



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**ESTUDIO SOBRE LA EXPRESIÓN DE VIRUS ADENOSOCIADOS
TIPO 2 EN LA RETINA DE RATAS DIABÉTICAS**

Tesis
para obtener el grado de
Maestra en Ciencias (Neurobiología)

Presenta
LBM Nundehui Díaz Lezama

Directora de Tesis

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L.



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.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Carmen Clapp Jiménez Labora.

RESUMEN

La retinopatía diabética (RD) es un trastorno vasoproliferativo de la retina que ocurre en pacientes diabéticos y constituye la principal causa de ceguera en los adultos. Los tratamientos actuales de la RD comprometen la funcionalidad de la retina y no son eficaces en todos los pacientes, por lo que es de gran interés la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. Al respecto, una opción promisoriosa es la transferencia intraocular de genes inhibidores de la proliferación vascular mediante el uso de vectores derivados de virus adenoasociados recombinantes del serotipo 2 (rAAV2). Estos vectores tienen ventajas como la transducción permanente de múltiples tipos celulares de la retina y la baja toxicidad. En este estudio investigamos la localización y nivel de expresión de los transgenes codificados por los AAV2 en la RD. Para ello utilizamos como modelo la diabetes experimental inducida por inyección intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg) y la inyección intravitreal de AAV2 que transducen a la proteína verde fluorescente (GFP). Dos semanas después de la inducción de diabetes, ratas diabéticas (>250 mg/dl glucosa en sangre) y ratas sanas fueron inyectadas intravitrealmente con AAV2-GFP y 4 semanas después se evaluó la expresión de la GFP en criosecciones de retina y en montajes planos de retina por inmunohistoquímica y fluorescencia directa, respectivamente. La GFP se detectó en la capa de células ganglionares de la retina y en proyecciones que conforman al nervio óptico. La cuantificación de la fluorescencia debida a la GFP fue significativamente mayor en la retina de ratas diabéticas en relación a la de las no diabéticas. Consistentemente con esta diferencia, la expresión de los receptores a AAV2 (sindecano y perlecano), evaluada por RT-PCR en tiempo real, se incrementó significativamente en la retina de ratas diabéticas con respecto a la de las ratas sanas. Estos resultados muestran que la inyección intravitreal de los AAV2 resulta en la transferencia exitosa de los transgenes en células ganglionares de la retina y que dicha transferencia aumenta en la diabetes debido, al menos en parte, al incremento de receptores a los AAV2. Por lo tanto, se propone que en la RD las condiciones de la retina favorecen el uso de los AAV2 como vectores de transferencia de moléculas terapéuticas.

ABSTRACT

Diabetic retinopathy (DR) is a retinal vasoproliferative disease that constitutes the leading cause of blindness among working-aged people. Current treatments for DR are not effective in all patients and can be destructive, so that developing new strategies against DR has become a major research focus. Ocular-gene therapy based on the adeno-associated virus serotype 2 (AAV2) delivery of antiangiogenic molecules offers considerable promise for the treatment of DR. AAV2 produce long-term transgene expression in a variety of retinal cell types with minimal toxicity. In this study, we investigated the retinal localization and level of expression of AAV2 transgenes in DR. For this purpose, we used the streptozotocin-induced diabetes rat model and the intravitreal injection of AAV2 encoding the green fluorescence protein (GFP). Two weeks after inducing diabetes, diabetic rats (>250 mg/dl glucose in blood) and non-diabetic rats were injected intravitreally with AAV2-GFP, and four weeks later GFP-positive cells were detected in retinal cryosections and in retinal flat-mounts by immunohistochemistry and direct fluorescence, respectively. GFP was located in the retinal ganglion cell layer and in cellular projections that form the optic nerve. GFP fluorescence was significantly higher in the retina of diabetic vs. non-diabetic rats. Consistent with this difference, the expression of the AAV2 receptors (syndecan and perlecan), evaluated by real-time RT-PCR, was significantly higher in the diabetic vs. the healthy retina. These findings show that the intravitreal delivery of AAV2 transduces ganglion cells in the retina and that this transduction increases in diabetes due, in part, to a higher expression of AAV2 receptors. It is proposed that retinal conditions in DR favor the use of AAV2 vectors for the delivery of therapeutic molecules.

Agradezco a:

La Dra. Carmen Clapp,

por la oportunidad que me dio de formar parte de su equipo de trabajo y el apoyo brindado para que este proyecto se llevara a cabo.

El Dr. Daniel Reyes Haro y el Dr. Francisco Vázquez Cuevas

por aceptar formar parte del Comité Tutorial y por sus valiosas aportaciones durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros y amigos (los nuevos y los no tan nuevos): Eve, Lupis, Xaru, Maydis, German, David, Normis, Elvita, Edna, Lenin.

De manera particular agradezco a Eris y Eduardo que aunque lejos siempre están dispuestos a compartir su tiempo y brindarme su amistad incondicional.

Agradecimientos Institucionales

Agradezco:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la subvención de mi beca (Becario No. 290882) y del trabajo experimental (SALUD-2011-1-1611594).

El apoyo técnico y la valiosa ayuda del Nut. Fernando López Barrera y de la ISC Elsa Nydia Hernández Río 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.

Dedicatoria

A mis padres y hermanos a quienes amo profundamente y que haría falta más de una vida para agradecerles todo lo que han hecho por mí, únicamente puedo decirles que son mi fuente de inspiración y alegría.

A mis abuelas muchas gracias por su apoyo, cariño y comprensión.

A Isaac cuya filosofía y alegría por la vida marcó para siempre la mía.

La perfección es una pulida colección de errores.

Maric Benedetti

ÍNDICE

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
I.- INTRODUCCIÓN	4
II.- ANTECEDENTES	5
II.1 RETINOPATÍA DIABÉTICA	5
II.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA	7
II.2.1 Mecanismos bioquímicos que median el daño celular de la hiperglucemia crónica	8
<i>Vía de los polioles o del sorbitol</i>	8
<i>Producción intracelular de precursores de productos terminales de la glicosilación avanzada</i>	9
<i>Activación de la proteína cinasa C (PKC)</i>	9
II.3 TRATAMIENTO DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA	10
II.4 VECTORES VIRALES	13
II.5 HISTOLOGÍA DE LA RETINA	16
III.- ANTECEDENTES INMEDIATOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
IV.- JUSTIFICACIÓN	22
V.- HIPÓTESIS	22
VI.- OBJETIVOS	22
VII.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23
VII.1 MATERIALES	23
VI.1.1 Animales	23
VII.2 METODOLOGÍA	23
VII.2.1 Modelo de diabetes inducida por estreptozotocina	23
VII.2.2 Inyección intravitreal de AAV2-GFP	23
VII.2.3 Inmunohistoquímica	24
VII.2.4 Montaje plano de retina	24

VII.2.5 Extracción de mRNA	25
VII.2.6 Síntesis de DNA complementario (cDNA)	25
VII.2.7 PCR en tiempo real.....	26
VII.2.8 Análisis Estadístico	27
VIII.- RESULTADOS	28
VIII.1 LOCALIZACIÓN DE LA TRANSDUCCIÓN DEL AAV2-GFP EN LA CAPA DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA	28
VIII.2 LA TRANSDUCCIÓN DE AAV2-GFP EN LA RETINA AUMENTA EN LA DIABETES	28
VIII.2.1 Evaluación de la Fluorescencia de GFP en Montajes Planos de Retina.....	29
VIII.2.2 Cuantificación del mRNA de la GFP por RT-PCR en tiempo real.....	32
VIII.2.3 La expresión de Glipicano y Sindecano receptores de AAV2 aumenta en condiciones de diabetes	34
IX.- DISCUSIÓN	35
X.- REFERENCIAS	40

I.-INTRODUCCIÓN

La retinopatía diabética (RD) es una enfermedad de la microvasculatura retiniana, y es como una de las complicaciones más frecuentes en personas que han padecido diabetes por varios años (Frank 2004). La diabetes es un grave problema de salud a nivel mundial, su prevalencia esta incrementándose de manera acelerada y se estima que para el año 2030 el número de personas con diabetes será de alrededor de 366 millones (International Diabetes Federation, 2007). Este incremento en la prevalencia de diabetes lleva asociado de manera inevitable un aumento en la prevalencia de la RD. La RD constituye la principal causa de ceguera en personas en edad laboral (Fong et al. 2004). Actualmente la fotocoagulación láser y la vitrectomía son los tratamientos más utilizados contra la RD, sin embargo, estas terapias por sí mismas son destructivas y pueden generar pérdida de la agudeza y del campo visual (Ciulla et al. 2003; Chew et al. 2003; Smiddy and Flynn 1999).

Dado que el crecimiento aberrante de los vasos sanguíneos determina la patogénesis de la RD, se están llevando a cabo investigaciones en la búsqueda de tratamientos antiangiogénicos. Sin embargo debido a la naturaleza crónica de esta enfermedad la inhibición de la angiogénesis debe ser sostenida por largos períodos de tiempo y hasta el momento las moléculas antiangiogénicas que han sido estudiadas en modelos animales tienen una vida media corta, por lo que su administración intraocular debe ser frecuente y de por vida, lo que conlleva al aumento en los riesgos de complicaciones oculares graves como la endoftalmitis. Ante este panorama, una opción terapéutica en el tratamiento de la RD que se está evaluando intensamente es la terapia génica mediante vectores virales (Mingozzi and High 2011), que permitan la expresión de moléculas terapéuticas a largo plazo reduciendo la administración del tratamiento a un solo evento.

Entre los vectores virales que han mostrado los resultados más prometedores en la terapia génica ocular se encuentran los virus adenoasociados (AAV), y en particular, el serotipo 2 (AAV2) (Mingozzi and High 2011). El AAV2 utiliza como receptores a proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG por sus siglas en inglés) (Summerford and Samulski 1998), proteínas altamente glicosiladas que se encuentran formando parte de la matriz extracelular

y de la membrana celular de una gran variedad de tipos celulares, incluidas células de la retina (Clark et al. 2011).

En el presente trabajo evaluamos la localización de la expresión de transgenes codificados por AAV2 inyectados intravitrealmente. Además, estudiamos si esta expresión se veía modificada bajo condiciones de diabetes. A continuación revisaremos brevemente algunos aspectos generales sobre la retinopatía diabética, su fisiopatología y tratamiento, así como los antecedentes inmediatos que nos llevaron a plantear la importancia de llevar a cabo este proyecto de investigación.

II.-ANTECEDENTES

II.1 RETINOPATÍA DIABÉTICA

Clínicamente la RD se define como una microangiopatía progresiva que se caracteriza por lesiones, oclusión de los vasos capilares y neovascularización de la retina en personas con diabetes (Cheung et al. 2010). En este padecimiento se identifican dos etapas: la no proliferativa (RDNP) y la proliferativa (RDP).

Los cambios que se producen en la RDNP, están limitados a la retina y no pasan más allá de su membrana limitante interna (la capa de la retina más próxima al cuerpo vítreo). Los signos clásicos que caracterizan a la RDNP incluyen microaneurismas, hemorragias intrarretinianas puntuales, edema retiniano, exudados proteicos o lipídicos, deformaciones microvasculares, deformaciones arteriolas y áreas de oclusión capilar (Kollias and Ulbig 2010). La mayoría de los signos en esta etapa de la enfermedad son asintomáticos y solo detectables por oftalmoscopia.

En la tabla 1 se presenta una breve descripción de algunos de los signos clásicos que aparecen en la RDNP.

TABLA 1.- SIGNOS CLÁSICOS DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA NO PROLIFERATIVA

SIGNO	DESCRIPCIÓN
Microaneurismas	Su tamaño varía de 15-150 μm . Son de color rojizo, redondos y suelen aparecer en el polo posterior de la retina. Su número es variable y aumentan con la progresión de la enfermedad.
Hemorragias Intrarretinianas	Son la consecuencia de la rotura de los microaneurismas o capilares alterados. Pueden ser de 2 tipos; superficiales y profundas. Las superficiales tienen forma alargada y aparecen en las fibras nerviosas de la capa de células ganglionares de la retina. Las profundas son redondeadas con bordes irregulares y se localizan en la capa plexiforme externa y nuclear interna.
Exudados proteicos lipídicos	o Son depósitos extracelulares de lípidos y proteínas séricas, como consecuencia de la alteración de la barrera hematorretiniana.
Exudados algodonosos blandos	o Tienen aspecto blanquecino, son redondeados, de bordes imprecisos, y se localizan superficialmente en las fibras nerviosas de la capa de células ganglionares de la retina. En realidad no son exudados propiamente dichos, sino infartos isquémicos focales de la capa de fibras nerviosas.
Deformaciones microvasculares intrarretinianas	Son alteraciones patológicas de la red capilar retiniana en forma de segmentos vasculares dilatados y tortuosos. Se suelen localizar rodeando a los exudados blandos.

