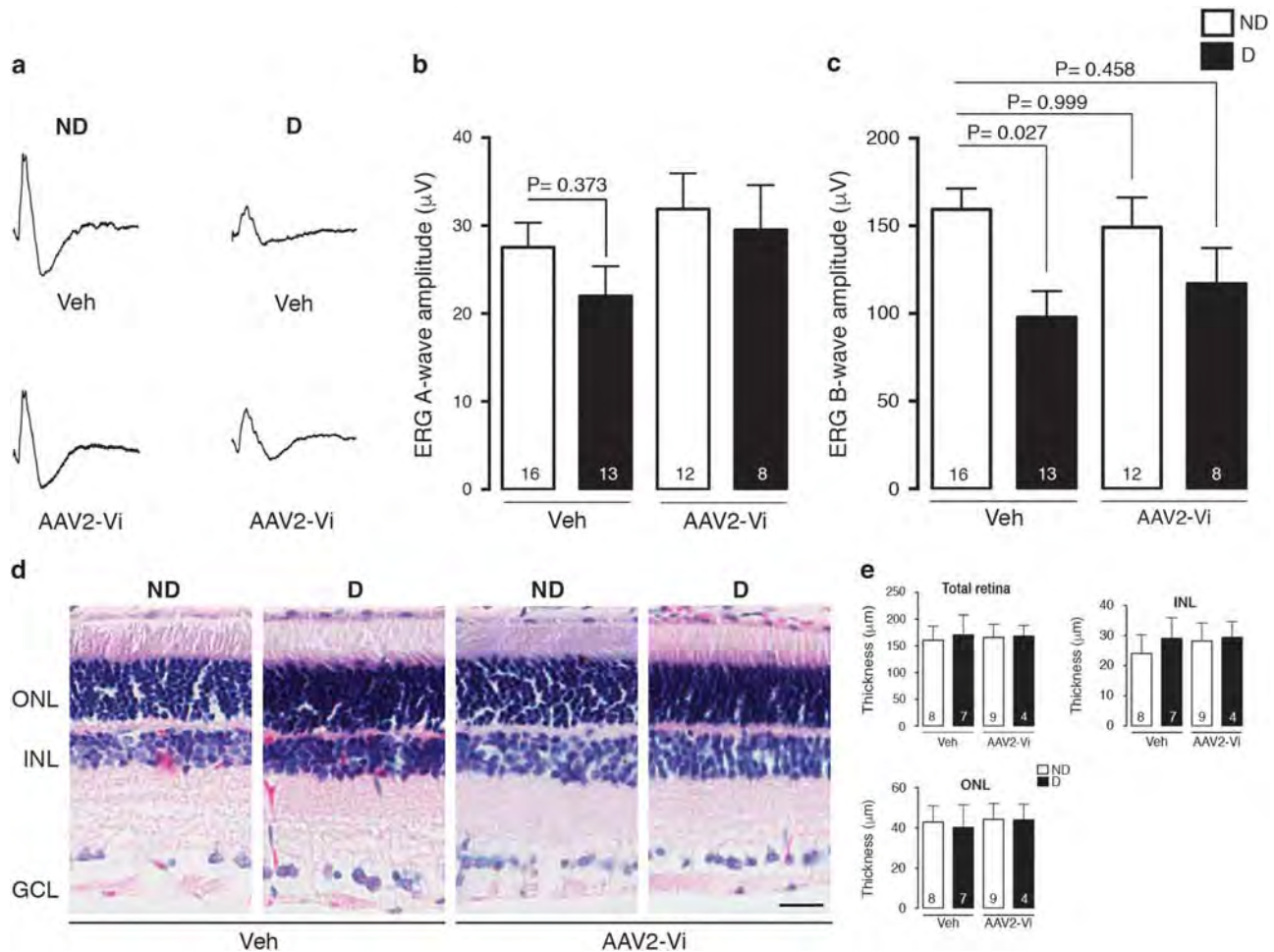
Finally, morphological examination of hematoxylin and eosin-stained retinal paraffin sections showed no difference in the thickness of the total retina, the inner nuclear layer, or the outer nuclear layer among groups (Figure 4d and e).



**Figure 2** The AAV2 vasoinhibin and AAV2 sFlt-1 vectors reverse diabetes-induced blood-retinal barrier pathology. (a) BRBB evaluated by the retinal accumulation of Evans blue-stained albumin in non-diabetic (ND) control rats and in diabetic (D) rats 2, 4, and 6 weeks after treatment with STZ. (b) Post-diabetes design diagram: vehicle (Veh), or AAV2 vasoinhibin (Vi), AAV2 sFlt-1, or AAV2-enhanced green fluorescent protein (EGFP) vectors were injected intravitreally into ND or into D rats 2 weeks after treatment with STZ, and BRBB was evaluated 4 weeks after vector administration. Values represent mean ± s.e.m. Numbers inside bars indicate the number of retinas evaluated. AAV2, adeno-associated virus type 2; BRBB, blood-retinal barrier breakdown; STZ, streptozotocin.



**Figure 3** The AAV2 vasoinhibin vector reduces diabetes-induced microvessel abnormalities. (a) Representative images of fluorescein-labeled retinas from non-diabetic (ND) control rats and diabetic (D) rats injected intravitreally with vehicle (Veh) or the AAV2 vasoinhibin (Vi) vector 2 weeks after treatment with STZ and subjected to fluorescein angiography 4 weeks after vector administration. Arrow heads indicate microvessels. Arrows indicate the short vertical capillary segments that connect the superficial and deep microvascular layers of the inner retina. Scale bar, 200 µm. (b) Quantification of microvessel fluorescein signal per retinal area. Values represent mean ± s.e.m. Numbers inside bars indicate the number of retinas evaluated. AAV2, adeno-associated virus type 2; STZ, streptozotocin.



