



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Neurobiología

Campus UNAM Juriquilla

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Análisis de la generación y el efecto de las vasoinhibinas
Intraoculares en asociación a la retinopatía diabética

TESIS

Que para obtener el grado de Doctora en Ciencias

Presenta:

M. en C. Mayda Lizeth Ramírez López

Tutora:

Dra. María del Carmen Clapp Jimenez Labora



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.

ÍNDICE

Abstract	1
Resumen	3
I. INTRODUCCIÓN	5
II. ANTECEDENTES	6
1. La diabetes mellitus	6
2. La retinopatía diabética	8
2.1 El globo ocular	8
2.1.1 La retina	10
2.1.1.2 Sistema vascular de la retina	11
2.1.1.3 La barrera hematorretiniana	12
2.2 Fisiopatología de la retinopatía diabética	13
2.2.1 Factores implicados en el desarrollo de la retinopatía diabética	16
2.2.1.1 VEGF	16
2.3 PRL y vasoinhibinas	18
2.4 MMP	23
2.5 Opciones terapéuticas para la RD	24
2.5.1 Terapia génica	27
2.5.1.1 Virus adenoasociados	28
2.5.1.1.1 rAAV2 para el tratamiento de padecimientos oculares	30
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
IV. HIPOTESIS	32
V. OBJETIVOS	33
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	34

Animales	34
Inyección intravitreal	34
Proteólisis de la PRL en el vítreo de la rata	34
Inducción de diabetes en la rata con estreptozotocina	35
Construcciones de los plásmidos y producción de los AAV recombinantes (rAAV)	35
Análisis de la transducción por rAAV <i>in vitro</i>	37
Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa	37
Western blot	38
Deglicosilación de proteínas	39
Análisis de la transducción por rAAV <i>in vivo</i>	39
Localización de las células transducidas por el AAV2-GFP en la retina	39
Angiografía retiniana con fluoresceína	40
Cuantificación de la permeabilidad vascular retiniana por el ensayo del azul de Evans	41
Análisis estadístico	42
VII. RESULTADOS	43
Parte 1. Estudio sobre la actividad de enzimas convertidoras de PRL a vasoinhibinas en el ojo y de su relación con el VEGF y la diabetes.	
1.1 El ojo de la rata contienen enzimas capaces de procesar a la PRL hacia vasoinhibinas y éstas enzimas son más activas en presencia de VEGF.	43
1.2 El VEGF activa MMP en el vítreo de la rata capaces de cortar a la PRL hacia Vi.	44
1.3 El procesamiento de la PRL a vasoinhibinas se incrementa en el ojo de ratas diabéticas	46
Parte 2. Estudio sobre el efecto de la inyección intravitreal de AAV2-Vi sobre el aumento de la vasopermeabilidad retiniana debido al VEGF y a la diabetes.	

2.1 Verificación de la expresión de los transgenes en las células HEK293.	46
2.2 Verificación y localización de la expresión de los transgenes en la retina	48
2.3 La inyección intravitreal del vector AAV2-Vi disminuye la vasopermeabilidad inducida por el VEGF en la retina	51
2.4 El vector AAV2-Vi es capaz de prevenir el aumento en la vasopermeabilidad inducida por la diabetes en la retina	52
VIII. DISCUSIÓN	54
IX. REFERENCIAS	65
X. ANEXO I: PUBLICACIÓN	
XI. ANEXO II: LISTA DE ABREVIATURAS	

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Neurobiología y al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas..

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. Becario 173245) por haber otorgado la beca que me permitió realizar mis estudios de doctorado.

A mi tutora, la Dra. Carmen Clapp por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y por dirigir este hermoso proyecto.

A los Doctores Gonzalo Martínez de la Escalera y Michael Jeziorski por sus consejos.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Ma. Teresa Tusié Luna y el Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez por su participación en los exámenes tutorales que tanto ayudaron en mi formación y en la mejora del proyecto.

A los integrantes del jurado, las Doctoras Carmen Aceves Velasco y María Eugenia Gosebatt Bonaparte y los Doctores Miguel Ángel Morales Mendoza y Andrés Quintanar Stephano por sus valiosas sugerencias y comentarios.

A los Doctores Peter Colosi y Zhijian Wu del National Eye Institute (EUA) por su asesoría y ayuda en la fabricación de los virus adenoasociados.

A los Doctores José Carlos Rivera, Jorge Aranda y Edith Arnold, por su generosidad al enseñarme las técnicas indispensables para la realización de los experimentos del presente trabajo de Tesis.

A la Dra. Bibiana Moreno, Carlos Álvarez y Nundehui Díaz por el apoyo que me brindaron en la realización de algunos de los experimentos.

Al Nut. Fernando López Barrera por el apoyo técnico y por su disposición a ayudar en todo, pero sobre todo por su amistad.

A los laboratoristas Daniel Mondragón Huerta y Antonio Prado Galán.

Al M.V.Z. Martín García Servín, responsable del bioterio del Instituto de Neurobiología.

A Elsa Nydia Hernández Ríos de la unidad de microscopía por su apoyo en el uso del microscopio confocal y la obtención de imágenes.

A María de Lourdes Lara Ayala de la unidad de videoconferencia.

A los coordinadores del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas en el Instituto de Neurobiología, los Doctores Mauricio Díaz Muñoz, Maricela Luna Muñoz y Aurea Orozco Rivas.

A la M en C Leonor Casanova Rico y Carmen Vázquez por su apoyo invaluable en toda la parte administrativa.

A todos los miembros pasados y presentes de los laboratorios A-14 y A-15 pues han sido excelentes compañeros y en todo momento me han brindado su ayuda.

Al Dr, J. de Jesús García Soto y a Sonia Ivonne Perales Canales (QEPD) por haber compartido conmigo su pasión por la ciencia y por la vida.

DEDICATORIA

A Dios, que me bendice cada día

A mis padres, Rafael y Francisca

A mi esposo, Ulises

Y a ti...

ABSTRACT

Diabetic retinopathy (DR) is the most common microvascular complication in diabetes and the leading cause of acquired blindness in the working age population. In its early stage, DR is characterized by retinal microaneurysms, increased vasopermeability, and dot hemorrhages. Overtime vessel occlusion leads to the generation of ischemic areas and the resulting hypoxia stimulates the expression of proangiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), which promote the bleeding and growth of blood vessels into the vitreous, retinal detachment, and blindness. Treatments for DR include laser photocoagulation, vitrectomy surgery, and intravitreal pharmacotherapy. The first two can only treat the advanced disease and are effective in 50% of patients; the last one requires repeated intraocular injections increasing the risk for cataract formation and endophthalmitis. The better understanding of factors involved in the pathophysiology of DR can lead to the development of more effective therapies. Vasoinhibins are a family of peptides present in the eye that have antiangiogenic properties and inhibit the pathological increase in retinal vasopermeability (RVP) associated with diabetes. Here, we investigate whether the generation of intraocular vasoinhibins can be altered by the effect of VEGF and diabetes; and whether the intravitreal injection of an adeno-associated virus type 2 (AAV2) vector encoding vasoinhibin inhibits the excessive RVP occurring in response to VEGF and diabetes. Because vasoinhibins are derived from the specific proteolysis of the hormone prolactin (PRL), in the first part of our study, we analyzed the presence of PRL cleaving proteases in the eye of rats and whether their activity changed in response to the intravitreal injection of VEGF and streptozotocin-induced diabetes. Our results indicate that PRL injected into the vitreous of normal rats is cleaved to vasoinhibins by matrix metalloproteinases (MMP) and that this cleavage is enhanced when PRL is injected together with VEGF or when PRL is injected intravitreally in diabetic rats. Moreover, VEGF stimulated the MMP-mediated degradation of PRL and vasoinhibins. It is proposed that

increased generation and degradation of intraocular vasoinhibins operate early and late in RD, respectively, and may contribute to the progression of the disease. Results from the second part of our work showed that intravitreal administration of an AAV2-vasoinhibin vector prevents the increase in RVP that occurs both after the intravitreal injection of VEGF and after streptozotocin-induced diabetes. In the diabetic model, the effect of the AAV2-vasoinhibin vector was more potent than the one following AAV2 mediated delivery of the soluble receptor-1 of VEGF, a well-characterized VEGF antagonist, suggesting that vasoinhibins can counteract the action of other vasoactive substances besides VEGF. Specificity of action of the AAV2-vasoinhibin vector is supported by the lack of effect of an AAV2-PRL vector.