En la RDP, tiene lugar la proliferación de vasos sanguíneos (angiogénesis) en la retina, los cuales crecen, invaden y sangran en el cuerpo vítreo (Fig. 1), además pueden inducir la formación de una membrana fibrovascular que llega a ejercer tracción sobre la retina, desprendiéndola y ocasionando ceguera (Frank 2004). Si la RDP sigue progresando los neovasos pueden formarse incluso dentro del estroma del iris y acompañarse de fibrosis, lo cual provocaría la obstrucción del flujo normal del humor acuoso en la cámara anterior del ojo, aumentando la presión intraocular conocida como glaucoma neovascular, enfermedad muy dolorosa y de mal pronóstico que finalmente también provoca ceguera.



Figura 1.-Esquema de un ojo con retinopatía diabética proliferativa (RDP) donde se puede observar la presencia de los neovasos sanguíneos invadiendo el cuerpo vítreo (flechas).

II.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA

Entre las múltiples causas que se han propuesto conducen a la RD se encuentra la hiperglucemia crónica (Brownlee 2001). La hiperglucemia crónica genera especies reactivas de oxígeno que a través de diversas alteraciones bioquímicas conllevan a la muerte de pericitos y células endoteliales (Mizutani et al. 1996). Los pericitos son células accesorias de los capilares sanguíneos con propiedades contráctiles que ayudan a regular el flujo sanguíneo. La muerte de pericitos y del endotelio favorece la vasodilatación y la permeabilidad vascular, lo que a su vez conlleva a la acumulación de proteínas de origen plasmático en la membrana basal del capilar. La luz de estos capilares retinianos avasculares constituidos por una membrana basal gruesa puede obstruirse fácilmente (Lawreason J., 2000). La obstrucción de los capilares disminuye la perfusión sanguínea (isquemia), que trae como consecuencia una hipoxia localizada. La hipoxia promueve la angiogénesis al estimular la producción de factores angiogénicos, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Aiello et al. 1995; Shweiki et al. 1992), y de inhibir la de los antiangiogénicos, como el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) (Mori et al. 2002). Los neovasos son histológicamente diferentes a los vasos retinianos normales, no conservan la barrera hematorretiniana, sangran con mayor facilidad y tienden a crecer en dirección del vítreo sustentados en un tejido fibroso que tiene capacidad contráctil (Davis MD et al., 2001). Estas alteraciones son responsables de las hemorragias vítreas, el desprendimiento de la retina y la consecuente ceguera (Kollias and Ulbig 2010).

II.2.1 Mecanismos bioquímicos que median el daño celular de la hiperglucemia crónica

Existen hasta el momento varias hipótesis acerca de los mecanismos involucrados en el daño a nivel celular ocasionado por la hiperglucemia crónica y del por qué ciertos tipos celulares (células endoteliales de los capilares de la retina, células mesangiales de los glomérulos renales, neuronas y células de Schwann de los nervios periféricos) son más susceptibles a este daño. Se ha observado que la mayoría de las células contienden con la hiperglucemia a través de reducir la incorporación de glucosa de manera que la concentración interna de glucosa permanece constante. En contraste, las células mencionadas más susceptibles no son capaces de disminuir el transporte intracelular de glucosa en forma eficiente (Heilig et al. 1995; Kaiser et al. 1993). Entre los mecanismos por los cuales la alta glucosa intracelular promueve la muerte celular se incluyen el incremento en la activación de la vía de los polioles y en la formación de productos terminales de la glicosilación avanzada y la activación de isoformas de la proteína cinasa C (Brownlee 2005).

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 la vía de los polioles, también conocida como la vía del sorbitol. En esta vía la enzima aldosa reductasa reduce la glucosa produciendo sorbitol que más tarde es convertido a fructosa. En ese proceso, la aldosa reductasa usa 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 mostrado que inhibidores de la aldosa reductasa disminuyen la presencia de microaneurismas en la retina de pacientes diabéticos (1990), y previenen la reducción en la transmisión nerviosa (neuropatía) observada en perros diabéticos (Engerman et al. 1994).

Producción intracelular de precursores de productos terminales de la glucosilación avanzada.- Los productos terminales de la glucosilación avanzada o AGEs (por sus siglas en inglés “Advanced glycosylated end products”) provienen de la auto-oxidación intracelular de la glucosa a glioxal (Wells-Knecht et al. 1995), de la descomposición del producto de amadori (derivado de la glucosa 1-amino-1deoxifruktosa) a 3-deoxiglucosona, de la fragmentación del gliceraldehído-3-fosfato y de la transformación de dihidroxiacetona-fosfato a metilglioxal (Thornalley 1990). Estas moléculas (glioxal, 3-deoxiglucosona y metilglioxal) reaccionan con los grupos amino de proteínas intracelulares para formar los AGEs. La importancia de los AGEs en la patogénesis de las complicaciones de la diabetes se ha dilucidado en modelos animales en los que al inhibir los AGEs se previene parcialmente algunas manifestaciones de alteraciones microvasculares ocasionadas por la diabetes en los nervios, riñones y retina (Hammes et al. 1991; Nakamura et al. 1997; Soulis-Liparota et al. 1991). La producción de los AGE daña a las células blanco vía 3 mecanismos generales. 1) Modifican y alteran la función de proteínas intracelulares, tales como las involucradas en la regulación de la transcripción génica (Giardino et al. 1994; Shinohara et al. 1998). 2) Los precursores de los AGEs pueden difundir fuera de la célula y modificar la estructura y función de proteínas de la matriz extracelular (Charonis et al. 1990; McLellan et al. 1994) y, 3) pueden alterar a proteínas en el torrente sanguíneo como la albúmina. Estas proteínas circulantes modificadas pueden unirse a sus receptores (receptores de AGEs) localizados en diversos tipos celulares causando la producción de citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento, que a su vez inducen alteraciones vasculares (Abordo et al. 1996; Kirstein et al. 1992; Schmidt et al. 1995). De hecho, se ha mostrado que la inhibición farmacológica de los AGEs previene cambios estructurales tardíos de la retinopatía diabética experimental (Hammes et al. 1991).

Activación de la proteína cinasa C (PKC). La alta concentración de glucosa dentro de la célula aumenta la síntesis de diacilglicerol (DAG), que es un cofactor/activador crítico para las isoformas clásicas de la PKC ($-\beta$, $-\alpha$, $-\delta$) (Derubertis and Craven 1994; Koya et al. 1997; Koya and King 1998; Xia et al. 1994). 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 (eNOS), la endotelina-1 (ET-1), el VEGF, el factor transformante beta (TGF- β), el inhibidor del activador de

plasminógeno-1 (PAI-1), etc. En general, la activación de la PKC por hiperglucemia favorece la expresión de los factores relacionados con el daño celular mientras que disminuye la de los factores relacionados con el mantenimiento de la función normal (Brownlee 2001). Por estudios farmacológicos se encontró que inhibidores de la PKC previenen alteraciones vasculares en la retina y riñón debidos a la diabetes (Bishara et al. 2002; Ishii et al. 1996; Koya et al. 2000).

II.3 TRATAMIENTO DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA

Las opciones terapéuticas actuales de la RD están restringidas básicamente a la fotocoagulación con rayos láser (1990; 1991) (Group MPS) y a procedimientos quirúrgicos como la vitrectomía (Kaplan 1996; Thomas et al. 1992), cuyos principios básicos se revisan brevemente a continuación.

La fotocoagulación con rayos láser es una terapia utilizada para una gran variedad de enfermedades retinianas dentro de las que se encuentra la RDP. Esta terapia consiste en producir quemaduras con láser en la retina periférica, promoviendo la regresión de la neovascularización en las regiones tratadas lo cual reduce la posibilidad de que se produzca la hemorragia vítrea y el desprendimiento de la retina. La fotocoagulación es un proceso térmico donde la energía luminosa es absorbida por los tejidos pigmentados y es convertida en calor causando la desnaturalización proteica. Se desconoce hasta el momento el mecanismo exacto por el cual la fotocoagulación laser actúa pero se ha hipotetizado que el láser, absorbido principalmente por la melanina del epitelio pigmentario retiniano (RPE), provoca la muerte de algunas células de este epitelio por la acción térmica (Suomalainen 1993) y estas células son la principal fuente de factores proangiogénicos como el VEGF (Adamis et al. 1993).

En la clínica el uso de la fotocoagulación láser como tratamiento para la RDP 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 (1981; 1991)(Diabetic Retinopathy Study Research Group).

El otro tratamiento ampliamente utilizado es la vitrectomía (Fig. 2), indicada en casos graves de RDP, específicamente aquellos que cursan con desprendimiento de la retina o una hemorragia vítrea severa (Ciulla et al. 2003). Consiste en remover una porción o todo el vítreo del ojo mediante succión y sustituirlo por algún gas (que se absorbe naturalmente en 2-3 semanas), un líquido aceitoso especial (que no se absorbe y debe ser retirado quirúrgicamente en un futuro) o por una combinación de gas y aceite. A medida que el gas o aire es absorbido, el ojo lo reemplaza por un fluido transparente, el humor acuoso, que va a llenar la cámara vítrea. El inconveniente de este procedimiento quirúrgico es que aumenta el riesgo de la formación de cataratas en un 44% (1988) (Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group) y en el peor de los casos de endoftalmitis.



Figura 2.- Esquema que ilustra la extracción del cuerpo vítreo por succión durante la vitrectomía.

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. Por consiguiente, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas capaces de interferir con la disfunción vascular en la RD ha sido el principal foco de la investigación científica aplicada de este campo. Un gran número de terapias antiangiogénicas experimentales han evolucionado en los últimos años (Bainbridge et al. 2003) que se basan fundamentalmente en el bloqueo de la acción del VEGF con anticuerpos (Adamis et al. 1996), RNA de interferencia (Reich et al. 2003),

quimeras de proteínas receptoras (Aiello et al. 1995) o receptores solubles a ese factor (Bainbridge et al. 2002)

Dentro de los fármacos anti-VEGF para el tratamiento de la RD más explorados en la actualidad se encuentra el ranibizumab (fragmentos Fab de un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado anti-VEGF conocido comercialmente como Lucentis) y el bevacizumab (un anticuerpo monoclonal humanizado anti-VEGF cuyo nombre comercial es Avastin) (Fig. 3). El ranibizumab se produce utilizando como sistema de expresión a la bacteria *Escherichia Coli* y está diseñado para su uso intraocular, su peso molecular es de aproximadamente 48 kD. Por su parte, el bevacizumab se produce en la línea celular ovárica de hámster chino, pesa 149 kD y se diseñó para ser administrado por vía sistémica para el tratamiento de pacientes con cáncer, si bien su uso se ha extendido a personas con RD. Ambos anticuerpos se unen e 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), cambiando únicamente 6 aminoácidos en la región de unión al ligando (Steinbrook 2006).

Los dos anticuerpos han mostrado resultados prometedores en modelos animales de RD, pero su empleo en humanos todavía se encuentra en fase de pruebas clínicas (Cheema et al. 2009; Elman et al. 2010). En estos estudios, se reconoce que tanto el ranibizumab como el bevacizumab tienen una eficacia temporal limitada (que varía entre 2-6 semanas) que hace inevitable repetir su dosis; esto implica exponer al paciente a inyecciones intravitreales frecuentes y de por vida lo que aumenta los riesgos de alguna complicación ocular grave (endofalmitis, desprendimiento de la retina o daño al cristalino) (Bhavsar et al. 2009; Sniegowski et al. 2010).