**Figure 4** The AAV2 vasoinhibin vector reduces diabetes-induced retinal electrophysiological dysfunction. (a) Representative ERG responses under scotopic conditions of non-diabetic (ND) control rats and diabetic (D) rats injected intravitreally with vehicle (Veh) or the AAV2 vasoinhibin (Vi) vector 2 weeks after treatment with STZ and subjected to ERG evaluation 4 weeks after vector administration. Average amplitudes of A-wave (b) and B-wave (c). (d) Representative paraffin retinal cross-sections stained with hematoxylin and eosin subjected to morphogenic examination of the thickness of total retina and of both the inner nuclear layer (INL) and outer nuclear layer (ONL) (e) of retinas from ND and D rats injected intravitreally with the Veh or the AAV2 Vi 2 weeks after treatment with STZ and subjected to morphometric evaluation 4 weeks after vector administration. Values represent mean  $\pm$  s.e.m. Numbers inside bars indicate the number of retinas evaluated. AAV2, adeno-associated virus type 2; ERG, electroretinogram; STZ, streptozotocin.

### Diabetes Enhances the Efficacy, Transgene Expression, and Transduction of AAV2 Vectors in the Retina

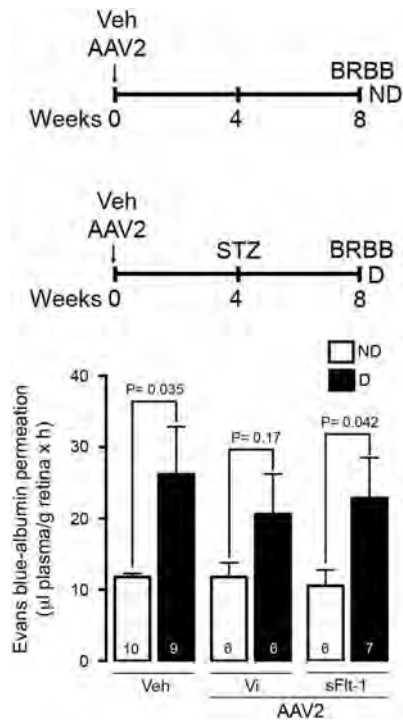
The protection against BRBB was reduced or absent when either vector were injected prior to inducing diabetes (Figure 5). In this experiment, vectors were injected intravitreally 4 weeks before inducing diabetes, and BRBB was evaluated 4 weeks thereafter. The increase in BRBB due to diabetes was no longer significant in retinas transduced with the AAV2 vasoinhibin vector, suggesting that vasoinhibins may have a small protective effect. However, the AAV2 sFlt-1 vector did not inhibit diabetes-induced BRBB, and the level of tracer in the vasoinhibin and the sFlt-1-transduced retinas was similar to that observed in the diabetic, vehicle-injected control (Figure 5).

Differences in the experimental design between the before- and after-diabetes groups do not interfere with the proper

evaluation of vector efficacy. The dissimilar times (6 and 4 weeks) following STZ injection result in BRBB of similar magnitudes (Figure 2a). Also, the shorter time post-AAV2 delivery (4 vs 8 weeks) in the after-diabetes group resulted in higher vector efficacy (Figure 2c) even though transgene expression increases over time (Figure 1b). These findings suggest that the diabetic state enhances the efficacy of AAV2 vasoinhibin and AAV2 sFlt-1 vectors to reduce blood–retinal barrier leakage.

To investigate whether increased AAV2 vector efficacy could be due to enhanced transgene expression in the retina of diabetic rats, we compared the expression levels of the vasoinhibin and sFlt-1 mRNAs encoded by the AAV2 vectors, 4 weeks after they had been injected intravitreally into non-diabetic and diabetic rats (Figure 6a). qPCR showed that the retinal expression of the vasoinhibin and sFlt-1 transgenes





**Figure 5** The AAV2 vasoinhibin and AAV2 sFlt-1 vectors fail to reduce diabetes-induced blood–retinal barrier pathology when injected prior to inducing diabetes. Pre-diabetes design diagram: vehicle (Veh), or AAV2 Vi, or AAV2 sFlt-1 vectors were injected intravitreally in non-diabetic rats (ND) or into rats (D) 4 weeks before treatment with STZ, and the retinal permeation of Evans blue-stained albumin was evaluated 8 weeks after vector administration. Values represent mean  $\pm$  s.e.m. Numbers inside bars indicate the number of retinas evaluated. AAV2, adeno-associated virus type 2; STZ, streptozotocin.

was nearly fourfold greater in the retinas from diabetic rats than from the non-diabetic controls (Figure 6b). Transgene expression was further investigated by using an AAV2 EGFP reporter vector. The AAV2 EGFP vector was injected intravitreally into non-diabetic rats or into diabetic rats 2 weeks after treatment with STZ, and the levels of EGFP were evaluated by direct fluorescence on flat-mounted retinas 4 weeks after vector delivery. Scattered positive cells and cell fibers were visualized throughout the ganglion cell layer of retinas from non-diabetic rats (Figure 6c). In the diabetic rat retina there was a fivefold enhancement of EGFP fluorescence associated with both somas and projections, and many of the latter corresponded to fibers that make up the optic nerve (Figure 6c).

To investigate whether increased transgene expression involved an enhanced transduction of AAV2 vectors in the retina, we quantified the viral genome copy number by qPCR at 4 weeks after vectors had been injected intravitreally in non-diabetic and diabetic rats (Figure 6d). The AAV2 genome levels increased significantly in the retina of diabetic rats compared with the non-diabetic controls.