Altogether, our findings suggest that down-regulation of intraocular vasoinhibins may contribute to the progression of DR and that their replacement with AAV2 mediated gene therapy may represent an effective tool for the treatment of this disease.

RESUMEN

La retinopatía diabética (RD) es la complicación microvascular más común en los pacientes diabéticos y es la principal causa de ceguera a nivel mundial en adultos en edad laboral. La etapa inicial del padecimiento se caracteriza por la presencia de microaneurismas, hemorragias intrarretinianas y el aumento en la permeabilidad vascular. Estas alteraciones conllevan a la oclusión vascular y la isquemia trae como consecuencia una hipoxia local que estimula la producción de factores angiogénicos, entre los que sobresale el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), capaces de promover el crecimiento de vasos no funcionales en dirección del vítreo y el eventual desprendimiento de la retina y ceguera. Los tratamientos para la RD incluyen la fotocoagulación con láser, la vitrectomía y la farmacoterapia intraocular. Las dos primeras se aplican en las etapas más avanzadas de la enfermedad y suelen ser efectivas solo en la mitad de los pacientes, en tanto que los fármacos empleados en la última opción tienen efecto por un tiempo limitado y necesitan ser inyectados en repetidas ocasiones trayendo consigo el riesgo de la inducción de cataratas o hasta de endoftalmitis. El mayor entendimiento de los factores involucrados en la fisiopatología de la RD podría conducir a la implementación de terapias más efectivas y seguras. Las vasoinhibinas representan a una familia de péptidos oculares con efectos antiangiogénicos e inhibidores del aumento de la permeabilidad vascular retiniana (PVR) asociada a la diabetes. En este trabajo de tesis evaluamos si la generación de vasoinhibinas intraoculares se modifica por efecto de la inyección intravítrea de VEGF o por la inducción de diabetes mediante estreptozotocina en la rata. Asimismo, evaluamos la capacidad de la inyección intravítrea de un vector derivado de virus adenoasociado tipo 2 que codifica para una vasoinhibina (AAV2-Vi) de bloquear la PVR inducida por el VEGF o por la diabetes. Debido a que las vasoinhibinas son generadas a partir de la proteólisis de la hormona prolactina (PRL), en la primera parte de

este trabajo analizamos la presencia de proteasas capaces de cortar a la PRL a vasoinhibinas en el ojo y si su actividad se modifica en respuesta a la inyección intravitreal de VEGF o a la diabetes inducida con estreptozotocina. Nuestros resultados muestran que la PRL inyectada en el vítreo de la rata normal es cortada hacia vasoinhibinas por metaloproteasas de matriz (MMP) y que éste procesamiento proteolítico aumenta cuando la PRL es inyectada junto con VEGF o cuando la PRL es inyectada en el vítreo de ratas diabéticas. Más aún, el VEGF estimula la degradación de la PRL y de las vasoinhibinas por las MMP. Proponemos que una mayor producción y degradación de las vasoinhibinas intraoculares ocurre en los estados temprano y avanzado de la RD, respectivamente, y podría contribuir a la progresión del padecimiento. Los resultados de la segunda parte de nuestro trabajo muestran que la inyección intravitreal del vector AAV2-Vi previene el aumento de la PVR que ocurre en respuesta a la administración de VEGF y de la diabetes. En el modelo de ratas diabéticas, el efecto del tratamiento con el vector AAV2-Vi fué mayor en comparación a la administración del vector AAV2 que codifica para el receptor soluble-1 del VEGF, un antagonista natural del VEGF, lo que sugiere que las vasoinhibinas pueden contrarrestar la acción de otras sustancias vasoactivas además del VEGF. En apoyo a la especificidad del efecto del vector AAV2-Vi, la administración de un vector AAV2 que codifica para PRL no tuvo efecto.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que la disminución en los niveles de vasoinhibinas intraoculares podrían contribuir a la progresión de la RD y que su restitución por medio de terapia génica con AAV2 representa una herramienta terapéutica potencial para éste padecimiento.

I. INTRODUCCION

El edema y la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) son la causa de la merma de la visión en la retinopatía diabética, una de las complicaciones más frecuentes y tempranas de la diabetes. Estas alteraciones se originan a consecuencia de una reducción severa en la perfusión sanguínea que produce hipoxia en la retina. La hipoxia estimula la expresión de factores estimuladores de la vasopermeabilidad y de la angiogénesis que generan vasos sanguíneos en la retina que sangran e invaden el humor vítreo. Los neovasos forman una membrana fibrovascular que al ejercer tracción sobre la retina puede ocasionar su desprendimiento y, por ende, ceguera. Por lo tanto, es claro el gran interés por la búsqueda de nuevas estrategias capaces de interferir con la disfunción microvascular que caracteriza a la retinopatía diabética.

La hormona prolactina (PRL) es procesada proteolíticamente hacia vasoinhibinas, una familia de péptidos que inhiben la angiogénesis, la vasodilatación y la vasopermeabilidad, y que promueven la regresión por apoptosis de los neovasos. Estudios recientes indican que el ojo es un órgano productor y blanco de las acciones vasculares de las vasoinhibinas. El RNA mensajero de la PRL se expresa en la retina y se ha detectado tanto a la PRL como a las vasoinhibinas en la retina y en diversos fluidos oculares. El bloqueo de la expresión y acción de estas proteínas se tradujo en la sobreproducción y la vasodilatación de los vasos sanguíneos retinianos y la administración intraocular de vasoinhibinas inhibe la angiogénesis y la vasopermeabilidad en modelos murinos de retinopatía diabética. En su conjunto, estos estudios permitieron proponer a las vasoinhibinas como reguladores fisiológicos de la vascularización retiniana y su posible valor terapéutico en el control de la retinopatía diabética.

En este trabajo de tesis investigamos por una parte si la producción intraocular de vasoinhibinas se altera en la diabetes. Esto lo hicimos a través de analizar la presencia y

actividad de proteasas capaces de generar vaso-inhibinas en el ojo de ratas diabéticas. En una segunda parte, investigamos el posible valor terapéutico de la terapia génica con vaso-inhibinas en la retinopatía diabética. Con este propósito evaluamos si la administración intravitreal de virus adeno-asociados tipo 2 que transfieren vaso-inhibinas a la retina previene el aumento en la vasopermeabilidad retiniana en ratas diabéticas.

A continuación se describen antecedentes generales sobre la diabetes mellitus, la fisiopatología de la retinopatía diabética y la generación y acciones vasculares de las vaso-inhibinas.

II. ANTECEDENTES

1. La diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es uno de los problemas de salud más desafiantes en el siglo XXI. A nivel mundial es una de las enfermedades no contagiosas más comunes y se ha convertido en una de las principales causas de muerte en países desarrollados y que alcanza proporciones epidémicas en países en vías de desarrollo. Reportes recientes indican que en el año 2010 aproximadamente 285 millones de personas en edad adulta (20-79 años) padecieron diabetes en todo el mundo, una cantidad que representa el 6.4% de la población mundial (Diabetes atlas 4th Edition, International Diabetes Federation). México ocupa el décimo lugar a nivel mundial en incidencia de diabetes y se estima que para el 2030 ocupará el séptimo sitio. De acuerdo con la información de la encuesta nacional de salud y nutrición 2006, la prevalencia de DM en nuestro país es del 14% y actualmente ocupa el primer lugar en el número de defunciones por año (Federación Mexicana de Diabetes, 2011).

La DM es un grupo heterogéneo de padecimientos que presentan como elementos comunes la hiperglucemia y la intolerancia a la glucosa debido a la deficiencia de insulina,

una disminución en la efectividad de la acción de la insulina, o ambas. La DM se clasifica, en base a su etiología y a la presentación clínica del padecimiento, en 4 tipos: DM tipo 1 (5-10%), DM tipo 2 (90-95%), DM gestacional (5-6% de mujeres embarazadas) y “otros tipos de diabetes” (<1%) que pueden ser consecuencia de defectos genéticos, enfermedades del páncreas o de efectos de ciertas sustancias químicas y medicamentos (Guthrie y Guthrie, 2004).

La DM tipo 1, también conocida como diabetes dependiente de insulina, es la causa más frecuente de DM en el sector más joven de la población y se caracteriza por la destrucción de las células beta del páncreas que conlleva a una deficiencia en la producción de insulina. Se han identificado dos formas: la DM tipo 1A que es el resultado de la destrucción de las células beta por el sistema inmune; y la DM tipo 1B que es mucho menos frecuente, ocurre con mayor frecuencia en individuos de ascendencia asiática o africana (Daneman, 2006).