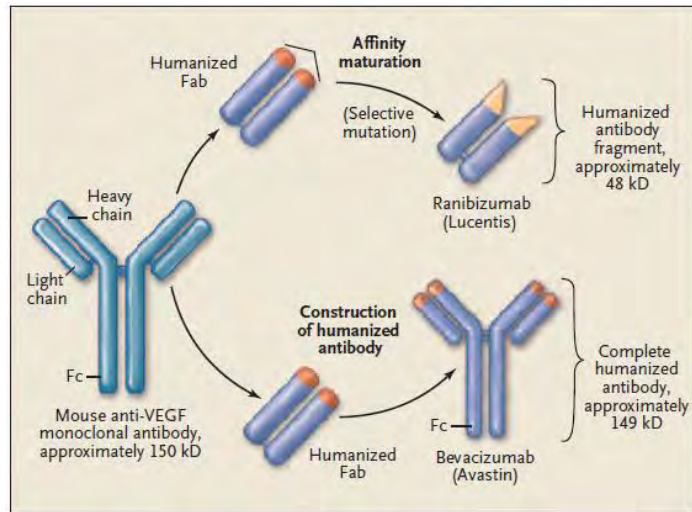


Figura 3.- Estructura de 2 diferentes anticuerpos anti-VEGF, Ranibizumab y Bevacizumab Tomado de (Steinbrook 2006).

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 (Ishida et al. 1999; Mori et al. 2001; Mori et al. 2002) a los inhibidores de metaloproteinasas 3, y a los péptidos como la endostatina, la angiostatina, y las vasoinhibinas (Meneses et al. 2001; Mori et al. 2002; Ramirez et al. 2011). 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.

II.4 VECTORES VIRALES

Los vectores más comúnmente utilizados para la transferencia génica se han desarrollado a partir de retrovirus, lentivirus, adenovirus y virus adenoasociados (AAV)(Walther and Stein 2000). La razón de esto, es que los virus tienen de manera natural la capacidad de transferir eficientemente sus genes en las células huésped, una capacidad que los hace deseables en términos de ingeniería de vectores. De estos, los AAV recombinantes (rAAV) poseen varias características que resultan ideales para la terapia génica ocular y que incluyen la

transducción del transgen por períodos largos de tiempo (años) y una muy reducida respuesta inmunológica (Di Polo et al. 1998; Dudus et al. 1999; Guy et al. 1999).

En la tabla 2 (Singh and Tripathi 2002) se resumen algunas de las ventajas y desventajas de los diferentes tipos de virus que se usan actualmente en la terapia génica.

Tabla 2.- Características de diferentes vectores génicos

VECTOR	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Adenovirus	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
Retrovirus	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.
Lentivirus	Transfección de células proliferantes y no proliferantes.	Límite a inserto de 8 kb Poca experiencia clínica Peligro de mutagénesis insercional
AAV	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

Los virus adenoasociados (AAV) pertenecen a la familia Parvoviridae, y fueron identificados como contaminantes en preparaciones de adenovirus hace casi un siglo (Henckaerts and Linden 2010). Son virus de DNA de cadena sencilla, cuya forma silvestre contiene 2 genes, rep y cap, que codifican para polipéptidos esenciales para la replicación y para la encapsidación, respectivamente. Estos genes están flanqueados por secuencias terminales invertidas repetidas (ITR), que en el caso de los AAV recombinantes (rAAV), son las únicas secuencias del genoma viral que se conservan (Walther and Stein 2000) y los genes rep y cap son substituidos por el transgén de interés (Fig. 4).

Los rAAV pueden clasificarse en más de 8 serotipos diferentes, que se refieren a la naturaleza de las proteínas de la cápside (Rutledge et al. 1998; Schultz and Chamberlain

2008) y, de los cuales, los serotipos 1 y 2 son los más comúnmente usados en la terapia génica. Se ha reportado que cada serotipo de rAAV muestra una eficiencia de transducción diferente según el tejido. Por ejemplo, en el músculo estriado se alcanzan niveles altos de transducción con los AAV1, AAV6 y AAV7; en el sistema pulmonar, los AAV6 y AAV9 transducen el epitelio pulmonar, mientras que el serotipo AAV5 se limita a transducir células alveolares pulmonares. En cuanto al sistema nervioso, los serotipos que han mostrado una transducción eficiente son los 1, 4, 5, 7 y 8 (Schultz and Chamberlain 2008).

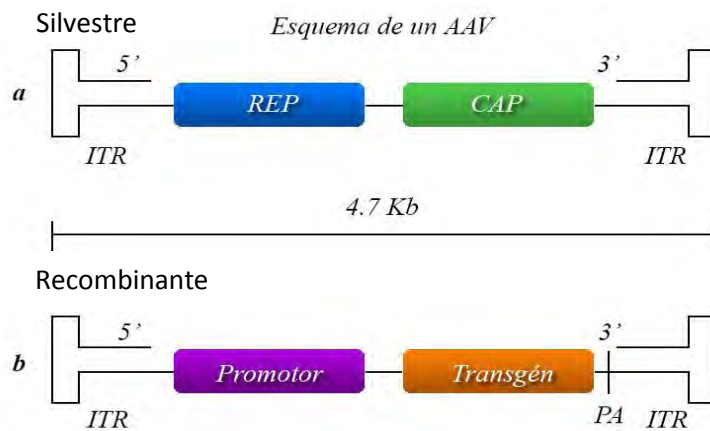


Figura 4.-Esquema que ilustra la estructura básica del genoma de AAV silvestres (a) y recombinantes (b) Modificado de (Sandoval Rodriguez et al. 2005). ITR: terminales invertidas repetidas.

En la retina se han empleado predominantemente AAV2 y la localización celular de su transducción depende de la vía de su administración. Por ejemplo, la inyección subretiniana de los AAV2 resulta en la transducción de células del epitelio pigmentario retiniano y fotorreceptores, mientras que su inyección intravitreal se asocia con la transducción de células ganglionares y de células de Müller (Martin et al. 2002). A continuación se describe la histología de la retina y algunas características funcionales de sus principales tipos celulares.

II.5 HISTOLOGÍA DE LA RETINA

La retina es una capa de tejido neural de ~0.2 mm de espesor en el humano, localizada en la cara interna de la copa óptica y que recubre las tres cuartas partes posteriores del globo ocular (Fig. 5).

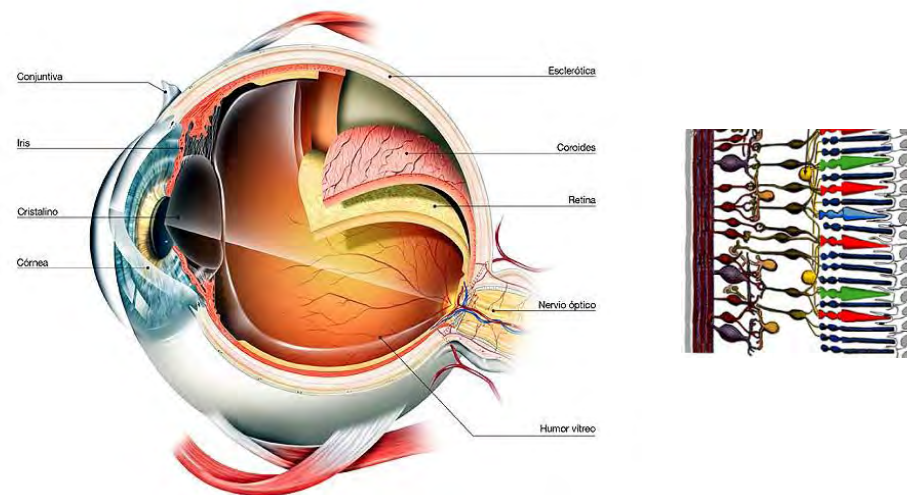


Figura 5.-Esquema de la sección de un ojo humano mostrando un acercamiento de la retina Modificado de (Kolb 1995).

Al describir las capas y células de la retina, es común usar los términos de “interna” y “externa”. Interna se refiere a las estructuras localizadas más cercanas al cuerpo vítreo, mientras que externa hace referencia a las estructuras que están cerca del epitelio pigmentario y de la coroides.

La retina tiene 10 capas características (Fig. 6) que a partir de la retina externa incluyen a: la capa del epitelio pigmentario, la capa de los fotorreceptores (segmentos externos de conos y bastones), la membrana limitante externa, la capa nuclear externa, la capa plexiforme externa, la capa nuclear interna, la capa plexiforme interna, la capa de células ganglionares, capa de fibras del fascículo óptico y la membrana limitante interna. La retina está constituida por cuatro tipos celulares: las neuronas (fotorreceptores, células bipolares, células ganglionares, células amacrinas y horizontales), las células gliales (astrocitos,

microglia y células de Müller), células endoteliales y células del epitelio pigmentario. (Haines 2006).

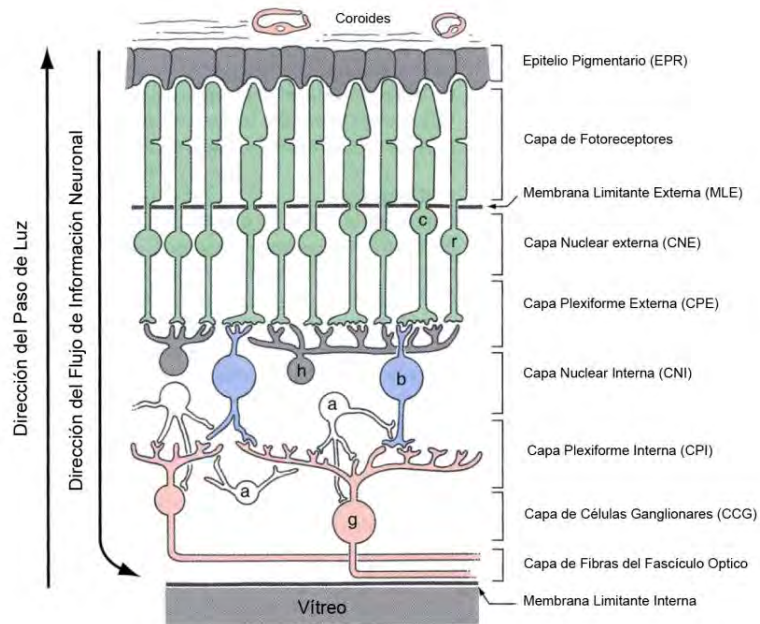


Figura 6.- Organización celular de la retina. Fotorreceptores (conos [c], y bastones [r]) se muestran en verde. Células Horizontales, (h) en color gris; células bipolares, (b) en azul; reciben la información de los fotorreceptores y hacen contacto con las células amacrinas, (a) en blanco, y células ganglionares, (g) en rosa (Modificado de Haines 2006). Los números a la derecha indican las distintas capas en las que se organizan las células de la retina y sus proyecciones.

La capa más externa de la retina es el epitelio pigmentario, el cual está compuesto por una capa continua de células cuboidales que contienen melanina, la cual absorbe el exceso de luz no absorbida por los fotorreceptores. El epitelio pigmentario es crucial para el buen funcionamiento y mantenimiento de los fotorreceptores (Sung and Chuang 2010). Los fotorreceptores son neuronas con estructura y función muy especializadas. Existen dos tipos, los conos y los bastones. Cada fotorreceptor está dividido en un segmento externo y un segmento interno que incluye una región nuclear y la zona sináptica. Los segmentos externos son cilios modificados y están constituidos por pilas de sáculos aplanados o discos separados de la membrana plasmática que contienen el pigmento fotosensible que

reacciona al estímulo luminoso, e inician los potenciales de acción en la vía visual. En los segmentos internos abundan las mitocondrias. Los bastones se denominan así por el aspecto de barras delgadas de sus segmentos externos. Los conos generalmente tienen segmentos internos gruesos y segmentos externos cónicos y, aunque su morfología varía según el sitio en la retina, están mayormente concentrados en el centro de la retina y operan dentro de un rango de intensidad luminosa de entre 10^{-1} y 10^5 lux, mediando la visión fotópica que es rica en color y caracterizada por alta resolución temporal y espacial. Los bastones, en contraste, están presentes a lo largo de toda la retina excepto en la región central conocida como la fovea, y proveen una visión escotópica sobre los 10^{-2} lux, carente de información colorida (Levine and Fuhrmann 2008). Además de los fotorreceptores existen por lo menos otros cuatro tipos generales de neuronas en la retina: las células horizontales, las células bipolares, las células ganglionares y las células amácrinas.