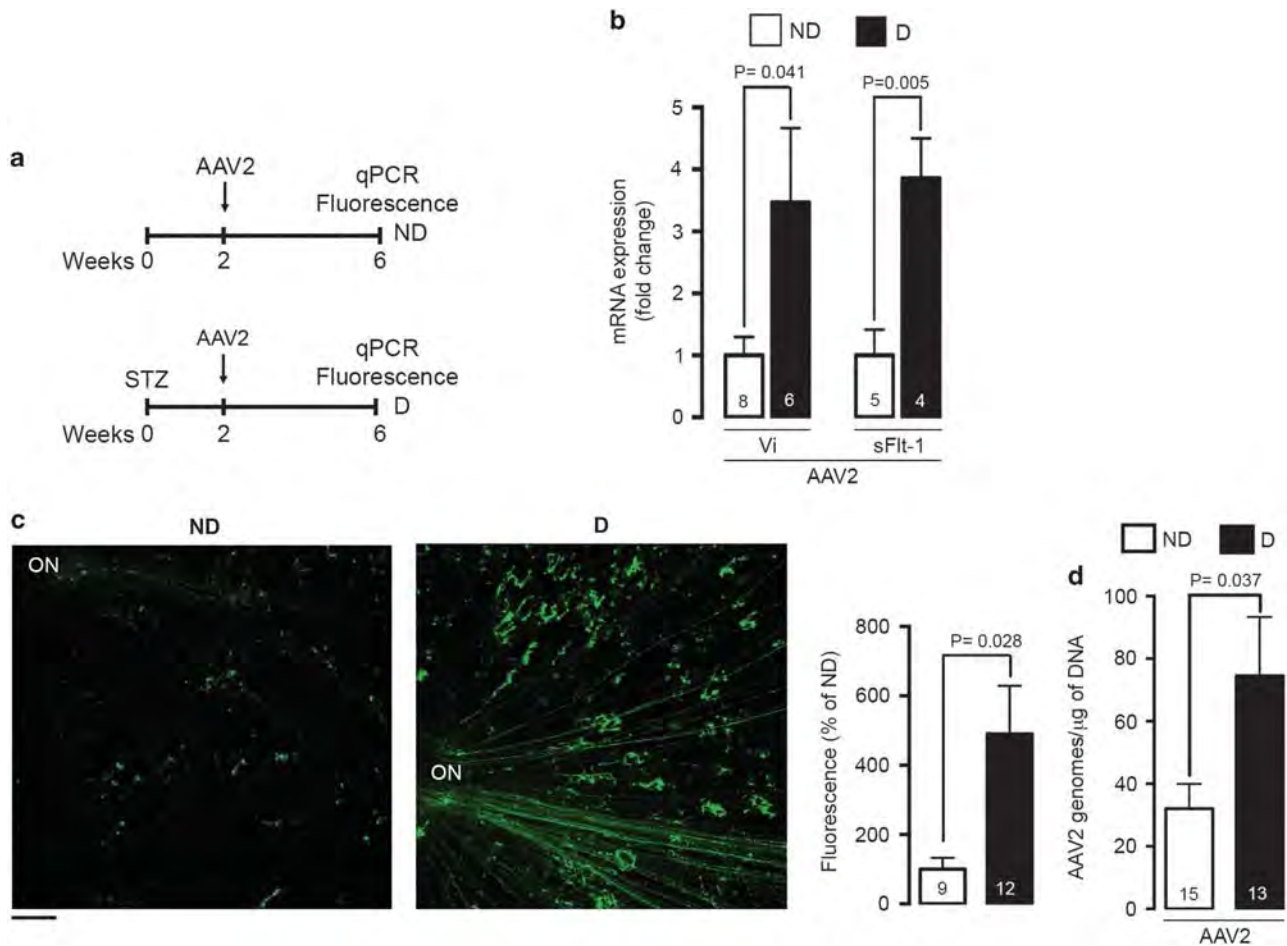
### The Expression of Primary Receptors and Co-Receptors of AAV2 Is Elevated in the Retinas from Diabetic Rats

Transduction efficiency is influenced by receptor- and co-receptor-mediated AAV2 attachment.<sup>18</sup> To investigate whether a different abundance of AAV2 receptors and co-receptors between the normal and diabetic rat retina might account for the greater recruitment of viral particles in the diabetic state, we evaluated the mRNA levels of AAV2 primary receptors (glypican, syndecan, and perlecan)<sup>20</sup> and co-receptors (FGFR1,<sup>21</sup>  $\alpha\beta 5$  integrin,<sup>22</sup> and HGFR<sup>23</sup>) by qPCR in retinas from non-diabetic and 4-week diabetic rats. The expression of all three primary receptors (Figure 7a) and all three co-receptors (Figure 7b) was significantly enhanced in the diabetic rat retina compared with non-diabetic controls. Consistent with these findings, FGFR1 immunoreactivity was faint and diffuse in the photoreceptors outer segments of the retina of non-diabetic rats, whereas it increased dramatically throughout the retina of diabetic rats (Figure 7c). Anti-FGFR1 staining was intense throughout the inner retina (inner nuclear layer, inner plexiform layer, and ganglion cell layer), and less intense and discrete in the outer retina (outer nuclear layer and outer segments) and choroid of diabetic rats. Omission of the primary antibody resulted in no labeling (not shown). Enhanced expression of AAV2 receptors and co-receptors does not reflect a general increase in protein synthesis, since total protein levels were similar in the retinas from diabetic and non-diabetic rats (Figure 7d).