La DM tipo 2, también llamada diabetes no dependiente de insulina, es la forma más común de diabetes y tiene un origen multifactorial. Un estilo de vida sedentario y la ingesta excesiva de alimento son considerados factores desencadenantes del padecimiento, aunque también hay un componente genético, pues se ha observado que el tener una historia familiar positiva de diabetes incrementa 2.4 veces el riesgo de padecer esta enfermedad. La prediabetes es un estado en el que el individuo presenta intolerancia a la glucosa y tiene niveles de glucosa elevados pero no tan altos como para ser considerado diabético. Con el tiempo se desarrolla la DM tipo 2 caracterizada por un aumento en la resistencia a la acción de la insulina que no puede ser compensada por un aumento en la producción de insulina (Deshpande et al., 2008). La obesidad y la inactividad física son factores fuertemente ligados al desarrollo de la resistencia a la insulina (Stumvoll et al., 2005).

A medida que progresa la DM se afectan diversos órganos en el cuerpo y se llegan a desarrollar complicaciones muy severas. Las complicaciones de la DM se clasifican en: macrovasculares, que incluyen la enfermedad cardiovascular, el ataque cerebrovascular y la enfermedad vascular periférica; y microvasculares, que comprenden el daño al sistema nervioso (neuropatía), al sistema renal (nefropatía) y al ojo (retinopatía) (Deshpande et al, 2008).

2. La retinopatía diabética

La retinopatía diabética (RD) es la complicación microvascular más común en la DM, se estima que en México 2 de cada 5 personas que padecen diabetes llegan a desarrollar ceguera (Federación Mexicana de Diabetes, 2011). La prevalencia de RD se incrementa con la duración del padecimiento y se considera que luego de 20 años el 95% de las personas con DM tipo 1 y más del 60% de aquellas con DM tipo 2 desarrollarán algún grado de retinopatía (Mohamed et al., 2007). Los factores de riesgo para desarrollar RD incluyen: el origen étnico (mayor prevalencia y severidad en África-Americanos, Hispanos y sur Asiáticos), la duración del padecimiento, la hiperglucemia, la hipertensión, la dislipidemia, la pubertad, el embarazo, la cirugía de catarata y, datos recientes, sugieren la participación de un componente genético independientemente de los factores de riesgo (Cheung et al., 2010).

2.1 El globo ocular

Para entender cómo la retinopatía diabética afecta la visión es importante revisar algunos aspectos de la estructura y el funcionamiento del globo ocular. El ojo es la estructura que nos permite la percepción visual, está diseñado para enfocar una imagen visual en la retina con la mínima distorsión óptica. Para tener una visión adecuada se requiere el funcionamiento normal de la retina y mantener el eje visual transparente para

que la luz pueda pasar sin sufrir alguna desviación. La luz que penetra en el ojo debe atravesar la córnea, el cristalino, el vítreo y finalmente llega a la retina (Figura 1A), donde los fotorreceptores captan los fotones de luz y los convierten en una señal eléctrica que es transmitida hacia la corteza visual del cerebro donde la información es procesada e interpretada.

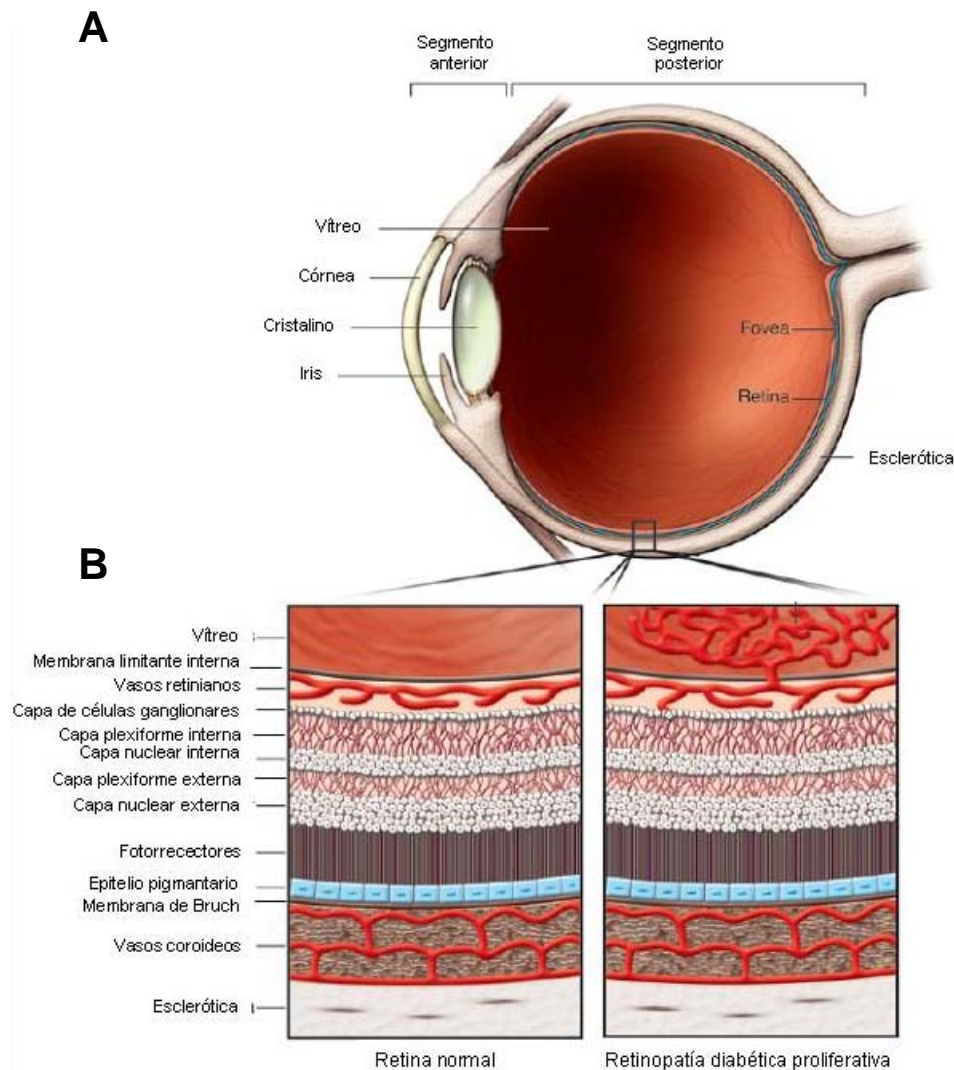


Figura 1. Esquemas que ilustran la estructura del globo ocular (A) y de la retina (B) en condiciones normales y con retinopatía diabética proliferativa. Tomado con modificaciones de Sapiha et al., 2010.

El interior del globo ocular es un espacio grande dividido en dos cavidades por el cristalino: la cavidad anterior, que contiene al humor acuoso y la cavidad posterior, cuya superficie se encuentra recubierta por la retina y el gran espacio restante que contiene una sustancia gelatinosa que se denomina cuerpo vítreo compuesto en su gran mayoría por agua, colágeno y ácido hialurónico. El vítreo contribuye a la presión intraocular, ayuda a evitar que el globo ocular se colapse, absorbe los impactos para proteger a la retina y la mantiene adosada a la parte posterior del ojo.

2.1.1 La retina

La retina es un órgano sensorial especializado que se desarrolla a partir del ectodermo neural. Consiste de múltiples capas de neuronas unidas mediante un intrincado patrón de conexiones pero con un arreglo anatómico ordenado en capas; también contiene vasos sanguíneos, matriz extracelular y algunos otros tipos de células como las gliales y los monocitos. En un corte sagital de la retina teñido con hematoxilina y eosina se distinguen ocho capas: la parte interna de la retina se encuentra separada del vítreo por la membrana limitante interna (MLI), debajo de ella se ubica la capa de fibras nerviosas (CFN), que contiene principalmente prolongaciones de los axones de las células ganglionares; luego está la capa de células ganglionares (CCG), seguida de la capa plexiforme interna (CPI), que contiene principalmente fibras. La capa nuclear interna (CNI) que contiene los núcleos de las células bipolares, amácrinas y horizontales; la capa plexiforme externa (CPE) que contiene fibras nerviosas, la capa nuclear externa (CNE) que contiene los núcleos de los fotorreceptores y sus segmentos internos y externos y, finalmente, el epitelio pigmentario retiniano (EPR) (Figura1B). La citoarquitectura de la retina se mantiene más o menos homogénea excepto en la zona de la mácula lútea donde se concentran la mayor cantidad de conos (fotorreceptores responsables de la visión en color). La mácula lútea está ubicada en la parte central de la retina y en su

centro se observa un pequeño hundimiento que corresponde a la zona donde se tiene la mejor agudeza visual y que se denomina fovea. La parte central de la fovea se llama foveola, en ella la retina es más delgada debido a que contiene únicamente fotorreceptores y fibras de la capa plexiforme externa, los elementos de las capas superiores son desplazados hacia los lados para permitir que la luz incida directamente en los fotorreceptores.