Las células horizontales están compuestas por un cuerpo celular, dendritas asociadas y un axón que corre paralelamente al plano de la retina haciendo contacto con fotorreceptores cercanos y lejanos (Fig. 6). Estas células reciben información glutamatérgica de los fotorreceptores y a su vez hacen contactos sinápticos GABAérgicos con estas células (conos y bastones). Este tipo de arreglo permite a las células horizontales modular los límites de los campos receptivos visuales al inhibir las células fotorreceptoras cercanas (Masland 2001).

Las células bipolares, se encuentran posicionadas entre los fotorreceptores y las células ganglionares. Junto con las células horizontales, participan en comparar la actividad de cada región del campo visual con la de una región adyacente. En función de su activación, existen 2 tipos básicos de células bipolares. Las células “On”, o células despolarizantes, que responden ante el estímulo luminoso despolarizándose, y las células “Off” llamadas también hiperpolarizantes ya que frente a un estímulo luminoso responden de esta manera (Haines 2006).

Las células amácrinas tienen un soma pequeño, sin un axón bien definido, y presentan pocas dendritas pero altamente arborizadas. Sus cuerpos celulares se encuentran

generalmente en la capa nuclear interna pero se pueden observar también algunas de ellas en la capa de células ganglionares. Estas células contienen GABA y acetilcolina o glicina y neuropéptidos. Así como en el caso de las células horizontales, las células amácrinas tienen también dendritas que se extienden por largas distancias y que modifican la salida de información de las células bipolares (Masland 2001). Las células ganglionares corresponden a la vía de salida de la información visual de la retina. Sus somas forman la capa de células ganglionares y sus axones convergen en el disco óptico. Se clasifican de acuerdo a su tamaño o a su función.

Las células ganglionares más grandes son las llamadas células α , predominan en la retina periférica y reciben información principalmente de los bastones. Tienen árboles dendríticos muy extensos y axones más delgados que el de otros tipos de células ganglionares. Fisiológicamente las células α corresponden a las células “Y” que participan muy poco en la percepción del color y muestran un patrón como el de las células bipolares (On y Off) con las que hacen sinapsis. Otro subtipo de células ganglionares son las β , que son de tamaño mediano y se encuentran de manera predominante en la retina central recibiendo información principalmente de los conos. Corresponde a la clase “X”, tienen pequeños árboles dendríticos así como también campos receptivos pequeños. Son muy responsivas a estímulos de color. Las células ganglionares que no entran en las categorías anteriores son clasificadas anatómicamente como células: γ , δ y ϵ se les conocen como células “W”. Este tipo de células tienden a tener cuerpos celulares y axones más pequeños y muestran una amplia variedad de tamaños de campo receptivos y respuestas fisiológicas (Haines 2006). Los axones de todas las células ganglionares convergen en el nervio óptico que ingresa al sistema nervioso central.

Los elementos neuronales de la retina están asociados además a células gliales llamadas células de Müller. Las prolongaciones de estas células forman una membrana limitante interna sobre la superficie interior de la retina, y una membrana limitante externa en la capa de los fotorreceptores.

El nervio óptico abandona el ojo y los vasos sanguíneos entran a él en un punto situado ligeramente por encima del polo posterior del globo ocular. Los vasos retinianos irrigan directamente a las células bipolares y ganglionares, pero los fotorreceptores son nutridos por difusión a partir del plexo capilar de la coroides (Linsenmeier and Padnick-Silver 2000). En el ojo, existe un control estricto de la vascularización que determina la transparencia de las diversas estructuras (cornea, cristalino, vítreo, y retina externa). En este control participan factores antiangiogénicos entre los que se encuentran las vasoinhibinas.

III.-ANTECEDENTES INMEDIATOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Nuestro laboratorio ha mostrado que las vasoinhibinas, una familia de péptidos derivados de la proteólisis de la hormona prolactina, inhiben la vasopermeabilidad, la vasodilatación y la angiogénesis ocular (Clapp et al. 2008). De hecho, estos péptidos inhiben el efecto vasoproliferativo y vasodilatador del VEGF y de otras sustancias vasoactivas y lo hacen al bloquear su acción sobre la activación de la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS) y la subsecuente producción de NO endotelial (Garcia et al. 2008; Gonzalez et al. 2004). De interés para este proyecto, recientemente se encontró que la inyección intravitreal de AAV2 que transducen a las vasoinhibinas (AAV2-Vi) previene el aumento en la vasopermeabilidad retiniana que tiene lugar en ratas diabéticas (Ramirez et al. 2011). En este estudio, los AAV2-Vi se inyectaron un mes antes de inducir la diabetes experimental (con estreptozotocina), pero no se determinó si los AAV2-Vi son capaces de interferir con las alteraciones vasculares de la retina una vez instaurada la diabetes.

La valoración de las propiedades curativas de los vectores AAV2 en animales diabéticos es de gran importancia ya que apoyaría su utilidad clínica para el tratamiento de la RD. Sin embargo, es de llamar la atención la ausencia de reportes donde los AAV2 son administrados una vez instaurada la diabetes. Con el propósito de investigar el valor curativo de los AAV2 administrados una vez que se han generado las alteraciones vasculares debidas a la diabetes, en este trabajo de tesis propusimos corroborar la localización de transducción de AAV2 inyectados intravitrealmente en la capa de células ganglionares de la retina e investigar si dicha transducción varía en la retina de ratas

diabéticas versus la de las no diabéticas. La posibilidad de que la transducción de los AAV2 se altere en la diabetes no es inesperada. Se conoce que los AAV2 utilizan proteoglicanos de heparán sulfato como receptores membranales para su incorporación en las células blanco (Summerford and Samulski 1998), que las neuronas ganglionares y las células de Müller localizadas en la capa de la retina contigua al vítreo expresan esos receptores (Chai and Morris 1994) y que los niveles de expresión de algunos glicoconjugados de heparán sulfato puede incrementarse en la retina durante la diabetes (Fisher et al. 1994; Matsunaga et al. 2005). Adicionalmente, los AAV2 utilizan como correceptor a las integrinas $\alpha_v\beta_5$ (Schultz and Chamberlain 2008) y de manera interesante solo se ha detectado la expresión de esas integrinas en retinas de personas que sufren RDP (Friedlander et al. 1996).

Cabe mencionar que los proteoglicanos son moléculas presentes en la gran mayoría de las membranas celulares y son componentes principales de la matriz extracelular donde regulan procesos fisiológicos y patológicos celulares (proliferación, adhesión, endocitosis, etc). Los proteoglicanos se componen de una proteína central y una o más cadenas de moléculas de glucosaminoglicanos (GAG) (Dreyfuss et al. 2009). Dependiendo del tipo de cadenas de GAG que tengan unidas las proteínas centrales, los proteoglicanos se clasifican en cuatro familias; heparán sulfato, condroitin sulfato, dermatán sulfato y queratán sulfato. En el caso de los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) están compuestos por GAG del tipo glucosamina y ácido idurónico unidos por enlaces glucosídicos, y las proteínas centrales a las cuales están unidos pueden ser proteínas de superficie celular (sindecano, glipicano, betaglicano CD44) y proteínas de matriz extracelular (perlecano, agrina, colágeno tipo XVIII y testicano). Entre los proteoglicanos de heparán sulfato que funcionan como receptores de los AAV2 se incluyen el glipicano, el sindecano y el perlecano.

IV.- JUSTIFICACIÓN

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 rAAV. Este estudio pretende caracterizar el uso de esos vectores en la RD a través de localizar la expresión del transgen codificado por rAAV2 en la retina después de su administración intravitreal y si su nivel de expresión aumenta en la diabetes experimental.

V.- HIPÓTESIS

La inyección intravitreal de rAAV2 transduce a células ganglionares de la retina y esta transducción se incrementa durante la diabetes.

VI.- OBJETIVOS

- Analizarla localización de la expresión en la retina de rAAV2 que codifican para la proteína verde fluorescente (GFP) subsecuente a su inyección intravitreal.
- Investigar si el nivel de transducción de los AAV2-GFP se altera en la diabetes experimental.

VII.-ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

VII.1 MATERIALES

VII.1.1 Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 250 a 300 gramos.

Para las inyecciones intravitreales, las ratas se anestesiaron con ketamina 70% y xilacina 30% (1µl/g de peso corporal). El cuidado y tratamiento de los animales se sujetó a las normas establecidas por la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) y los protocolos experimentales fueron autorizados por el Comité de Ética del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

VI.2 METODOLOGÍA

VII.2.1 Modelo de diabetes inducida por estreptozotocina

La diabetes se indujo por una dosis única de estreptozotocina 60 mg/kg de peso corporal, como se ha descrito previamente (Garcia et al. 2008). Se consideraron diabéticos a los animales que tuvieron glucemias superiores a 250 mg/dl.

VII.2.2 Inyección intravitreal de AAV2-GFP

Los virus rAAV2-GFP (generados en colaboración con el Dr. Peter Colosi del National Eye Institute, NIH en Bethesda MD) se inyectaron intravitrealmente en las ratas control y en ratas diabéticas dos semanas después de haber sido inyectadas con estreptozotocina. Cada rata recibió un volumen final por ojo de 2 µl de rAAV2-GFP (2.8×10^{10} genomas virales). Cuatro semanas después de la inyección de los rAAV2-GFP, tiempo en que se considera se alcanza el nivel máximo de la expresión viral (Ferrari et al. 1996), las ratas se sacrificaron por decapitación, previa anestesia bajo una atmósfera saturada de CO₂. Las retinas fueron extraídas para evaluar la expresión de GFP mediante inmunohistoquímica, visualización directa de la fluorescencia en montajes planos de retina y RT-PCR en tiempo real.

VII.2.3 Inmunohistoquímica

Las retinas obtenidas (adheridas aún a la copa óptica) se lavaron con una solución amortiguadora de fosfato salina (PBS), se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 25 minutos a temperatura ambiente y se dejaron toda la noche a 4°C en una solución crioprotectora de sacarosa al 30%. Posteriormente, las retinas se retiraron de la solución de sacarosa al 30%, se incluyeron en Tissue Teck (Leica Instruments, Heidelberg, Germany) y se congelaron a -20°C. Secciones de 8 µm obtenidas en el criostato fueron montadas en portaobjetos (Superfrost/Plus; A. Daigger & Co., Vernon Hills, IL) y se dejaron a 37°C durante una noche. Subsecuentemente, las secciones se lavaron por 10 minutos con PBST (PBS-Tween 20 0.1%), con el propósito de retirar el excedente de Tissue Teck, se secaron y se incubaron durante una hora y media (a temperatura ambiente) con una solución bloqueadora (PBS-Tritón 0.1%-BSA 1%-suero de cabra al 1%). Pasado este tiempo se eliminó el exceso de solución bloqueadora de las laminillas y se les incubó con el anticuerpo primario anti-GFP (Abcam) durante toda la noche en una cámara húmeda a 4°C. Las laminillas se lavaron con PBS (tres lavados de 10 minutos y cuatro de 5 minutos), se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa 546 (Invitrogen) durante 2 horas a temperatura ambiente y se sometieron al mismo procedimiento de lavado. Las muestras se montaron en Vectashield (Vector Laboratories) y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Las imágenes se digitalizaron y evaluaron mediante un sistema analizador de imágenes (Image-Pro Plus 5.1, Media Cybernetics; Inc.) acoplado al microscopio.

VII.2.4 Montaje plano de retina

Los ojos se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4%, preparada en fresco, se dejaron a temperatura ambiente por 15 minutos y se lavaron con PBS. Posteriormente, se retiró el PBS y, mediante un microscopio estereoscópico, se realizó una incisión a nivel del limbo para disociar el segmento anterior del ojo (cornea, procesos ciliares) del segmento posterior (retina neural, epitelio pigmentario, coroides, esclera). El cristalino también se removió procurando no perturbar la retina. El epitelio pigmentario, la coroides, la esclera y la retina neural se aplanan 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 separa cuidadosamente del complejo epitelio pigmentario-coroides-esclera.