### DISCUSSION

Increased transport through the BRB occurs in DR and DME and is responsible for much of the vision loss due to diabetes.<sup>1</sup> By producing a sustained expression of antiangiogenic molecules, the AAV vectors eliminate the risks associated with repeated intraocular pharmacotherapy and offer considerable promise for the treatment of DR and DME. Here, we show that diabetes-induced BRB pathology is reversed by the intravitreal delivery of AAV2 vectors encoding the antiangiogenic and anti-vasopermeability factors sFlt-1 and vasoinhibin, and that the AAV2 vasoinhibin vector is a safe procedure for reducing retinal microvessel abnormalities and electrophysiological dysfunction due to diabetes. Moreover, we found that the diabetic state substantially enhances the retinal transduction, transgene expression, and efficacy of AAV2 vectors.

VEGF is a major promoter of BRBB in DR and DME. The levels of VEGF increase in the vitreous of patients with DR and DME<sup>24,25</sup> and the clinical use of anti-VEGF molecules improves DME.<sup>26,27</sup> One such anti-VEGF agent is sFlt-1, which corresponds to the secreted extracellular domain of VEGF receptor 1 and blocks VEGF action by sequestering VEGF.<sup>28</sup> Vasoinhibins comprise a family of peptides that are generated by the specific proteolytic cleavage of prolactin and they exert potent antiangiogenic and anti-vasopermeability effects.<sup>29</sup> Vasoinhibins are found in the retina,<sup>7</sup> and their systemic concentration is reduced in patients with DR.<sup>30</sup>

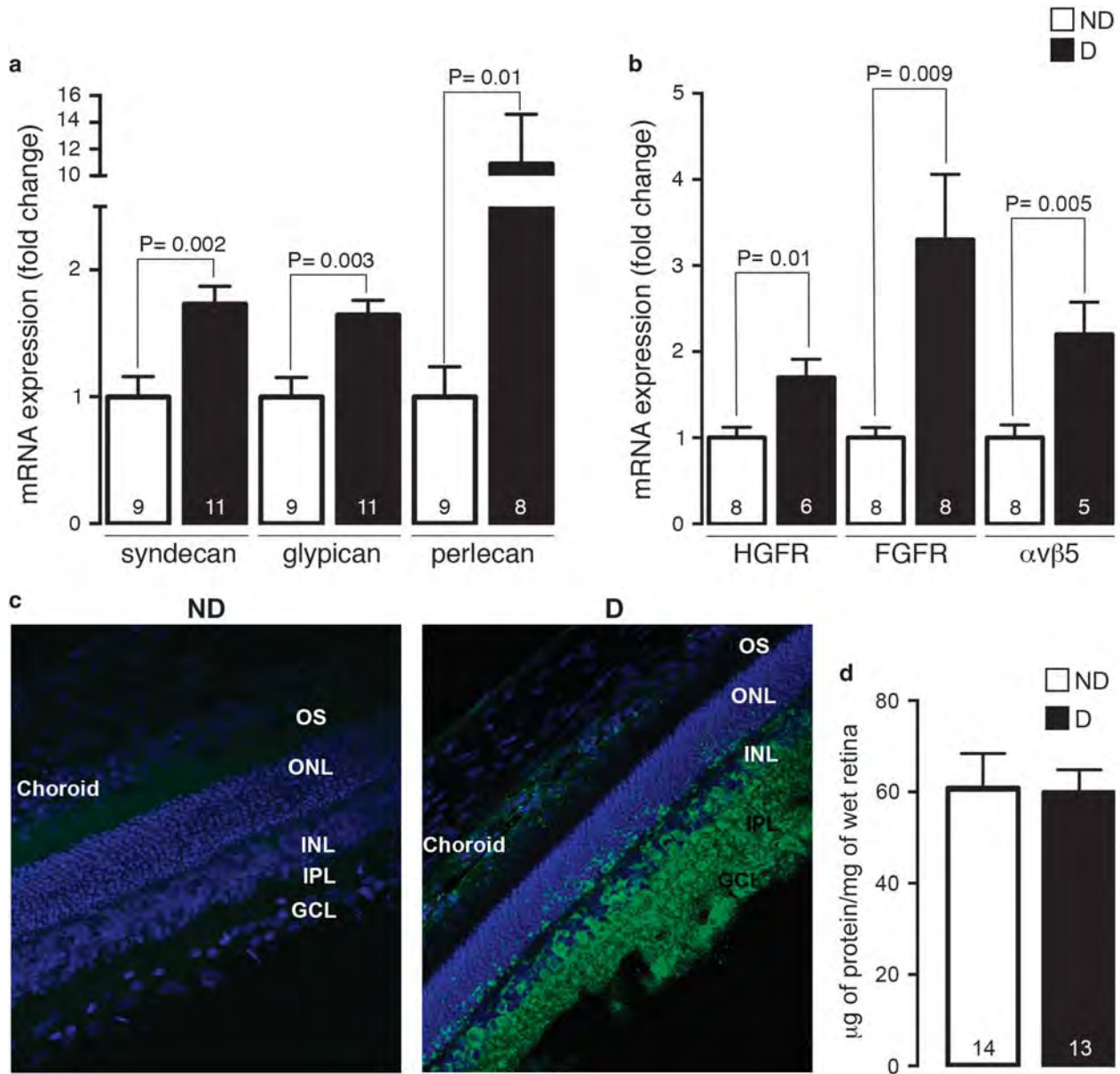


**Figure 6** Diabetes enhances the retinal transgene expression and transduction of AAV2 vectors. (a) Post-diabetes design diagram: AAV2 vasoinhibin (Vi), AAV2 sFlt-1, or AAV2 EGFP vectors were injected intravitreally into non-diabetic (ND) or into diabetic (D) rats 2 weeks after treatment with STZ, and the expression of Vi and sFlt-1 mRNA and the levels of the EGFP were evaluated by qPCR and direct fluorescence on flat-mounted retinas, respectively. (b) qRT-PCR-based quantification of Vi and sFlt-1 mRNA levels in retinas from ND and D rats transduced with the AAV2 Vi and AAV2 sFlt-1 vectors. (c) Representative confocal microscope visualization of direct EGFP fluorescence in the ganglion cell layer of a flat-mounted retinal preparation from ND and D rats transduced with the AAV2 EGFP vector. Scale bar, 100  $\mu$ m. (d) qPCR-based quantification of AAV genome copy number in retinas from ND and D rats transduced with AAV2 vectors. Values represent mean  $\pm$  s.e.m. Numbers inside bars indicate the number of retinas evaluated. AAV2, adeno-associated virus type 2; ON, optic nerve; qRT-PCR, quantitative reverse transcription PCR; STZ, streptozotocin.