2.1.1.2 Sistema vascular de la retina

El aporte sanguíneo de la retina se lleva a cabo por medio de dos sistemas vasculares separados, denominados el sistema retiniano y el sistema coroideo. El primero consiste de los vasos sanguíneos retinianos, ubicados en las cuatro capas internas de la retina (CLI, CFN, CCG, CPI), y el sistema coroideo es un plexo vascular que se encuentra en la parte más externa de la retina.

Los fotorreceptores se ubican en la región externa de la retina neurosensorial y sus segmentos externos descansan en el EPR, una monocapa de células epiteliales que contienen al pigmento melanina cuya función es absorber la luz que no es captada por los fotorreceptores para evitar que ésta sea reflejada hacia la retina nuevamente y afecte la imagen visual. El EPR reposa sobre una membrana basal de colágeno (membrana de Bruch), y directamente debajo de esta estructura corren los vasos de la coroides que nutren la región más externa de la retina. A pesar de que los vasos retinianos y coroideos provienen de la arteria oftálmica, que es una rama de la carótida interna, poseen diferencias morfológicas y funcionales (Pournaras et al., 2008).

La arteria central de la retina emerge en el disco óptico donde se divide en dos ramas principales, a su vez estas ramas se dividen en arteriolas que se extienden hacia la periferia, las arteriolas terminales precapilares se ramifican para formar capilares que a su

vez se conectan con las vénulas postcapilares del sistema venoso que sigue un patrón de ramificación similar y desemboca en la vena central de la retina que sale del ojo a través del disco óptico y desemboca en el seno cavernoso. La pared capilar está compuesta por tres elementos diferentes: células endoteliales, pericitos intramurales y membrana basal.

La capa continua de células endoteliales que forma la luz de los capilares está rodeada por una membrana en la cual están inmersos los pericitos que forman una capa discontinua y se encuentran casi en relación 1:1 con las células endoteliales (Kowluru et al., 2010). Cabe señalar que los capilares de la retina tienen una gran cantidad de pericitos incluso más que los capilares del cerebro lo que probablemente esté contribuyendo al control de la barrera hematoretiniana (Hammes, 2005). Las células de glía de la retina, astrocitos y células de Müller, participan envolviendo los vasos con sus terminaciones y algunas evidencias sugieren que juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad de los vasos y de sus propiedades de barrera a través de contactos directos o de la liberación de factores humorales (Wolburg y Lippoldt, 2002)

2.1.1.3 La barrera hematorretiniana

Las células endoteliales de los vasos capilares retinianos presentan uniones estrechas y carecen de fenestraciones lo que hace que este tejido sea el principal componente de la barrera hematoretiniana interna (Kaur et al., 2007). Por su parte, la barrera hematoretiniana externa está compuesta por tres estructuras: el endotelio con fenestraciones de la coroides, la membrana de Bruch y el EPR. Estas estructuras muestran un grado creciente de restricción de acuerdo al tamaño y la carga de los solutos y moléculas, siendo el nivel más permisivo el de la coroides y el menor el del EPR. El EPR está constituido por una capa simple de células que presentan uniones intercelulares adherentes, estrechas y también de tipo cerrado (“gap”). Como epitelio de transporte transcelular el EPR presenta una polaridad apical-basal, lo que permite el movimiento de

nutrientes y de la vitamina A desde la sangre hacia los fotorreceptores y en dirección opuesta del desecho de metabolitos, fluido extracelular e iones del espacio subretiniano hacia la coroides. El agua que se produce a causa del intenso recambio metabólico de las células de la vía visual es evacuada de la retina por las células de la glía (células de Müller principalmente) y del espacio subretiniano por el EPR (Pournaras et al., 2008).

2.2 Fisiopatología de la retinopatía diabética

Los mecanismos fisiopatológicos que dan origen a la RD son complejos y no se conocen del todo. Entre sus principales causas se incluyen la exposición crónica a la hiperglucemia, el aumento de la presión arterial y niveles anormales de lípidos en la sangre que a través de generar una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos producen un daño microvascular en la retina. Las principales vías bioquímicas implicadas en la generación del padecimiento incluyen la acumulación de sorbitol y los productos finales de la glicosilación, el estrés oxidativo, la activación de la proteína cinasa C, la inflamación y la regulación a la alza de los sistemas renina–angiotensina y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Brownlee, 2005). La figura 2 muestra un esquema que ilustra la interacción de todos estos elementos, la secuencia en que actúan y cómo contribuyen a las diversas etapas de la RD.

En la RD se presentan alteraciones vasculares a nivel estructural y funcional. La etapa temprana del padecimiento denominado RD no proliferativa (RDNP) se caracteriza por el engrosamiento de la membrana basal de los capilares, la apoptosis y el desprendimiento de los pericitos y la ruptura de las uniones estrechas entre las células endoteliales, esto se refleja en un aumento de la permeabilidad vascular y la oclusión de los capilares. En el examen oftalmoscópico se observan anomalías en la vasculatura retiniana como microaneurismas, vasos tortuosos, hemorragias intraretinianas y manchas algodonosas. En estadios avanzados de la RDNP se presenta un daño endotelial severo,

hay una mayor activación de los leucocitos lo que les confiere una mayor adhesividad a las células endoteliales vasculares, el taponamiento gradual de los vasos retinianos resulta en áreas localizadas de isquemia en el tejido.