VII.2.5 Extracción del mRNA

Para extraer el RNA y cuantificar la expresión de GFP en las retinas de las ratas inyectadas intravitrealmente con AAV2-GFP (controles y diabéticas), se utilizó Trizol® (Invitrogen) y se siguió el protocolo proporcionado por el proveedor. Brevemente, el homogenado de cada retina se procesó por separado utilizando 100µl de Trizol. Los extractos se agitaron vigorosamente por 15 segundos, se les agregó 50 µl de cloroformo por retina y se les 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 por muestra de isopropanol al 100% , se le 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, y finalmente de manera muy cuidadosa se retiró el sobrenadante. El precipitado se suspendió en 30 µl de agua libre de RNAsas y se midió la concentración de RNA espectrofotométricamente.

VII.2.6 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 (Superscript III RT®, Invitrogen, Carlsbad, California). Para este propósito, la mezcla de reacción contiene 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.

VII.2.7 PCR en tiempo real

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 SYBR Green que es capaz de intercalarse en la doble cadena del DNA, y ser excitado a 530 nm. El DNA amplificado se cuantifica en un aparato de PCR cuantitativo (Biorad, Hércules, California) para conocer los niveles 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 contiene 65 µl de solución amortiguadora, 0.65 µl de “primers” sentido y antisentido para los oligonucleótidos utilizados (Tabla 3), y 65 µl de cDNA. El aparato se programó de acuerdo a la temperatura específica para los “primers” y la fluorescencia se detectó a 530 nm. El nivel de expresión se normalizó a la expresión del gen constitutivo hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HPRT)

TABLA 3.- SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Gen		Secuencia
<i>GFP</i>	sentido	5´ -CAA GCT GAC CCT GAA GTT CA -3´
	antisentido	5´ - AAG TCG TGC TGC TTC ATG TG -3´
<i>Actina</i>	sentido	5´ - CCATCATGAAGTGTGACGTTG-3´
	antisentido	5´ - ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA -3´
<i>HPRT</i>	sentido	5´ -GAC CGG TTC TGT CAT GTC G-3´
	antisentido	5´ -ACC TGG TTC ATC ATC ACT AAT CAC-3´
<i>Glipicano</i>	sentido	5´ -CAG GGG CTT GGG GAT GCT AA-3´
	antisentido	5´ -AGT GCC CCT GCC TGA GTG TC-3´
<i>Sindecano</i>	sentido	5´ -GGG CAG CAA CAT CTT TGA GAG-3´
	antisentido	5´ -TCC TTC TTC ATA CGC TAC-3´
<i>Perlecano</i>	sentido	5´ -CTG CCA CGT GAC AGT CGC-3´
	antisentido	5´ -GCT CTG GCA CCT GCA G-3´

VII.2.8 Análisis Estadístico.

Los datos corresponden a la media \pm error estándar de al menos 3 determinaciones independientes. Las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo diabético se calcularon con la prueba t de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para valores de $p < 0.05$.

VIII.- RESULTADOS

VIII.1 LOCALIZACIÓN DE LA TRANSDUCCIÓN DEL AAV2-GFP EN LA CAPA DE CELULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.

El estudio se inició intentando detectar a la GFP por su propia fluorescencia en secciones de retinas fijadas de ratas inyectadas con AAV2-GFP y procesadas por el método convencional, es decir criosecciones de retina que después de ser obtenidas se observaron por fluorescencia directa. Después de varias repeticiones en las que la fluorescencia nunca fue observada, se optó por revelar la presencia de la GFP utilizando inmunohistoquímica. Este método permitió detectar la presencia de células inmunorreactivas para GFP exclusivamente en la capa de células ganglionares de la retina (Fig. 7B). No se observó señal positiva en los ojos de ratas control inyectados con el vehículo del vector (Fig. 7A). Estos resultados fueron parte de un artículo publicado (Ramirez et al. 2011).

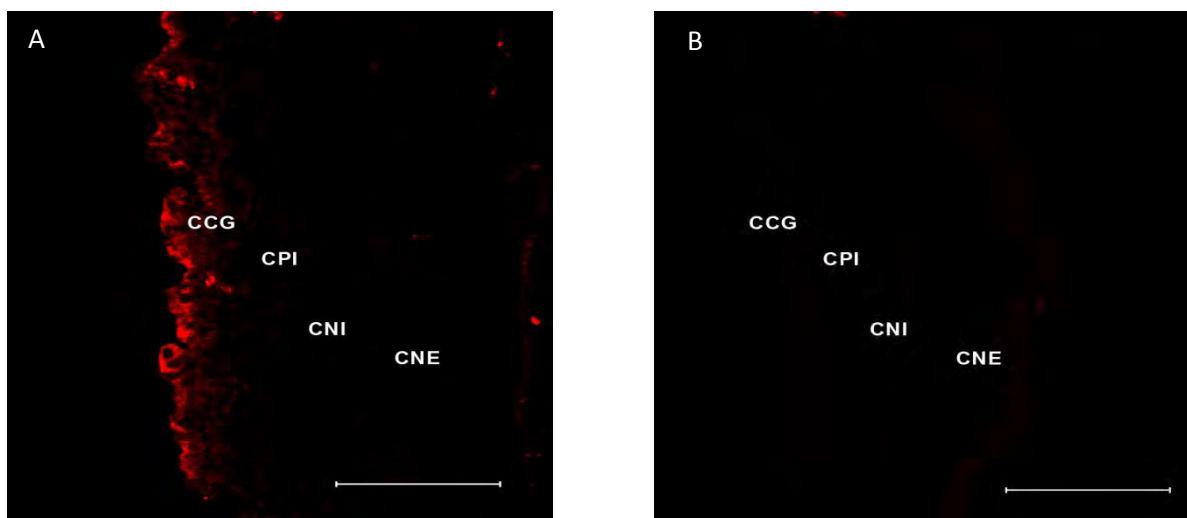


Fig. 7. Localización inmunohistoquímica de la GFP en la capa de las células ganglionares de la retina. Sección representativa de la retina de rata obtenida un mes después de la inyección intravitreal del AAV2-GFP (A) observada en el microscopio confocal. (B) Corte representativo similar a (A) donde se omitió la adición del anticuerpo primario anti-GFP. CCG, capa de células ganglionares; CPI, capa plexiforme interna; CNI, capa nuclear interna; CNE, capa nuclear externa. La barra de calibración corresponde a 50 μm .

VIII.2 LA TRANSDUCCIÓN DEL AAV2-GFP EN LA RETINA AUMENTA EN LA DIABETES

VIII.2.1 EVALUACIÓN DE LA FLUORESCENCIA DE GFP EN MONTAJES PLANOS DE RETINA

Si bien la inmunohistoquímica permitió la detección de la transducción de la GFP codificada en los AAV2, decidimos implementar la técnica de montajes planos de retina para evaluar la fluorescencia directa de dicha proteína. Este método permite visualizar toda la retina al mismo tiempo, facilitando la detección de la expresión del transgén y la valoración de posibles diferencias entre una retina de un animal sano y la de un animal diabético. La figura 8(A-C) muestra imágenes por microscopio confocal de la zona del nervio óptico de la retina de tres ratas sanas (controles) inyectadas intravitrealmente con AAV2-GFP y evaluadas 4 semanas después. Se observan células y proyecciones fluorescentes (que contienen GFP), que por su ubicación (superficie de la retina que colinda con el vítreo y a una profundidad de 30 micras, que representa el grosor de la capa ganglionar) corresponden a células en la capa de células ganglionares de la retina. Se encontraron células fluorescentes a todo lo largo de dicha capa, si bien frecuentemente su mayor acumulación se observó cercana a la zona del nervio óptico. Por esta razón todas las imágenes analizadas se tomaron de esa zona y a la misma magnificación. Cuando se evaluaron retinas de ratas diabéticas (Figura 8 E-F) fue muy evidente la mayor expresión de la GFP. 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 abundancia de axones fluorescentes en camino a constituir el nervio óptico (Figura 8F).

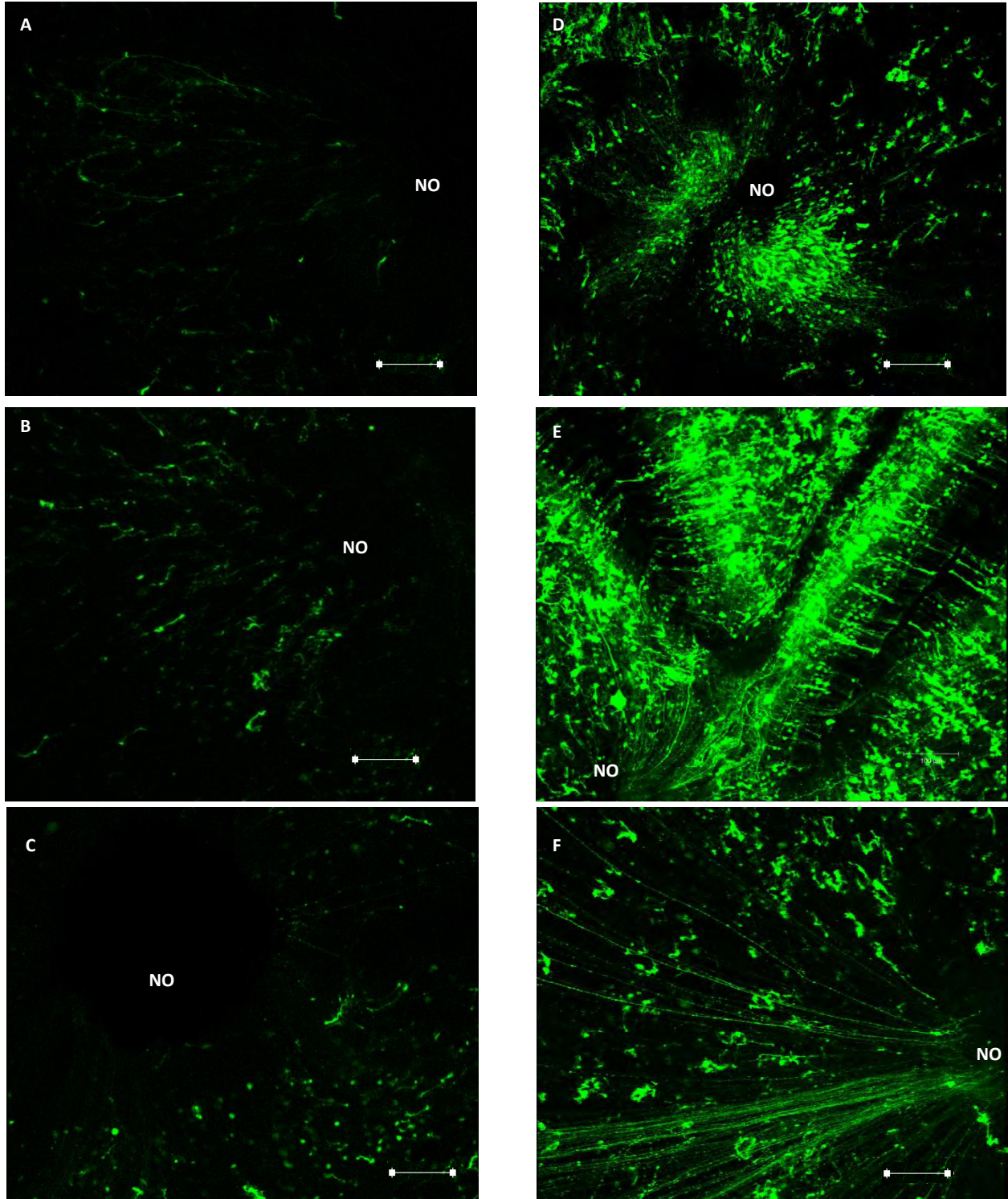


Figura 8.- La transducción del AAV2-GFP en la retina es mayor en la diabetes. Micrografías representativas que muestran células y proyecciones fluorescentes que expresan GFP en la zona del nervio óptico (NO) en montajes planos de retina obtenidos de ratas controlas (A, B,C) y diabéticas (D,E,F). Las ratas fueron o no tratadas con estreptozotocina para inducir diabetes y al cabo de dos semanas todas las ratas (diabéticas y controlas) fueron inyectadas intravitrealmente con AAV2-GFP. Un

mes después las retinas fueron procesadas y analizadas a través de fluorescencia directa y microscopia confocal. Barra de calibración = 100 μ m.