Vasoinhibins inhibit ischemia-induced retinal angiogenesis<sup>31</sup> and reduce diabetes-induced BRBB by targeting both the inner (vascular endothelial cells) and the outer (retinal pigment epithelium) components of the BRB.<sup>32,33</sup> The effects of vasoinhibins<sup>3,32,33</sup> and sFlt-1<sup>34,35</sup> against BRBB have been well-documented using Evans blue and a variety of other *in vivo* and *in vitro* techniques that have revealed signaling mechanisms mediating their action. For example, VEGF antagonists and vasoinhibins block calcium influx through transient receptor potential channels; they also inhibit the activation of phospholipase C gamma and phosphatidylinositol-3-kinase-Akt mechanisms, thereby leading to downstream blockage of eNOS activation and the reinforcement of junctional proteins linked to the actin cytoskeleton.<sup>32,33,36–38</sup>

AAV-mediated gene transfer of sFlt-1 successfully reduces BRBB when the vector is delivered before diabetes manifests in the spontaneously diabetic Torii rat.<sup>34</sup> AAV2 vectors encoding sFlt-1 or vasoinhibin also reduce BRBB in rats when injected before inducing diabetes with STZ.<sup>3</sup> While these findings demonstrate the preventive effect of these vectors against diabetes-mediated BRBB, the important question of whether BRBB can be reversed by AAV2 vectors had not been addressed. Here, we show that the AAV2 vasoinhibin and sFlt-1 vectors restored the BRB when injected after BRB damage is fully manifest. These findings demonstrate that both vectors reverse a retinal alteration that causes visual impairment in DR and DME.

Furthermore, the AAV2 vasoinhibin vector reduced other aspects of the retinal disease occurring in STZ-treated



**Figure 7** The expression of primary receptors and co-receptors of AAV2 is elevated in the retina from diabetic rats. qRT-PCR-based quantification of AAV2 receptors (glypican, syndecan, and perlecan) (a) and co-receptors (fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR),  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin, and hepatocyte growth factor receptor (HGFR)) (b) in retinas from non-diabetic (ND) and 6-week diabetic (D) rats. (c) Immunolocalization and comparison of FGFR1 immunoreactivity between retinal sections of ND and six-week D rats. Scale bar, 50  $\mu$ m. (d) Total protein levels in retinas from ND and six-week D rats. Values represent mean  $\pm$  s.e.m. Numbers inside bars indicate the number of retinas evaluated. AAV2, adeno-associated virus type 2; GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; OS, outer segments; qRT-PCR, quantitative reverse transcription PCR.

rodents. It inhibited the reduction in fluorescein intensity within capillary vessels that may be caused by factors associated with perfusion abnormalities, such as decreased retinal blood flow,<sup>15</sup> subnormal retinal oxygenation,<sup>39</sup> and disruption of the BRB<sup>15</sup> (present results). Also, the amplitude of the B-wave, but not that of the A-wave of the ERG, commonly reduced in the STZ rodent model of DR,<sup>16,40,41</sup> was ameliorated by the AAV2 vasoinhibin vector. Supporting its safety, the vector did not modify the retinal vascular bed

and the ERG in non-diabetic rats. Finally, we explored the thinning of the retina which, owing to the neurodegeneration of the inner retina, occurs in diabetic humans,<sup>42–45</sup> and in some,<sup>46–49</sup> but not all,<sup>50</sup> diabetic rodent studies. We confirmed that retinal thinning does not occur at 6 weeks post-STZ-treatment,<sup>47,49</sup> and showed that the AAV2 vasoinhibin vector did not modify it. These observations suggest that the expression of vasoinhibins by AAV2 vectors, as reported for sFlt-1,<sup>51,52</sup> is a safe procedure, causing no gross



retinal changes and protecting against retinal microvascular alterations and loss of retinal electrophysiological function in diabetes.

Reversal of BRB damage by the AAV2 vasoinhibin and sFlt-1 vectors occurred at a dose 10 times smaller than the one used in our previous study ( $2.8 \times 10^9$  vg vs  $2.8 \times 10^{10}$  vg).<sup>3</sup> However, using this smaller dose and the same experimental parameters of our previous report,<sup>3</sup> neither of the two vectors clearly prevented BRBB. The absence of effect may relate to the lower dose and/or to the smaller number of animals in our current study. Nonetheless, the vasoinhibin and the sFlt-1 vectors totally reversed the BRBB when delivered after inducing diabetes. Thus, it seemed likely that the efficacy of AAV2 vectors was being potentiated by the diabetic state.

Indeed, transgene expression is enhanced in the diabetic rat retina. The mRNA levels of the vasoinhibin and sFlt-1 transgenes were fourfold higher and the EGFP levels increased fivefold in the retinas from diabetic vs non-diabetic rats. Consistent with the reported tropism of intravitreally delivered AAV2 vectors,<sup>53</sup> the elevated AAV2 transgene expression occurred in the inner retina, particularly in ganglion cell somas and in their projections that make up the optic nerve. These findings suggest that the diabetic condition potentiates the action of AAV2 vectors by increasing their transduction in permissive cells. Supporting this possibility, we found that AAV2 genome levels were enhanced in the diabetic rat retina compared with the non-diabetic control. Transduction may be facilitated by a higher abundance of AAV2 receptors and co-receptors favoring cell entry.