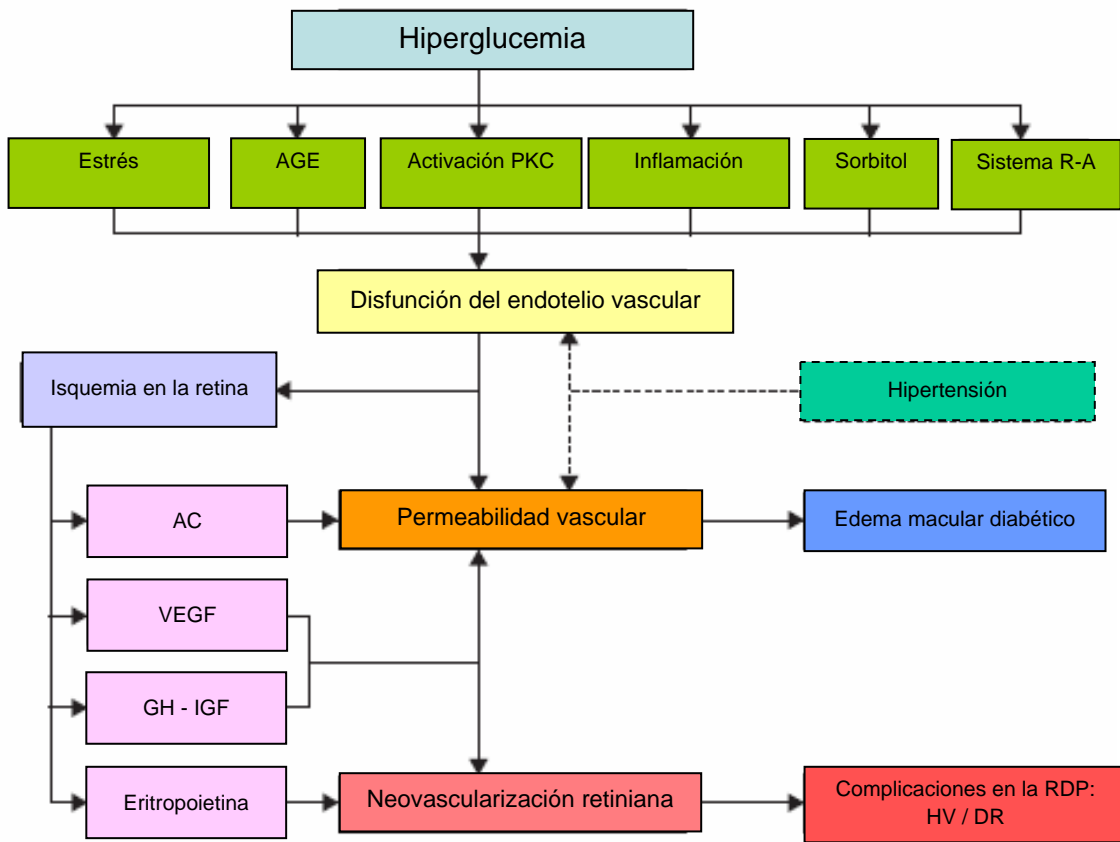


Figura 2. Diagrama que ilustra los principales factores involucrados en la fisiopatología de la retinopatía diabética. La hiperglucemia crónica provoca alteraciones en diversas vías metabólicas que conducen a la disfunción del endotelio vascular que se traduce en isquemia, la expresión de diversas sustancias vasoactivas, la neovascularización, y el aumento en la permeabilidad vascular. Estos factores aunados a la hipertensión determinan el desarrollo de la retinopatía y del edema macular diabético. AGE = productos finales de la glicosilación, PKC = proteína cinasa C, sistema R-A = sistema renina-angiotensina, AC = anhidrasa carbónica, VEGF = factor de crecimiento del endotelio vascular, GH – IGF = hormona del crecimiento – factor de crecimiento tipo insulina, RDP = retinopatía diabética proliferativa, HV = hemorragia vítrea, DR = desprendimiento de retina. Tomado con modificaciones de Cheung et al., 2010.

A medida que la enfermedad progresa ocurre la pérdida de células endoteliales, por lo que los capilares quedan constituidos únicamente por una membrana basal gruesa. Estos eventos contribuyen a empeorar la isquemia y conducen a una hipoxia tisular severa, lo que favorece la progresión hacia retinopatía diabética proliferativa (RDP). La hipoxia promueve la formación de nuevos vasos en la superficie de la retina mediante la inducción de factores angiogénicos, tales como el VEGF que es considerado el principal promotor de la retinopatía diabética (Miller et al., 1997). Estos vasos son frágiles y susceptibles de sangrar; además, tienden a crecer en dirección del vítreo, en el cual quedarán anclados eventualmente mediante la formación de un tejido fibrovascular. Este tejido fibroso puede contraerse y ocasionar el desprendimiento de la retina, teniendo como última consecuencia la ceguera (Yam y Kwok, 2007).

Además del establecimiento de la etapa proliferativa de la RD existe otro cambio en la retina que se puede presentar en cualquier etapa del padecimiento y que afecta gravemente la visión: el edema macular diabético (EMD). El EMD es la principal causa de pérdida de la visión central en pacientes con RD, la prevalencia de EMD en pacientes que fueron diagnosticados con diabetes 15 años atrás es de 20% en pacientes con DM tipo 1 y 25% de los que padecen DM tipo 2 (Massin, 2008). El edema macular es la filtración y acumulación de fluido en la mácula, que puede ser a nivel extracelular como consecuencia del incremento en la permeabilidad en las barreras hematorretiniana interna y/o externa, o bien intracelular por la acumulación de líquido en las células de glía de Müller y los cuerpos neuronales lo que ocasiona que éstas células se hinchen (Ambati, 2007). Estos eventos tienen como resultado un aumento en el grosor de la mácula e incluso puede haber desprendimiento de esta zona, la acumulación de fluido contribuye a la degeneración de las neuronas retinianas y a la compresión de fibras nerviosas, neuronas y vasos lo que resulta en una disminución de la agudeza visual (Reichenbach et al., 2007).

2.2.1 Factores implicados en el desarrollo de la retinopatía diabética

El análisis de especímenes de pacientes y los resultados de estudios en varios modelos animales apoyan el concepto de que los niveles elevados de glucosa en los tejidos y en la sangre y la isquemia estimulan la producción de factores angiogénicos (Penn et al., 2008). Entre los factores de crecimiento y citocinas que han sido implicados en la patogénesis de la RD y del EMD se incluyen el VEGF, la eritropoietina (Epo), la angiopoyetina (Ang), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1), el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), el factor derivado del estroma 1 (SDF-1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y las interleucinas 1 β , 6 y 8 (IL-1 β , IL-6, IL-8). Estos factores actúan de manera sinérgica promoviendo las diferentes etapas del proceso angiogénico, a saber la migración y proliferación de células endoteliales y su conformación en estructuras capilares estables (Penn et al., 2008; Qazi et al., 2009).

2.2.1.1 VEGF

El VEGF ha sido identificado como un mediador primario de las alteraciones vasculares observadas en la RD (Mathews et al., 1997; Frank, 2004). Diversos eventos que se suscitan en la diabetes como el nivel elevado de glucosa, el estrés oxidativo, la hipoxia y las reacciones inflamatorias inducen un incremento en la expresión de VEGF. La molécula de VEGF es una glicoproteína dimérica de aproximadamente 40 kilodaltones (kDa) que ejerce un potente efecto angiogénico sobre las células endoteliales estimulando su proliferación, migración, permeabilidad y supervivencia (Penn et al., 2008). En los mamíferos, la familia del VEGF consiste de 7 miembros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y PlGF (factor de crecimiento de la placenta) (Bhisitkul, 2006). El VEGF-A es el más estudiado y se piensa que es el modulador de la angiogénesis más importante además de que es el único gen del VEGF cuya expresión se incrementa en

condiciones de hipoxia (Yonekura et al., 1999). El VEGF-A tiene 9 isoformas generadas por el splicing alternativo del gen VEGF-A conocidas como 121, 145, 148, 162, 165, 165b, 183, 189 y 206, entre ellas las más estudiadas hasta el momento son las isoformas 121, 165, 189 y 206 (Das y McGuire, 2003). La isoforma VEGF 165 se puede encontrar adosada a la matriz extracelular o bien en su forma libre, es la más abundante y es considerada la más importante (Stewart et al., 2011), debido a ello en este trabajo se hace referencia al VEGF 165 simplemente como VEGF. El VEGF ejerce sus efectos angiogénicos a través de dos receptores: el receptor tipo 1 (VEGFR-1 o Flt-1) y el receptor tipo 2 (VEGFR-2 o KDR) que presentan actividad de tirosina cinasa (Blume-Jensen y Hunter, 2001). Algunas vías de señalización activadas por la unión del VEGF a su receptor en las células endoteliales incluyen la de las MAP cinasas (MAPK), la de la proteína cinasa C (PKC) y la de PI3K/Akt.

Existen reportes de que los niveles tanto del VEGF como de sus receptores se encuentran elevados en la retina de modelos animales de retinopatía isquémica (Smith et al., 1994; Suzuma et al., 1998) y de diabetes (Sone et al., 1997; Hammes et al., 1998); este aumento en los niveles intraoculares del VEGF induce cambios en la permeabilidad vascular y la angiogénesis retiniana, comparables a los presentes en la RD (Tolentino et al., 1996; Ohno-Matsui et al., 2002; Garcia et al., 2008). También se han detectado concentraciones significativamente mayores de VEGF en el vítreo de pacientes con RDP en comparación al vítreo de sujetos sin RD (Adamis et al., 1994). El papel esencial que juega el VEGF en la RD se ha demostrado en varios experimentos en los que el bloqueo de la función del VEGF pudo prevenir el aumento de la permeabilidad vascular tanto en pacientes (Avery et al., 2006; Starita et al., 2007; Simó y Hernández, 2008) como en modelos animales (Ishida et al., 2003; Ideno et al., 2007).

El ojo también produce factores antiangiogénicos capaces de contrarrestar los efectos de las moléculas antes mencionadas. Finalmente, el balance entre los factores

angiogénicos y antiangiogénicos es el que determina el desarrollo y la progresión de la RDP (Simó et al., 2006). Algunos factores antiangiogénicos endógenos cuya concentración se encuentra disminuída en las condiciones de la RDP incluyen el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) (Matsuoka et al., 2007), la endostatina (Funatsu y Yamashita, 2002) la trombospondina (TSP) (Praidou et al., 2010), la somatostatina (Cervia et al., 2008) y las vasoinhibinas (Vi) (Triebel et al., 2009).