El nivel de expresión de la GFP se evaluó al cuantificar la intensidad de fluorescencia por unidad de área en imágenes reconstruidas a partir de 13-15 cortes ópticos del mismo grosor tomados en una misma área de la retina. Las zonas capturadas tomaron siempre como referencia el nervio óptico. La mayor expresión de la GFP fue estadísticamente significativa cuando se compararon los valores de intensidad de fluorescencia de 12 retinas de ratas diabéticas vs 9 retinas de ratas controles (Figura 9).

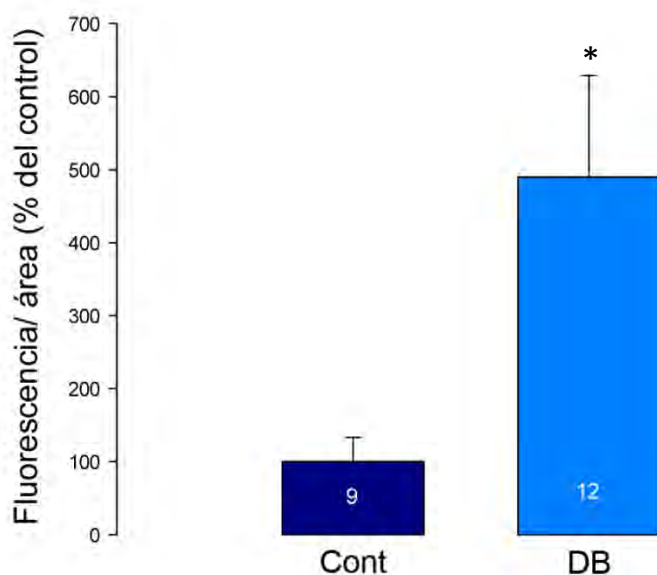


Figura 9.- La transducción del AAV2-GFP en la retina es mayor en la diabetes. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia por unidad de área de retinas provenientes de ratas controles (Cont., n=9) y de ratas diabéticas (DB, n=12) inyectadas intravitrealmente con AAV2-GFP. Los resultados son promedios \pm E.E. * $p < 0.05$ vs Cont.

VIII.2.2 CUANTIFICACIÓN DEL mRNA DE LA GFP POR RT-PCR EN TIEMPO REAL

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos por histoquímica, se analizó el nivel de expresión de la GFP por RT-PCR en tiempo real en extractos de retinas de ratas controles y diabéticas todas ellas inyectadas con el AAV2-GFP. Comenzamos por investigar y evaluar un gen que no se modificara en condiciones de diabetes en la retina con el propósito de utilizarlo como control de expresión constitutiva. Inicialmente analizamos a la actina, sin embargo, observamos un aumento en su expresión en las retinas de ratas diabéticas con respecto a las ratas controles por este motivo no era posible usarlo como control de expresión constitutiva. Así, a continuación examinamos la expresión de HPRT (hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa), enzima involucrada en el metabolismo de las purinas y que también se ha utilizado como control de expresión constitutiva en la retina en condiciones de diabetes (Ly et al. 2011) . En la figura 10 podemos observar que no existe un cambio en la expresión de expresión del RNA mensajero para la hprt entre las retinas de ratas controles y diabéticas inyectadas con AAV2-GFP. Por este motivo, en las siguientes amplificaciones se utilizó el HPRT como gen constitutivo a partir del cual se normalizaron las muestras problema.

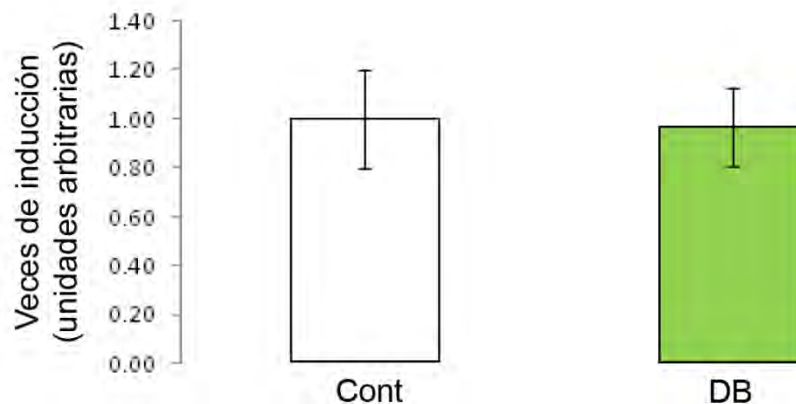


Figura 10.- Análisis de la expresión génica del RNA mensajero para la HPRT por RT-PCR en tiempo real. En barras se muestra la media \pm E.E. de la expresión de HPRT de ratas control (Cont., n=11) y de ratas diabéticas (DB, n=12) inyectadas con los AAV-2 GFP.

Procedimos entonces a analizar la expresión relativa de la GFP en las retinas de ratas diabéticas y de ratas controles inyectadas intravitrealmente con los AAV2-GFP. Tuvimos una gran variabilidad en la expresión de GFP en las muestras del grupo de ratas diabéticas de modo que al compararlo con el grupo control no obtuvimos diferencias significativas (Figura 11). Es posible que esto se deba a que nuestros oligonucleótidos para GFP no estuvieran funcionando adecuadamente, no obstante, probamos dos distintos pares de oligonucleótidos y obtuvimos resultados similares. También pudiera ser posible, que el RNA mensajero de la GFP posea una estabilidad menor a la de la proteína (Sacchetti et al. 2001).

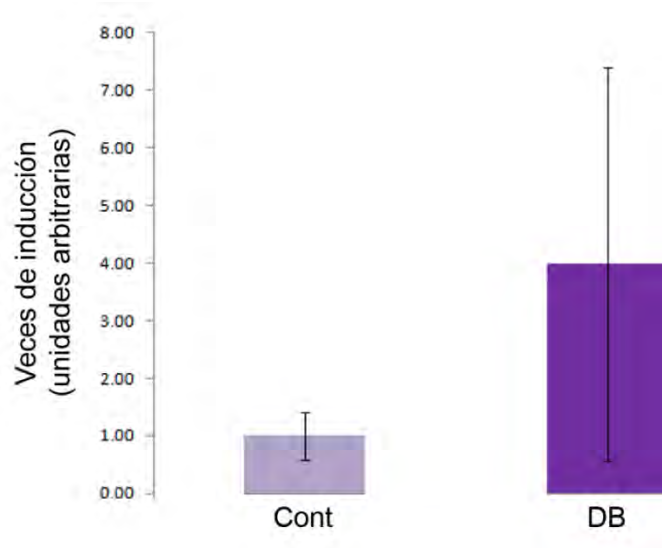


Figura 11.- Análisis de la expresión relativa de GFP en retina de ratas controles (Cont, n=11) y diabéticas (DB, n=12) por RT-PCR en tiempo real utilizando como gen constitutivo HPRT.

VIII.2.3 LA EXPRESIÓN DE GLIPICANO Y SINDECANO, RECEPTORES DE AAV2, AUMENTA EN CONDICIONES DE DIABETES.

De manera paralela al análisis de la expresión de la GFP, se evaluó por RT-PCR en tiempo real la expresión de los transcritos que codifican para el componente proteico de los proteoglicanos de heparán sulfato; glipicano, sindecano y perlecano, conocidos receptores para los AAV2. Este análisis se realizó con el propósito de investigar si la mayor capacidad

de los virus de transducir la retina de ratas diabéticas pudiera deberse a una mayor expresión de sus receptores por la diabetes. Así, se evaluó la expresión de proteoglicanos de heparán sulfato de membrana celular (sindecano y glipicano), y en la matriz extracelular (perlecano) que se expresan en la retina (Inatani and Tanihara 2002; Tanihara et al. 2002). La figura 12 muestra la expresión relativa de sindecano, glipicano y perlecano en retinas de ratas controles y diabéticas inyectadas intravítreamente con los AAV2-GFP. El RNA mensajero de los componentes proteicos del glipicano y del sindecano aumentó significativamente en las retinas diabéticas con respecto a las de las ratas no-diabéticas. El componente proteico del perlecano también aumentó en la retina de ratas diabéticas, pero este aumento no fue significativo.

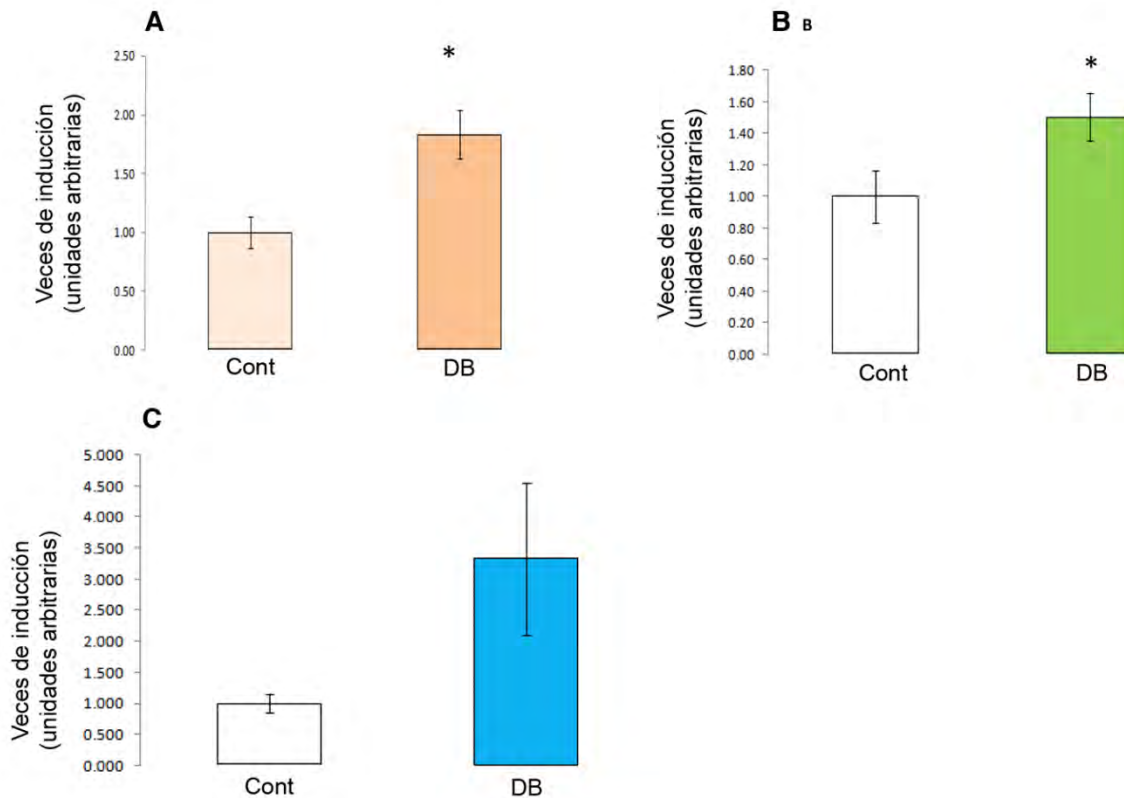


Figura 12.- Análisis de la expresión relativa de los transcritos de los componentes protéicos del glipicano (A) , sindecano (B) y perlecano (C) evaluada por RT-PCR en tiempo real, en retinas de ratas controles (Cont, n=9) y de ratas diabéticas (DB, n=11). Se utilizó como gen constitutivo el de la hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa. *p<0.05 vs. Control

IX.-DISCUSIÓN

La RD es la principal causa de ceguera en los adultos. Este padecimiento se caracteriza por alteraciones microvasculares en la retina que incluyen una vasopermeabilidad excesiva y la proliferación de los vasos sanguíneos (Frank 2004). El tratamiento por elección es la fotocoagulación con láser en zonas localizadas de la retina, pero este tratamiento es destructivo y compromete la funcionalidad de la retina, además de que solo es efectivo en el 50% los pacientes (The Diabetic Retinopathy Study Research Group (1976)). La farmacoterapia basada en el uso de factores antiangiogénicos ha generado resultados positivos en pruebas clínicas. Sin embargo, la efectividad de su uso tampoco cubre a todos los pacientes y requiere de inyecciones oculares repetidas lo que trae consigo riesgos colaterales serios (Lai et al. 2005; Mordenti et al. 1999; van Wijngaarden et al. 2005). Es claro entonces que en la actualidad no existe aún un tratamiento totalmente efectivo. En la última década, la terapia génica ha mostrado resultados prometedores en modelos animales de neovascularización retiniana (Auricchio et al. 2002; Mori et al. 2002) y, más recientemente, se ha utilizado en humanos contra enfermedades genéticas oculares (Simonelli et al. 2010). En este trabajo reportamos que la transferencia de genes por vectores recombinantes derivados de los AAV2 se favorece en la retina diabética y, por ende, que su uso es una opción terapéutica atractiva en la RD.