Heparan sulfate proteoglycans (HSPG) are glycoproteins containing one or more HS chains, and structural determinants of HS interact with AAV2 capsid proteins.<sup>54</sup> HSPG associated with cell membranes (syndecans and glypicans) serve as primary receptors, enabling vector docking and the subsequent interactions with AAV2 co-receptors (FGFR1,  $\alpha\beta 5$ , and HGFR) required for endosomal entry. Also, HSPG associated with the extracellular matrix (perlecans) help store and concentrate AAV2, thus enabling their presentation to attachment and entry receptors.<sup>55</sup> We found that the mRNA levels of the core proteins in syndecan 4, glypican 1, and perlecan 1, and of all three co-receptors (FGFR1,  $\alpha\beta 5$ , and HGFR) increased in the diabetic rat retina. Furthermore, FGFR1 immunoreactivity, normally concentrated in photoreceptor cell bodies,<sup>56</sup> dramatically increased throughout the retina of diabetic rats, mainly in the inner retina, a localization pattern consistent with its reported presence in activated Müller cells.<sup>57</sup>

Increased levels of HSPG and of AAV2 co-receptors are not unexpected in DR and may contribute to its progression. High glucose levels upregulate cell-associated proteoglycans in retinal pericytes<sup>58</sup> and promote the secretion of HS chains by endothelial cells,<sup>59</sup> and VEGF increases the retinal expression of the HS side chains of HSPGs.<sup>60</sup> Perlecan binds FGFs,<sup>61,62</sup> and the intraretinal stores of immunoreactive bFGF and

HSPG increase in patients with DR.<sup>63</sup> Of note, abnormal HSPG expression and structure can contribute to vascular leakage and to the release of pro-angiogenic factors in DR,<sup>64</sup> whereas bFGF,  $\alpha\beta 5$  integrin, and HGF can signal to promote angiogenesis in DR.<sup>65</sup> However, contrary to what is expected from our findings using rats after 6 weeks of STZ, the mRNA levels of perlecan, the [<sup>35</sup>S] sulfate incorporation into HSPG,<sup>66</sup> and the immunolocalization of HSPG<sup>67</sup> decrease in the retina of diabetic rats at 5 and 11 months after STZ treatment, respectively. These findings suggest that the synthesis of HSPG may change as diabetes progresses and emphasize the need to examine the long-term differential efficacy of AAV2 vectors.

Although the abundance of AAV2 receptors and co-receptors directly correlates with the efficacy of AAV2 vectors,<sup>68–70</sup> other major events can favor vector entry and transduction in diabetes. Diabetes alters the function and structure of all retinal cell types,<sup>71</sup> and loss of integrity and changes in retinal architecture are known to increase AAV vector transduction. Disruption of the inner limiting membrane caused by mild proteolytic digestion,<sup>72</sup> by structural changes of the Müller cell endfeet,<sup>73</sup> by laser pretreatment,<sup>74</sup> or by retinal degeneration<sup>72</sup> allow for enhanced AAV transduction of outer retinal cells after their intravitreal delivery. Moreover, nuclear uptake, capsid uncoating, and second-strand DNA synthesis following receptor binding are major rate-limiting steps in AAV transduction<sup>75–78</sup> that need to be investigated.

In conclusion, we have demonstrated the therapeutic potential of two AAV2 vectors encoding anti-vascular permeability and anti-angiogenic factors in DR and DME by delivering them after BRBB is well-established. While intravitreal delivery is a safe treatment, the transduction efficiency of AAV2 vectors can fall short of requirements for adequate retinal transgene expression,<sup>68</sup> and higher vector doses increase the risk of systemic dissemination and immune activation.<sup>2</sup> Our demonstration that vector efficacy and transduction after intravitreal delivery are enhanced by the diabetic state provides a way to conquer these problems and emphasizes the advantages of the AAV2 gene transfer approach to treat DR and DME. Non-invasive techniques such as fluorescein angiography, ocular coherence tomography, and magnetic resonance imaging are used increasingly to evaluate BRBB in a wide range of species including mice and rats.<sup>79</sup> These techniques will help stage AAV2 therapy and follow its efficacy, additional treatment benefits, and side effects over the time period relevant for translational research.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Fernando López-Barrera, Gabriel Nava, Nydia Hernández-Ríos, Estela Albino Sánchez, Michael C Jeziorski, Daniel Mondragón, Antonio Prado, Martín García, and Alejandra Castilla for their technical assistance; and Dorothy D Pless for critically editing the manuscript. Nundehui Díaz-Lezama is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 245224 from the National Council of Science and Technology of Mexico

(CONACYT). Research was supported by CONACYT grants SALUD-2011-1-161594 and 247164 to CC.

#### DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

- Boyer DS, Hopkins JJ, Sorof J *et al*. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for diabetic macular edema. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2013;4:151–169.
- Vandenberghe LH, Auricchio A. Novel adeno-associated viral vectors for retinal gene therapy. *Gene Ther* 2012;19:162–168.
- Ramirez M, Wu Z, Moreno-Carranza B *et al*. Vasoinhibin gene transfer by adenoassociated virus type 2 protects against Vegf- and diabetes-induced retinal vasopermeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:8944–8950.
- Shyong MP, Lee FL, Kuo PC *et al*. Reduction of experimental diabetic vascular leakage by delivery of angiostatin with a recombinant adeno-associated virus vector. *Mol Vis* 2007;13:133–141.
- Verma A, Shan Z, Lei B *et al*. Ace2 and Ang-(1-7) confer protection against development of diabetic retinopathy. *Mol Ther* 2012;20:28–36.
- Grimm D, Zhou S, Nakai H *et al*. Preclinical *in vivo* evaluation of pseudotyped adeno-associated virus vectors for liver gene therapy. *Blood* 2003;102:2412–2419.
- Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC *et al*. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2947–2953.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
- Xu Q, Qaum T, Adamis AP. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using evans blue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:789–794.
- Zudaire E, Gambardella L, Kurcz C *et al*. A Computational tool for quantitative analysis of vascular networks. *PLoS One* 2011;6:e27385.
- Shi X, Liao S, Mi H *et al*. Hesperidin prevents retinal and plasma abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecules* 2012;17:12868–12881.
- Zhang J, Wu Y, Jin Y *et al*. Intravitreal injection of erythropoietin protects both retinal vascular and neuronal cells in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:732–742.
- Kusari J, Zhou SX, Padillo E *et al*. Inhibition of vitreoretinal vegf elevation and blood-retinal barrier breakdown in streptozotocin-induced diabetic rats by brimonidine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:1044–1051.
- Arnold E, Rivera JC, Thebault S *et al*. High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. *Diabetes* 2010;59:3192–3197.
- Clermont A, Chilcote TJ, Kita T *et al*. Plasma kallikrein mediates retinal vascular dysfunction and induces retinal thickening in diabetic rats. *Diabetes* 2011;60:1590–1598.
- Kern TS, Tang J, Berkowitz BA. Validation of structural and functional lesions of diabetic retinopathy in mice. *Mol Vis* 2010;16:2121–2131.
- Paques M, Tadayoni R, Sercombe R *et al*. Structural and hemodynamic analysis of the mouse retinal microcirculation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4960–4967.
- Schultz BR, Chamberlain JS. Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Mol Ther* 2008;16:1189–1199.
- Harbison CE, Chiorini JA, Parrish CR. The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. *Trends Microbiol* 2008;16:208–214.
- Summerford C, Samulski RJ. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 1998;72:1438–1445.
- Qing K, Mah C, Hansen J *et al*. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 1999;5:71–77.
- Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. Alphavbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 1999;5:78–82.
- Kashiwakura Y, Tamayose K, Iwabuchi K *et al*. Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 2005;79:609–614.
- Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG *et al*. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994;331:1480–1487.
- Funatsu H, Yamashita H, Nakamura S *et al*. Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2006;113:294–301.
- Stewart MW. Anti-Vegf therapy for diabetic macular edema. *Curr Diab Rep* 2014;14:510.
- Stefanini FR, Badaro E, Falabella P *et al*. Anti-Vegf for the management of diabetic macular edema. *J Immunol Res* 2014;2014:632307.
- Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (Vegfr-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* 2006;9:225–230.
- Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC *et al*. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev* 2009;89:1177–1215.
- Triebel J, Huefner M, Ramadori G. Investigation of prolactin-related vasoinhibin in sera from patients with diabetic retinopathy. *Eur J Endocrinol* 2009;161:345–353.
- Pan H, Nguyen NQ, Yoshida H *et al*. Molecular targeting of antiangiogenic factor 16k Hprl inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2413–2419.
- Garcia C, Aranda J, Arnold E *et al*. Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2a-dependent Enos inactivation. *J Clin Invest* 2008;118:2291–2300.
- Arredondo Zamarripa D, Diaz-Lezama N, Melendez Garcia R *et al*. Vasoinhibins regulate the inner and outer blood-retinal barrier and limit retinal oxidative stress. *Front Cell Neurosci* 2014;8:333.
- Ideno J, Mizukami H, Kakehashi A *et al*. Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble Flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. *Int J Mol Med* 2007;19:75–79.
- Gehlbach P, Demetriades AM, Yamamoto S *et al*. Periocular gene transfer of sflt-1 suppresses ocular neovascularization and vascular endothelial growth factor-induced breakdown of the blood-retinal barrier. *Hum Gene Ther* 2003;14:129–141.
- Bates DO. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovasc Res* 2010;87:262–271.
- Gonzalez C, Corbacho AM, Eiserich JP *et al*. 16k-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology* 2004;145:5714–5722.
- Thebault S. Vasoinhibins prevent bradykinin-stimulated endothelial cell proliferation by inactivating Enos via reduction of both intracellular Ca<sup>2+</sup> levels and enos phosphorylation at Ser1179. *Pharmaceuticals* 2011;4:1052–1069.
- Luan H, Roberts R, Sniegowski M *et al*. Retinal thickness and subnormal retinal oxygenation response in experimental diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:320–328.
- Zhang Y, Zhang J, Wang Q *et al*. Intravitreal injection of exendin-4 analogue protects retinal cells in early diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:278–285.
- Bhatt LK, Addepalli V. Attenuation of diabetic retinopathy by enhanced inhibition of Mmp-2 and Mmp-9 using aspirin and minocycline in streptozotocin-diabetic rats. *Am J Transl Res* 2010;2:181–189.
- Bialosterski C, van Velthoven ME, Michels RP *et al*. Decreased optical coherence tomography-measured pericentral retinal thickness in patients with diabetes mellitus Type 1 with minimal diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2007;91:1135–1138.
- van Dijk HW, Kok PH, Garvin M *et al*. Selective loss of inner retinal layer thickness in type 1 diabetic patients with minimal diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3404–3409.
- Oshitari T, Hanawa K, Adachi-Usami E. Changes of macular and Rnfl thicknesses measured by stratus Oct in patients with early stage diabetes. *Eye (Lond)* 2009;23:884–889.
- van Dijk HW, Verbraak FD, Kok PH *et al*. Decreased retinal ganglion cell layer thickness in patients with type 1 diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:3660–3665.
- Barber AJ, Lieth E, Khin SA *et al*. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. early onset and effect of insulin. *J Clin Invest* 1998;102:783–791.
- Park SH, Park JW, Park SJ *et al*. Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia* 2003;46:1260–1268.