2.3 PRL y vasoinhibinas

Las vasoinhibinas son péptidos con actividad antiangiogénica, derivados del procesamiento proteolítico de la PRL, una hormona conocida inicialmente por sus efectos estimuladores de la producción de leche en mamíferos. Sin embargo, en la actualidad se sabe que la PRL es una hormona multifuncional que ejerce efectos en la reproducción, el metabolismo, la regulación del sistema inmune y en la osmorregulación (Ben-Jonathan et al., 2006). La PRL humana tiene una masa molecular de 23 kDa y puede ser cortada por proteasas como la catepsina-D (Piwnica et al., 2004), la proteína morfogénica de hueso 1 (BMP-1) (Ge et al., 2007) o las metaloproteasas de la matriz (MMP) (Macotela et al., 2006), para producir vasoinhibinas, una familia de péptidos que contienen la región N-terminal de la PRL y que oscilan entre los 14 y 18 kDa (Clapp et al., 2006). El procesamiento proteolítico de la PRL humana por catepsina D produce cortes en las posiciones 132-133, 147-148 y 150-151 generando vasoinhibinas de 15, 16.8 y 17.2 kDa respectivamente. La proteólisis por acción de las MMP-1, 2, 3, 8, 9 y 13 corta a la PRL entre los aminoácidos 156 y 157 generando una vasoinhibina de 17 kDa que puede seguir siendo procesada por las MMP hasta vasoinhibinas de 16 y 14 kDa. Por su parte la BMP-1 corta a la PRL entre los aminoácidos 159 y 160 lo que resulta en una vasoinhibina de 18 kDa (Figura 3).

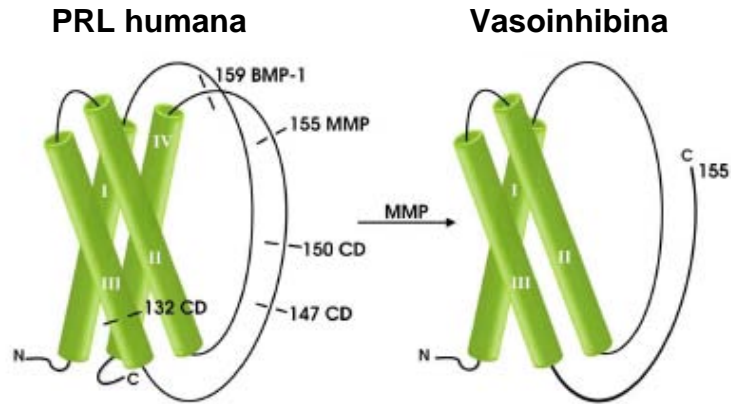


Figura 3. Representación esquemática de la molécula de prolactina humana donde se indican los residuos en que cada una de las proteasas son capaces de cortarla hacia vasoinhibinas. El corte por la proteína morfogénica de hueso-1 (BMP-1) ocurre en el residuo 159, por las metaloproteasas de matriz (MMP) en el residuo 155 y por la catepsina D en las posiciones 132, 147 y 150. Se representa la vasoinhibina generada por el corte con MMP. Tomado de Clapp et al., 2008.

Las vasoinhibinas actúan, tanto *in vitro* como *in vivo* bloqueando la actividad estimuladora de factores como el VEGF, el FGF-2 y la IL-1 β sobre la proliferación (Clapp et al., 1993), la migración (Lee et al., 2007) y la permeabilidad (García et al., 2008) de células endoteliales; también pueden interferir con la dilatación vascular inducida por VEGF (Gonzalez et al., 2004) y con la estimulación de la actividad del activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA) inducida por el FGF-2 (Lee et al., 1998). Además, las vasoinhibinas son capaces de bloquear la actividad basal del uPA a través de inducir la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) (Lee et al., 1998; Struman et al., 1999), probablemente es mediante este efecto que las vasoinhibinas pueden interferir con la formación de estructuras tubulares semejantes a capilares en geles de colágena (Clapp et al., 1993). Finalmente, las vasoinhibinas pueden actuar independientemente de los factores de crecimiento induciendo la apoptosis de las células endoteliales en cultivo (Martini et al., 2000) y la regresión de vasos sanguíneos mediada por apoptosis (Dueñas et al., 2004). El receptor de las vasoinhibinas aún no ha sido

identificado químicamente, pero se sabe que es diferente del receptor de la PRL y que está presente en las membranas de células endoteliales, donde se han detectado sitios de unión saturables y de alta afinidad (K_d 1-10nM) para vasoinhibinas que se asocian con proteínas de 32 y 52 kDa (Clapp y Weiner, 1992) (Figura 4).

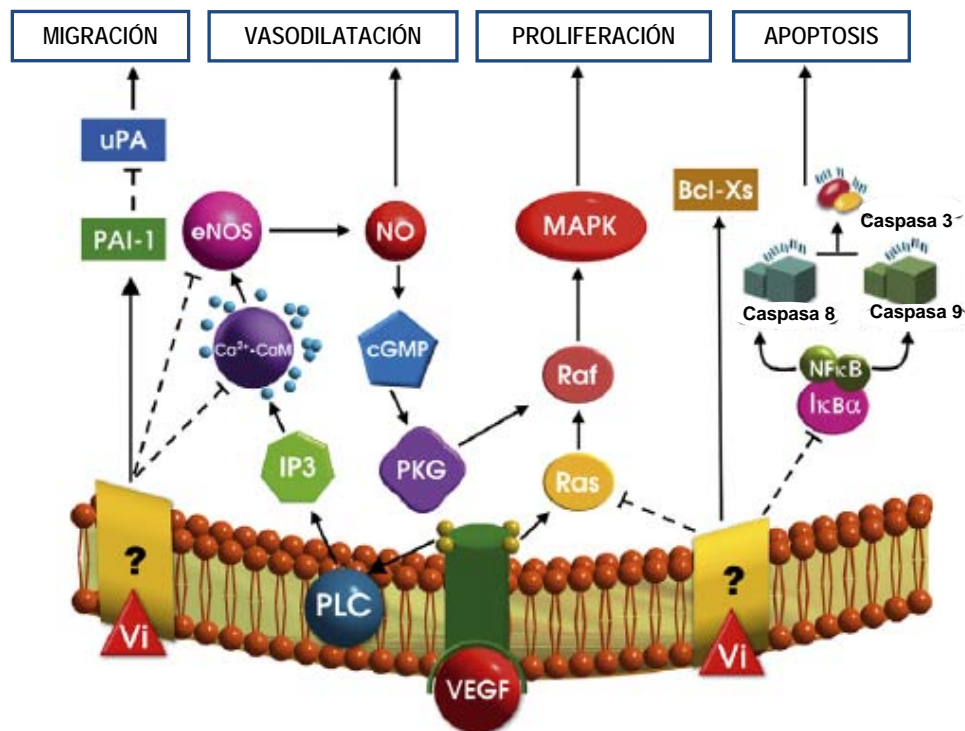


Figura 4. Vías de señalización activadas por la unión de las Vi a su receptor en las células endoteliales. Las Vi pueden inhibir la migración a través del aumento en la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) o bien estimular la apoptosis mediante la activación de Bcl-Xs y/o NFκB. Además, las Vi son capaces de bloquear la estimulación de las vías de eNOS y Ras-MAPK inducidas por el VEGF, lo que resulta en la inhibición de la vasodilatación y la proliferación, respectivamente. Las flechas indican efecto estimulatorio en tanto que las líneas punteadas indican efecto inhibitorio.

En las células endoteliales, las vasoinhibinas interfieren con los efectos vasculares del VEGF a través de bloquear la activación de la sintetasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) inducida por el VEGF (Gonzalez et al., 2004; Garcia et al., 2008), que es una de

las vías de señalización por las cuales el VEGF estimula la permeabilidad vascular (Fukumura et al., 2001) y lo hacen a través de activar a la proteína fosfatasa 2A que desfosforila e inactiva a la eNOS (Garcia et al., 2008). Las vasoinhibinas también interfieren con la movilización del calcio intracelular evitando la activación de eNOS por Ca^{2+} -calmodulina (Gonzalez et al., 2004) (Figura 5).