La retina es particularmente idónea para la terapia génica por varias razones, una de ellas es que es un órgano relativamente accesible para inyecciones directas; de tal manera que es posible hacer llegar de manera selectiva moléculas a las capas internas o externas de la retina a través de una ruta de administración intravitreal o subretinal, respectivamente. (Bainbridge et al. 2002). Además, la retina es un órgano inmunoprivilegiado, por tener una barrera hematorretiniana efectiva es un atributo deseable dado que reduce los riesgos de una respuesta inmune contra el vector o los transgenes, al tiempo que disminuye la posibilidad de que el vector difunda fuera del ojo y permite alcanzar efectos terapéuticos máximos con menores dosis de vector. Dentro de los vectores virales que más se han venido desarrollando se encuentran los AAV2, que tienen como ventajas la transducción

permanente de múltiples tipos celulares de la retina y una baja toxicidad (Stieger et al. 2011; Stieger et al. 2009; Surace and Auricchio 2008).

Dado el potencial terapéutico de los AAV2, en nuestro laboratorio se está explorando su uso para la transferencia ocular de las vasoinhibinas, una familia de proteínas con acciones reguladoras de la vascularización ocular (Clapp et al. 2008). Se ha mostrado que las vasoinhibinas están presentes en la retina de la rata y que su inmunoneutralización estimula la angiogénesis y la dilatación de vasos retinianos (Aranda et al. 2005). Además, se conoce que las vasoinhibinas disminuyen en la circulación de pacientes con RD (Triebel et al. 2009) y que la administración intravitreal de las vasoinhibinas puras (Garcia et al. 2008) o de AAV2 que las codifican (AAV2-Vi) previene la excesiva vascularización de la retina en ratas diabéticas (Ramirez et al. 2011). Con el fin último de desarrollar una terapia génica con AAV2-Vi, es necesario caracterizar el uso de los AAV2 en la RD. Este estudio se diseñó con un propósito doble: (a) verificar en nuestras manos la localización en la retina de la expresión de AAV2 inyectados intravitrealmente y (b) investigar si la transducción de los AAV2 pudiera verse alterada en la RD. Empleamos AAV2-GFP debido a que la naturaleza fluorescente de la GFP y su ausencia en mamíferos, la hace fácilmente valorable como producto exclusivo de la transferencia génica.

Los resultados nos permitieron corroborar que la inyección intravitreal de los AAV2 transduce elementos celulares localizados en la capa de células ganglionares de la retina. La expresión de la GFP se observó en somas y proyecciones celulares que incluyen a las proyecciones que confluyen para formar al nervio óptico y que, por ende, identificó a las propias células ganglionares entre las células transducidas. Esta localización, si bien ya conocida (Auricchio et al. 2001; Bainbridge et al. 2002; Mori et al. 2002) corroboró en nuestras manos la regionalización de la expresión de los vectores AAV2 y quedó consignada en un manuscrito publicado recientemente (Ramirez et al. 2011), donde se muestra el valor protector de los AAV2-Vi en contra de alteraciones vasculares en ratas diabéticas.

Adicionalmente, el presente trabajo mostró un mayor nivel de transducción de los AAV2-GFP en las retinas de las ratas diabéticas con respecto a las de las ratas no-diabéticas evaluada por cuantificación de la fluorescencia en montajes planos de retinas. Si bien esta diferencia fue aparente cuando se evaluó un número importante de retinas (n=11 y 9, para ratas diabéticas y no diabéticas, respectivamente), no pudo ser corroborada cuando se cuantificó la expresión del RNA mensajero de la GFP por RT-PCR en tiempo real, donde el incremento en la expresión en ratas diabéticas no fue significativo. Queda por determinar si la ausencia de diferencias puede asociarse a un problema metodológico (por ejemplo la eficiencia de los oligonucleótidos utilizados), o a algún otro factor. Al respecto, es posible que el RNA de la GFP en las ratas diabéticas fuera más inestable que la proteína misma o que este RNA estuviera siendo traducido a proteína a una tasa muy elevada. En relación a estas posibilidades, se ha reportado que algunas variantes de la GFP que han sido modificadas para tener una expresión altamente eficiente muestran altas tasas de traducción y bajos niveles de transcripción (Sacchetti et al. 2001). Experimentos en curso están investigando los niveles de la GFP en retinas transducidas de ratas diabéticas y sanas por Western blot.

Por otra parte, la mayor expresión de los AAV2 en la diabetes no es del todo inesperada. Existen evidencias de que los proteoglicanos de heparán sulfato se incrementan en las retinas de monos tratadas con VEGF (Witmer et al. 2001), en pericitos retinianos en cultivados bajo condiciones de alta glucosa (Fisher et al. 1994), y en la retina de pacientes con diabetes (Matsunaga et al. 2005).

Cabe mencionar que estos estudios tuvieron la finalidad de dilucidar el papel que los proteoglicanos de heparán sulfato podrían tener como reguladores celulares en la fisiopatología de la retinopatía diabética, ya que estas macromoléculas se expresan en múltiples superficies celulares así como en la matriz celular de una gran cantidad de tejidos y participan en la promoción de la angiogénesis y de la inflamación (Li and Spillmann 2012). A pesar de que se conoce que algunos proteoglicanos de heparán sulfato funcionan como receptores de los AAV2, hasta el momento no se ha evaluado la posibilidad de que su

aumento en la retina de animales diabéticos beneficie la incorporación celular de esos vectores y, por ende, su uso terapéutico.

En este estudio, encontramos por primera vez que la retina de ratas diabéticas presentan un incremento significativo en la expresión de los mensajeros de los componentes protéicos de dos proteoglicanos de heparán sulfato reconocidos como receptores convencionales de los AAV2, el, sindecano y glicano. En contraste otro de estos receptores, el perlecano, no mostró diferencias significativas. Estamos investigando si para este último, la ausencia de diferencias con la diabetes, pudiera ser artefactual debido a deficiencias en el ensayo (tipo de oligonucleotidos y condiciones utilizadas). Alternativamente, se podría especular que dado que por un lado el sindecano es una proteoglicano transmembranal y el sindecano se mantiene de manera anclada a la membrana celular por enlaces de glicosifosfatidilinositol (GPI) (Tumova et al. 2000), su participación en la incorporación de los AAV2 a la retina durante la diabetes pudiera ser de mayor impacto que la del perlecano que es un proteoglicano secretable pero que en ocasiones puede adherirse a la matriz extracelular (Fuki et al. 2000).

Otro factor que podría explicar el aumento en la expresión de la GFP en la retina de ratas diabéticas pudiera ser la integridad de la membrana limitante interna (MLI) de la retina. Algunos autores hacen referencia a que ésta es una de las barreras que tiene que superar un AAV para transducir regiones extensas de la retina (Dalkara et al. 2009). Se ha mostrado que en la retina en degeneración existe un adelgazamiento de la MLI y las partículas de AAV son capaces de difundir a sitios más profundos de la retina y transducir una mayor cantidad de células (Kolstad et al. 2010). Alteraciones histológicas similares parecen ocurrir en la retina de ratas diabéticas (Fischer and Gartner 1982; Nagata and Robison 1987) y pudieran contribuir a explicar la expresión diferencial de la GFP reportada en este estudio.

En resumen, los resultados de este estudio sugieren que las condiciones de la retina en la diabetes favorecen la transferencia génica de los vectores AAV2 a través, al menos en parte, de incrementar su incorporación celular vía la expresión de los receptores virales

glipicano y sindecano. Estas observaciones indican la importancia de reforzar estos estudios para seleccionar los vectores más adecuados para la terapia antiangiogénica ocular y podría tener repercusiones importantes por ejemplo a la hora de evaluar la dosis a utilizar en función del tiempo de diabetes, reduciendo los riesgos, efectos y complicaciones colaterales. Estudios en curso están validando los presentes resultados a través de evaluar la expresión de otros transgenes codificados por AAV2 para poder comprender mejor el uso y acciones de estos vectores una vez instaurada la diabetes.

X.- REFERENCIAS

1976. Preliminary report on effects of photocoagulation therapy. The Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Am J Ophthalmol* 81(4): 383-396.
1981. 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* 88(7): 583-600.
1988. 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* 95(10): 1307-1320.
1990. Persistent and recurrent neovascularization after krypton laser photocoagulation for neovascular lesions of age-related macular degeneration. Macular Photocoagulation Study Group. *Arch Ophthalmol* 108(6): 825-831.
1990. A randomized trial of sorbinil, an aldose reductase inhibitor, in diabetic retinopathy. Sorbinil Retinopathy Trial Research Group. *Arch Ophthalmol* 108(9): 1234-1244.
1991. Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology* 98(5 Suppl): 766-785.
1991. Laser photocoagulation of subfoveal neovascular lesions in age-related macular degeneration. Results of a randomized clinical trial. Macular Photocoagulation Study Group. *Arch Ophthalmol* 109(9): 1220-1231.
- Abordo, E. A., M. E. Westwood, et al. 1996. 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. *Immunol Lett* 53(1): 7-13.
- Adamis, A. P., D. T. Shima, et al. 1996. Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 114(1): 66-71.
- Adamis, A. P., D. T. Shima, et al. 1993. Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 193(2): 631-638.
- Aiello, L. P., J. M. Northrup, et al. 1995. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol* 113(12): 1538-1544.

- Aranda, J., J. C. Rivera, et al. 2005. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(8): 2947-2953.
- Auricchio, A., K. C. Behling, et al. 2002. Inhibition of retinal neovascularization by intraocular viral-mediated delivery of anti-angiogenic agents. *Mol Ther* 6(4): 490-494.
- Auricchio, A., G. Kobinger, et al. 2001. Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model. *Hum Mol Genet* 10(26): 3075-3081.
- Bainbridge, J. W., A. Mistry, et al. 2002. Inhibition of retinal neovascularisation by gene transfer of soluble VEGF receptor sFlt-1. *Gene Ther* 9(5): 320-326.
- Bainbridge, J. W., A. R. Mistry, et al. 2003. Gene therapy for ocular angiogenesis. *Clin Sci (Lond)* 104(6): 561-575.
- Bhavsar, A. R., J. M. Googe, Jr., et al. 2009. Risk of endophthalmitis after intravitreal drug injection when topical antibiotics are not required: the diabetic retinopathy clinical research network laser-ranibizumab-triamcinolone clinical trials. *Arch Ophthalmol* 127(12): 1581-1583.
- Bishara, N. B., M. E. Dunlop, et al. 2002. Matrix protein glycation impairs agonist-induced intracellular Ca²⁺ signaling in endothelial cells. *J Cell Physiol* 193(1): 80-92.
- Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414(6865): 813-820.
- Brownlee, M. 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54(6): 1615-1625.
- Ciulla, T. A., A. G. Amador, et al. 2003. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema: pathophysiology, screening, and novel therapies. *Diabetes Care* 26(9): 2653-2664.
- Clapp, C., S. Thebault, et al. 2008. Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(4): E772-778.
- Clark, S. J., T. D. Keenan, et al. 2011. Mapping the differential distribution of glycosaminoglycans in the adult human retina, choroid, and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(9): 6511-6521.
- Chai, L. and J. E. Morris 1994. Distribution of heparan sulfate proteoglycans in embryonic chicken neural retina and isolated inner limiting membrane. *Curr Eye Res* 13(9): 669-677.