48. Berkowitz BA, Roberts R, Stemmler A *et al*. Impaired apparent ion demand in experimental diabetic retinopathy: correction by lipoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4753–4758.
49. Martin PM, Roon P, Van Ells TK *et al*. Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3330–3336.
50. Feit-Leichman RA, Kinouchi R, Takeda M *et al*. Vascular damage in a mouse model of diabetic retinopathy: relation to neuronal and glial changes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:4281–4287.
51. MacLachlan TK, Lukason M, Collins M *et al*. Preclinical safety evaluation of Aav2-Sflt01- a gene therapy for age-related macular degeneration. *Mol Ther* 2011;19:326–334.
52. Lukason M, DuFresne E, Rubin H *et al*. Inhibition of choroidal neovascularization in a nonhuman primate model by intravitreal administration of an Aav2 vector expressing a novel Anti-Vegf molecule. *Mol Ther* 2011;19:260–265.
53. Auricchio A, Kobinger G, Anand V *et al*. Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model. *Hum Mol Genet* 2001;10:3075–3081.
54. Kern A, Schmidt K, Leder C *et al*. Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids. *J Virol* 2003;77:11072–11081.
55. Vives RR, Lortat-Jacob H, Fender P. Heparan sulphate proteoglycans and viral vectors: ally or foe? *Curr Gene Ther* 2006;6:35–44.
56. Ozaki S, Radeke MJ, Anderson DH. Rapid upregulation of fibroblast growth factor receptor 1 (Flg) by rat photoreceptor cells after injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:568–579.
57. Guillonneau X, Regnier-Ricard F, Laplace O *et al*. Fibroblast growth factor (Fgf) soluble receptor 1 acts as a natural inhibitor of Fgf2 neurotrophic activity during retinal degeneration. *Mol Biol Cell* 1998;9:2785–2802.
58. Fisher EJ, McLennan SV, Yue DK *et al*. Cell-associated proteoglycans of retinal pericytes and endothelial cells: modulation by glucose and ascorbic acid. *Microvasc Res* 1994;48:179–189.
59. Han J, Zhang F, Xie J *et al*. Changes in cultured endothelial cell glycosaminoglycans under hyperglycemic conditions and the effect of insulin and heparin. *Cardiovasc Diabetol* 2009;8:46.
60. Witmer AN, van den Born J, Vrensen GF *et al*. Vascular localization of heparan sulfate proteoglycans in retinas of patients with diabetes mellitus and in vegf-induced retinopathy using domain-specific antibodies. *Curr Eye Res* 2001;22:190–197.
61. Joseph SJ, Ford MD, Barth C *et al*. A proteoglycan that activates fibroblast growth factors during early neuronal development is a perlecan variant. *Development* 1996;122:3443–3452.
62. Smith SM, West LA, Hassell JR. The core protein of growth plate perlecan binds Fgf-18 and alters its mitogenic effect on chondrocytes. *Arch Biochem Biophys* 2007;468:244–251.
63. Hanneken A, de Juan Jr. E, Luty GA *et al*. Altered distribution of basic fibroblast growth factor in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1991;109:1005–1011.
64. Conde-Knape K. Heparan sulfate proteoglycans in experimental models of diabetes: a role for perlecan in diabetes complications. *Diabetes Metab Res Rev* 2001;17:412–421.
65. Friedlander M, Theesfeld CL, Sugita M *et al*. Involvement of integrins alpha V Beta 3 and alpha V beta 5 in ocular neovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9764–9769.
66. Bollineni JS, Alluru I, Reddi AS. Heparan sulfate proteoglycan synthesis and its expression are decreased in the retina of diabetic rats. *Curr Eye Res* 1997;16:127–130.
67. Hammes HP, Weiss A, Hess S *et al*. Modification of vitronectin by advanced glycation alters functional properties in vitro and in the diabetic retina. *Lab Invest* 1996;75:325–338.
68. Coura Rdos S, Nardi NB. The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virol J* 2007;4:99.
69. Duan D, Li Q, Kao AW *et al*. Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 1999;73:10371–10376.
70. Duan D, Yue Y, Yan Z *et al*. Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J Clin Invest* 2000;105:1573–1587.
71. Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK *et al*. Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes* 2006;55:2401–2411.
72. Kolstad KD, Dalkara D, Guerin K *et al*. Changes in adeno-associated virus-mediated gene delivery in retinal degeneration. *Hum Gene Ther* 2010;21:571–578.
73. Vacca O, Darche M, Schaffer DV *et al*. AAV-mediated gene delivery in Dp71-null mouse model with compromised barriers. *Glia* 2014;62:468–476.
74. Lee SH, Colosi P, Lee H *et al*. Laser photocoagulation enhances adeno-associated viral vector transduction of mouse retina. *Hum Gene Ther Methods* 2014;25:83–91.
75. Ding W, Zhang L, Yan Z *et al*. Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* 2005;12:873–880.
76. Campbell EM, Hope TJ. Gene therapy progress and prospects: viral trafficking during infection. *Gene Ther* 2005;12:1353–1359.
77. Ferrari FK, Samulski T, Shenk T *et al*. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 1996;70:3227–3234.
78. Thomas CE, Storm TA, Huang Z *et al*. Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors. *J Virol* 2004;78:3110–3122.
79. Berkowitz B. MRI Studies of Blood-Retinal Barrier: New Potential for Translation of Animal Results to Human Application. In: Jousen AM, Gardner TW, Kirchhof B *et al*. (eds). *Retinal Vascular Disease*. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2007, pp 154–164.