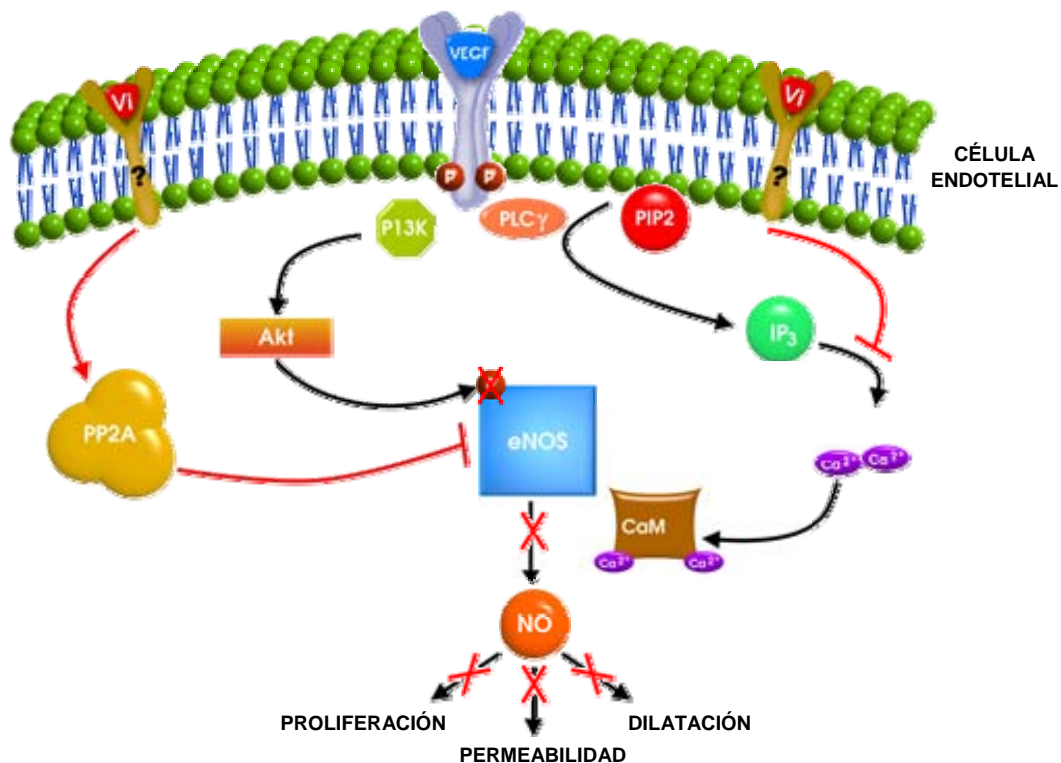


Figura 5. Las vasoinhibinas bloquean los efectos vasculares del VEGF. Las vasoinhibinas (Vi) actúan por medio de un receptor desconocido en las membranas de las células endoteliales para bloquear la acción del VEGF sobre la activación de la sintetasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y la subsecuente producción de óxido nítrico a través de interferir con dos de las vías de señalización que la activan. Por una parte, interfieren con la vía PI3K/Akt por medio de la activación de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) que desfosforila e inactiva a la eNOS; y por otra parte, interfieren con la movilización de calcio intracelular inducida por la activación de la vía PLCγ/IP3 evitando así la activación de eNOS inducida por el complejo calcio-calmodulina (CaM). Por estos mecanismos las Vi previenen la permeabilidad, la dilatación y la proliferación de los vasos sanguíneos inducidas por el VEGF.

Las vasoinhibinas han sido detectadas en la hipófisis (Cruz-Soto et al., 2009) y en diferentes tejidos extrahipofisarios (Clapp et al., 2006), incluyendo a la retina (Aranda et al., 2005). También se han determinado vasoinhibinas en el líquido subretiniano y en las membranas fibrovasculares intraoculares obtenidas de pacientes con retinopatía del prematuro (Dueñas et al., 2004). Las vasoinhibinas retinianas pueden provenir de la proteólisis de la PRL incorporada al ojo a partir de la circulación, ya que se ha observado que PRL marcada radiactivamente inyectada en el corazón de la rata se internaliza en la retina (O'Steen & Sudenberg, 1982) y que el aumento en la PRL circulante se traduce en un incremento en la concentración de vasoinhibinas retinianas (Arnold et al., 2010). Sin embargo, las vasoinhibinas también pueden derivar de la PRL sintetizada localmente. La retina expresa el RNA mensajero de la PRL y lo traduce a PRL que es procesada parcialmente a vasoinhibinas (Aranda et al., 2005; Rivera et al., 2008).

Los efectos de las vasoinhibinas endógenas se pusieron de manifiesto al mostrar que la inyección intravitreal de anticuerpos capaces de secuestrarlas induce angiogénesis en la retina (Aranda et al., 2005) e inhibe la regresión de vasos intraoculares durante el desarrollo (Dueñas et al., 2004). Además, la transfección intraocular de pequeños RNA de interferencia capaces de bloquear la expresión local de prolactina, resulta en un aumento en la angiogénesis retiniana (Aranda et al., 2005). Estos hallazgos permitieron proponer que las vasoinhibinas participan en el control natural de la angiogénesis ocular, de hecho, se ha mostrado que la sobre-expresión de vasoinhibinas mediante la administración intraocular de vectores adenovirales bloquea la angiogénesis retiniana en el modelo murino de retinopatía vasoproliferativa inducido por hiperoxia (Pan et al., 2004). Más aún, el aumento en los niveles de vasoinhibinas intraoculares previene el aumento en la permeabilidad vascular en la retina de ratas diabéticas y en la de ratas tratadas con una inyección intravitreal de VEGF o del vítreo de pacientes con RDP (García et al., 2008). Cabe señalar que los pacientes con RD tienen disminuidos los niveles de vasoinhibinas

en la circulación (Triebel et al., 2009) y que ratas diabéticas con niveles elevados de vasoinhibinas retinianas presentan una menor permeabilidad vascular en la retina (Arnold et al., 2010).

De acuerdo a todos estos estudios, es posible plantear la posibilidad de que una disminución en la concentración de vasoinhibinas intraoculares participa en la progresión de la RD. Dado que la PRL está presente en el ojo, la actividad de las proteasas responsables de generar vasoinhibinas desempeñaría un papel decisivo en regular la concentración intraocular de estos péptidos. Se sabe que las MMP se incrementan en el ojo de pacientes con RD (Salzmann et al., 2000; Sivak y Fini, 2002) lo que las hace candidatas posibles para determinar los niveles intraoculares de vasoinhibinas en este padecimiento.

2.4 MMP

Las MMP son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que intervienen en el remodelamiento de la membrana basal y la degradación de los componentes de la matriz extracelular. De acuerdo a su localización se subdividen en dos familias: MMP solubles y aquellas que están asociadas a la membrana celular. Las MMP generalmente se secretan como zimógenos y pueden ser activadas en el ambiente extracelular o también intracelularmente por enzimas como la furina (Sternlicht y Werb, 2001). Las MMP pueden promover la angiogénesis ayudando a desprender los pericitos de los vasos y facilitando la migración de las células endoteliales a través de la matriz extracelular. Las MMP también pueden contribuir de manera negativa a la angiogénesis a través de la generación de moléculas antiangiogénicas endógenas mediante el procesamiento proteolítico de proteínas precursoras que carecen de esta actividad (Raffeto y Khalil, 2008). Por ejemplo las MMP-7, 9 y 12 pueden cortar al plasminógeno y generar un fragmento antiangiogénico conocido como angiostatina (Cornelius et al., 1998) y las MMP-

1, 2, 3, 8, 9 y 13 pueden cortar a la prolactina hacia vasoinhibinas (Macotela et al., 2006). Existen varios estudios en que demuestran que la concentración y el grado de activación de las MMP, especialmente la 2 y la 9, están elevados en la retina (Kadoglow et al., 2005; Bhatt y Addepalli, 2010) y el vítreo (Noda et al., 2003) de pacientes diabéticos en comparación con la retina de ojos control. También se detectó la presencia de las MMP-1, 2, 3 y 9 en las membranas epiretinianas obtenidas de pacientes con RDP (Salzman et al., 2000). En este trabajo de tesis se investigó la presencia de MMP intraoculares capaces de generar vasoinhibinas a partir de la PRL y si la actividad de estas proteasas se altera en el ojo de ratas diabéticas o por efecto de la administración intravitreal del VEGF.

El hecho de que las vasoinhibinas inhiben alteraciones vasculares en la retina debidas a la diabetes, las señala como agentes terapéuticos potenciales contra la RD. Esta posibilidad también fue abordada en la presente tesis. A continuación se revisan aspectos generales de las terapias actuales contra la RD.

2.5 Opciones terapéuticas para la RD

La estrategia convencional inicial es el tratamiento profiláctico de la RD mediante el estricto control de la glucosa sanguínea, la hipertensión y la hiperlipidemia, ya que se ha observado que ello puede prevenir y/o retardar la aparición y progresión de la RD (Ciulla et al., 2003; Fante et al., 2010). Todos los pacientes diabéticos deben acudir al menos una vez al año con el oftalmólogo a partir del tercer año de haber sido diagnosticados para detectar cualquier cambio vascular en la retina.