- Charonis, A. S., L. A. Reger, et al. 1990. Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation. *Diabetes* 39(7): 807-814.
- Cheema, R. A., M. M. Al-Mubarak, et al. 2009. Role of combined cataract surgery and intravitreal bevacizumab injection in preventing progression of diabetic retinopathy: prospective randomized study. *J Cataract Refract Surg* 35(1): 18-25.
- Cheung, N., P. Mitchell, et al. 2010. Diabetic retinopathy. *Lancet* 376(9735): 124-136.
- Chew, E. Y., F. L. Ferris, 3rd, et al. 2003. The long-term effects of laser photocoagulation treatment in patients with diabetic retinopathy: the early treatment diabetic retinopathy follow-up study. *Ophthalmology* 110(9): 1683-1689.
- Dalkara, D., K. D. Kolstad, et al. 2009. Inner limiting membrane barriers to AAV-mediated retinal transduction from the vitreous. *Mol Ther* 17(12): 2096-2102.
- Davis MD, Blodi BA. Proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 1998; 21: 143-56.
- Derubertis, F. R. and P. A. Craven 1994. Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes* 43(1): 1-8.
- Di Polo, A., L. J. Aigner, et al. 1998. Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Muller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7): 3978-3983.
- Dreyfuss, J. L., C. V. Regatieri, et al. 2009. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *An Acad Bras Cienc* 81(3): 409-429.
- Dudus, L., V. Anand, et al. 1999. Persistent transgene product in retina, optic nerve and brain after intraocular injection of rAAV. *Vision Res* 39(15): 2545-2553.
- Elman, M. J., L. P. Aiello, et al. 2010. Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 117(6): 1064-1077 e1035.
- Engerman, R. L., T. S. Kern, et al. 1994. Nerve conduction and aldose reductase inhibition during 5 years of diabetes or galactosaemia in dogs. *Diabetologia* 37(2): 141-144.
- Ferrari, F. K., T. Samulski, et al. 1996. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 70(5): 3227-3234.
- Fischer, F. and J. Gartner 1982. Morphometric analysis of basal laminae in rats with long-term streptozotocin diabetes. I. Vitreoretinal juncture. *Exp Eye Res* 34(4): 595-600.

- Fisher, E. J., S. V. McLennan, et al. 1994. Cell-associated proteoglycans of retinal pericytes and endothelial cells: modulation by glucose and ascorbic acid. *Microvasc Res* 48(2): 179-189.
- Fong, D. S., L. Aiello, et al. 2004. Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care* 27 Suppl 1: S84-87.
- Frank, R. N. 2004. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 350(1): 48-58.
- Friedlander, M., C. L. Theesfeld, et al. 1996. Involvement of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18): 9764-9769.
- Fuki, I. V., R. V. Iozzo, et al. 2000. Perlecan heparan sulfate proteoglycan: a novel receptor that mediates a distinct pathway for ligand catabolism. *J Biol Chem* 275(33): 25742-25750.
- Garcia, C., J. Aranda, et al. 2008. Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest* 118(6): 2291-2300.
- Giardino, I., D. Edelstein, et al. 1994. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. *J Clin Invest* 94(1): 110-117.
- Gonzalez, C., A. M. Corbacho, et al. 2004. 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology* 145(12): 5714-5722.
- Guy, J., X. Qi, et al. 1999. Reporter expression persists 1 year after adeno-associated virus-mediated gene transfer to the optic nerve. *Arch Ophthalmol* 117(7): 929-937.
- Haines Duane E. *Fundamental Neuroscience for basic and clinical applications*. Elsevier.2006.
- Hammes, H. P., S. Martin, et al. 1991. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(24): 11555-11558.
- Heilig, C. W., L. A. Concepcion, et al. 1995. Overexpression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *J Clin Invest* 96(4): 1802-1814.
- Henckaerts, E. and R. M. Linden 2010. Adeno-associated virus: a key to the human genome? *Future Virol* 5(5): 555-574.

- Inatani, M. and H. Tanihara 2002. Proteoglycans in retina. *Prog Retin Eye Res* 21(5): 429-447.
- Ishida, K., N. Yoshimura, et al. 1999. Inhibitory effect of TNP-470 on experimental choroidal neovascularization in a rat model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(7): 1512-1519.
- Ishii, H., M. R. Jirousek, et al. 1996. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 272(5262): 728-731.
- Kaiser, N., S. Sasson, et al. 1993. Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes* 42(1): 80-89.
- Kaplan, H. 1996. Submacular surgery for choroidal neovascularisation. *Br J Ophthalmol* 80(2): 101.
- Kirstein, M., C. Aston, et al. 1992. Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J Clin Invest* 90(2): 439-446.
- Kolb, H. 1995. *Simple Anatomy of the Retina*.
- Kolstad, K. D., D. Dalkara, et al. 2010. Changes in adeno-associated virus-mediated gene delivery in retinal degeneration. *Hum Gene Ther* 21(5): 571-578.
- Kollias, A. N. and M. W. Ulbig 2010. Diabetic retinopathy: Early diagnosis and effective treatment. *Dtsch Arztebl Int* 107(5): 75-83; quiz 84.
- Koya, D., M. Haneda, et al. 2000. Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC beta inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes. *FASEB J* 14(3): 439-447.
- Koya, D., M. R. Jirousek, et al. 1997. Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest* 100(1): 115-126.
- Koya, D. and G. L. King 1998. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 47(6): 859-866.
- Lai, C. M., W. Y. Shen, et al. 2005. Long-term evaluation of AAV-mediated sFlt-1 gene therapy for ocular neovascularization in mice and monkeys. *Mol Ther* 12(4): 659-668.

- Levine, E. M. and S. Fuhrmann (2008). An Update on the Regulation of Rod Photoreceptor Development
- Visual Transduction and Non-Visual Light Perception. J. Tombran-Tink and C. J. Barnstable, Humana Press: 35-64.
- Li, J.-p. and D. Spillmann (2012). Heparan Sulfate Proteoglycans as Multifunctional Cell Regulators: Cell Surface Receptors Proteoglycans. F. R dini, Humana Press. **836**: 239-255.
- Linsenmeier, R. A. and L. Padnick-Silver 2000. Metabolic dependence of photoreceptors on the choroid in the normal and detached retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(10): 3117-3123.
- Ly, A., P. Yee, et al. 2011. Early inner retinal astrocyte dysfunction during diabetes and development of hypoxia, retinal stress, and neuronal functional loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(13): 9316-9326.
- Martin, K. R., R. L. Klein, et al. 2002. Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors. *Methods* 28(2): 267-275.
- Masland, R. H. 2001. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 4(9): 877-886.
- Matsunaga, N., H. Ozeki, et al. 2005. Histopathologic evaluation of the internal limiting membrane surgically excised from eyes with diabetic maculopathy. *Retina* 25(3): 311-316.
- McLellan, A. C., P. J. Thornalley, et al. 1994. Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin Sci (Lond)* 87(1): 21-29.
- Meneses, P. I., K. A. Hajjar, et al. 2001. Recombinant angiostatin prevents retinal neovascularization in a murine proliferative retinopathy model. *Gene Ther* 8(8): 646-648.
- Mingozi, F. and K. A. High 2011. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* 12(5): 341-355.
- Mizutani, M., T. S. Kern, et al. 1996. Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *J Clin Invest* 97(12): 2883-2890.
- Mordenti, J., R. A. Cuthbertson, et al. 1999. Comparisons of the intraocular tissue distribution, pharmacokinetics, and safety of 125I-labeled full-length and Fab antibodies in rhesus monkeys following intravitreal administration. *Toxicol Pathol* 27(5): 536-544.

- Mori, K., E. Duh, et al. 2001. Pigment epithelium-derived factor inhibits retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 188(2): 253-263.
- Mori, K., P. Gehlbach, et al. 2002. Regression of ocular neovascularization in response to increased expression of pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(7): 2428-2434.
- Mori, K., P. Gehlbach, et al. 2002. AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(6): 1994-2000.
- Nagata, M. and W. G. Robison, Jr. 1987. Aldose reductase, diabetes, and thickening of the retinal inner limiting membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28(11): 1867-1869.
- Nakamura, S., Z. Makita, et al. 1997. Progression of nephropathy in spontaneous diabetic rats is prevented by OPB-9195, a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetes* 46(5): 895-899.
- Ramirez, M., Z. Wu, et al. 2011. Vasoinhibin gene transfer by adenoassociated virus type 2 protects against VEGF- and diabetes-induced retinal vasopermeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(12): 8944-8950.
- Reich, S. J., J. Fosnot, et al. 2003. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis* 9: 210-216.
- Rutledge, E. A., C. L. Halbert, et al. 1998. Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. *J Virol* 72(1): 309-319.
- Sacchetti, A., T. El Sewedy, et al. 2001. Efficient GFP mutations profoundly affect mRNA transcription and translation rates. *FEBS Lett* 492(1-2): 151-155.
- Sandoval Rodriguez, A. S., A. M. Salazar Montes, et al. 2005. [Viral vectors in gene therapy. Advantages of the adenoassociated vectors]. *Rev Gastroenterol Mex* 70(2): 192-202.
- Schmidt, A. M., O. Hori, et al. 1995. 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. *J Clin Invest* 96(3): 1395-1403.
- Schultz, B. R. and J. S. Chamberlain 2008. Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Mol Ther* 16(7): 1189-1199.

- Shinohara, M., P. J. Thornalley, et al. 1998. Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *J Clin Invest* 101(5): 1142-1147.
- Shweiki, D., A. Itin, et al. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359(6398): 843-845.
- Simonelli, F., A. M. Maguire, et al. 2010. Gene Therapy for Leber's Congenital Amaurosis is Safe and Effective Through 1.5 Years After Vector Administration. *Mol Ther* 18(3): 643-650.
- Singh, V. K. and P. Tripathi 2002. Gene therapy in ocular diseases. *Indian J Ophthalmol* 50(3): 173-181.
- Smiddy, W. E. and H. W. Flynn, Jr. 1999. Vitrectomy in the management of diabetic retinopathy. *Surv Ophthalmol* 43(6): 491-507.
- Sniegowski, M., N. Mandava, et al. 2010. Sustained intraocular pressure elevation after intravitreal injection of bevacizumab and ranibizumab associated with trabeculitis. *Open Ophthalmol J* 4: 28-29.
- Soulis-Liparota, T., M. Cooper, et al. 1991. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes* 40(10): 1328-1334.
- Steinbrook, R. 2006. The price of sight--ranibizumab, bevacizumab, and the treatment of macular degeneration. *N Engl J Med* 355(14): 1409-1412.
- Stieger, K., T. Cronin, et al. 2011. Adeno-associated virus mediated gene therapy for retinal degenerative diseases. *Methods Mol Biol* 807: 179-218.
- Stieger, K., E. Lheriteau, et al. 2009. AAV-mediated gene therapy for retinal disorders in large animal models. *ILAR J* 50(2): 206-224.
- Summerford, C. and R. J. Samulski 1998. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 72(2): 1438-1445.
- Sung, C. H. and J. Z. Chuang 2010. The cell biology of vision. *J Cell Biol* 190(6): 953-963.
- Suomalainen, V. P. 1993. Comparison of retinal lesions produced by transscleral krypton laser photocoagulation, transpupillar krypton laser photocoagulation and cryocoagulation. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 71(2): 224-229.

- Surace, E. M. and A. Auricchio 2008. Versatility of AAV vectors for retinal gene transfer. *Vision Res* 48(3): 353-359.
- Tanihara, H., M. Inatani, et al. 2002. Proteoglycans in the eye. *Cornea* 21(7 Suppl): S62-69.
- Thomas, M. A., M. G. Grand, et al. 1992. Surgical management of subfoveal choroidal neovascularization. *Ophthalmology* 99(6): 952-968; discussion 975-956.
- Thornalley, P. J. 1990. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J* 269(1): 1-11.
- Triebel, J., M. Huefner, et al. 2009. Investigation of prolactin-related vasoinhibin in sera from patients with diabetic retinopathy. *Eur J Endocrinol* 161(2): 345-353.
- Tumova, S., A. Woods, et al. 2000. Heparan sulfate chains from glypican and syndecans bind the Hep II domain of fibronectin similarly despite minor structural differences. *J Biol Chem* 275(13): 9410-9417.
- van Wijngaarden, P., D. J. Coster, et al. 2005. Inhibitors of Ocular Neovascularization. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 293(12): 1509-1513.
- Walther, W. and U. Stein 2000. Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs* 60(2): 249-271.
- Wells-Knecht, K. J., D. V. Zyzak, et al. 1995. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* 34(11): 3702-3709.
- Witmer, A. N., J. van den Born, et al. 2001. 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* 22(3): 190-197.
- Xia, P., T. Inoguchi, et al. 1994. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes* 43(9): 1122-1129.