La terapia de elección para los cuadros avanzados de RD y de EMD es la fotocoagulación con láser. En el caso de la RD dicho tratamiento consiste en cauterizar múltiples zonas pequeñas de la retina periférica para eliminar el tejido isquémico que estimula el proceso angiogénico. Para el caso del EMD las quemaduras con láser son dirigidas hacia los microaneurismas cercanos a la zona de la mácula con el objetivo de

reducir la filtración de fluido en esta zona. Es importante mencionar que la fotocoagulación con láser sólo es efectiva para evitar la pérdida severa de la visión en poco más del 50% de los casos y que su carácter destructivo presenta varias desventajas como son la reducción del campo visual, el deterioro de la visión nocturna o de la visión del color, según el área donde se aplique el tratamiento, y que en ocasiones puede empeorar el edema macular (Ferris, 1993; Singh et al., 2008; Kollias y Ulbig, 2010).

La vitrectomía es una cirugía en la que se retira el vítreo y el tejido fibrovascular asociado a la retina para que en los casos de desprendimiento de retina pueda esta colocarse en su lugar. La vitrectomía es indicada cuando hay hemorragias en el vítreo y en estados de RDP severa. El hecho de remover el vítreo turbio y el tejido fibrovascular por si mismo ayuda a mejorar la visión, además de permitir retirar también las sustancias angiogénicas y citocinas presentes en estas estructuras. La desventaja es que sólo se aplica en un estado muy avanzado del padecimiento y puede ser un factor de riesgo para la neovascularización del iris o el desarrollo de cataratas (Stefansson, 2009).

Entre las opciones de tratamiento emergentes se encuentra la farmacoterapia intraocular, en particular existe un gran interés por el uso de factores capaces de inhibir el proceso angiogénico. Siendo el VEGF un potente mediador del crecimiento anormal de los vasos y de la permeabilidad vascular retiniana, se le considera un importante blanco terapéutico. Actualmente existen 4 diferentes agentes anti-VEGF que muestran efectos promisorios para el tratamiento de la RD y el EMD. Estudios clínicos multicéntricos realizados con tres de ellos: pegaptanib (Macugen, aptámero), bevacizumab (Avastin, anticuerpo monoclonal humanizado) y ranibizumab (Lucentis, porción Fab de un anticuerpo recombinante monoclonal humanizado) mostraron una mejora en la agudeza visual y una reducción significativa del grosor de la retina (Cunningham et al., 2005; Arevalo y Garcia-Amaris, 2009; Takamura et al., 2009) y de la neovascularización (Adamis et al., 2006; Mirshahi et al., 2008). El último tratamiento, llamado VEGF-Trap

(complejo proteico de fusión constituido por la región Fc de una IgG y los dominios de unión de los receptores VEGFR1 y VEGFR2) está siendo evaluado para el tratamiento del EMD (Do et al., 2009). La eficiencia del uso de estos agentes oscila desde el 30% hasta un 80% dependiendo del fármaco, pero los porcentajes de éxito más altos solo se alcanzan cuando la administración de estos agentes se realiza en combinación con la fotocoagulación con láser. La desventaja principal del uso de agentes anti-VEGF es que el efecto es temporal, por lo que se requiere de inyecciones intravitreales repetidas que pueden llegar a ser tan frecuentes como una vez al mes, lo que aumenta el riesgo de complicaciones como la formación de cataratas, uveítis, hemorragia vítrea, glaucoma, desprendimiento de retina y endoftalmitis (Wilkinson-Berka y Millar, 2007; Cheung et al., 2010; Fante et al., 2010). Además, una proporción significativa de estos fármacos inyectados en el ojo pueden pasar a la circulación sistémica y existe la posibilidad de que pueda tener efectos colaterales como la hipertensión, proteinuria, falla en la reparación de heridas y de la formación de colaterales sanguíneas (Simó & Hernández, 2008, Cheung et al., 2010). Otra consideración importante es el hecho de que el VEGF en el ojo normal es un factor neuroprotector y este tipo de tratamientos podrían interferir con el funcionamiento de la retina neural (Nishijima et al., 2007).

Otros fármacos administrados intravitrealmente que se encuentran en investigación son los corticosteroides antiinflamatorios: acetato de triamcinolona, acetato de fluocinolona y dexametasona (Grover et al., 2008; Yilmaz et al., 2009; Gillies et al., 2011). Cuando se aplican en combinación con agentes anti-VEGF, fotocoagulación o cirugía pueden mejorar significativamente la agudeza visual y el grosor de la retina. Aún así, su administración conlleva los riesgos asociados a las inyecciones intravitreales repetidas y la posibilidad de aumentar la presión intraocular (García Fernandez et al., 2011).

Es claro que el mayor conocimiento acerca de factores capaces de regular la angiogénesis ocular permitirá el desarrollo de terapias complementarias más efectivas y cautelosas. Al respecto se investiga el potencial terapéutico de otras moléculas con efectos antiangiogénicos que de manera natural se encuentran en el ojo. Por ejemplo, el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), una glicoproteína de 50 kDa producida por el epitelio pigmentario de la retina que es considerado el principal inhibidor de la angiogénesis en la córnea, el vítreo y la retina (Stellmach et al., 2001). Se han reportado algunos otros factores con acciones anti-angiogénicas oculares que son fragmentos de proteínas que por sí mismas carecen de esta actividad y que incluyen a la angiostatina, que es un fragmento interno del plasminógeno (Spranger et al., 2000); a la endostatina, fragmento C-terminal de la colágena tipo XVIII (Funatsu et al., 2003); y en este trabajo nosotros investigamos el efecto del tratamiento con vasoinhibinas mediante una estrategia de terapia génica con virus adenoasociados del serotipo 2.

2.5.1 Terapia génica

La terapia génica es una de las estrategias terapéuticas más importantes desarrollada por la ciencia médica durante las últimas dos décadas (Flotte, 2007), consiste en la transferencia de un gen terapéutico o de una parte de él mediante el uso de un vector con el propósito de modificar o corregir funciones celulares para el tratamiento de enfermedades congénitas o adquiridas (Stieger y Lorenz, 2010). El desarrollo de una estrategia de terapia génica requiere la consideración de cuatro elementos: la enfermedad que se desea tratar, el gen terapéutico, el vector que se desea emplear y las células o tejidos blanco.

Los vectores virales son, en gran medida, más eficientes para introducir el gen terapéutico a las células pues aprovechan las estrategias desarrolladas evolutivamente por los virus para infectar las células. Este tipo de vectores son diseñados de tal manera

que no se puedan replicar pero conservando las propiedades que permiten la expresión de los genes que portan. Los virus empleados en los protocolos de terapia génica incluyen a los retrovirus, los adenovirus, los virus adenoasociados y el virus del herpes simple (Robbins et al., 1998).

2.5.1.1 Virus adenoasociados

Los virus adenoasociados (AAV) son considerados como uno de los sistemas de transferencia génica más populares, principalmente por su capacidad de transducir varios tipos celulares en diversos tejidos (hígado, músculo, retina y el sistema nervioso central) e inducir la expresión eficiente del transgén a largo plazo (Lundstrom, 2003). Los AAV pertenecen a la familia *Parvoviridae* y al género *Dependovirus* y fueron identificados en la década de los 60 como un contaminante en una preparación de adenovirus (Atchison et al., 1965), de ahí su nombre. Hasta el momento se han reportado 12 serotipos de AAV en humanos (AAV1 - AAV12) y, aproximadamente el 80% de la población posee niveles detectables de anticuerpos anti-AAV contra los serotipos 1, 2, 3 y 5 (Henckaerts y Linden, 2010). Se sabe muy poco de su mecanismo de infección *in vivo* pues hasta el momento no se ha podido correlacionar alguna patología con la infección por estos virus. Por medio de experimentos *in vitro* se conoce que los AAV no pueden replicarse por sí mismos y que requieren de la presencia de un virus colaborador como un adenovirus o el virus del herpes simple para poder hacerlo (Schlehofer et al., 1986).

Los AAV son virus pequeños (22-25 nm) cuya cápside tiene una geometría icosaédrica y no poseen envoltura. Su genoma consiste de una cadena sencilla y lineal de DNA de aproximadamente 4.7 kilobases dividida en tres regiones funcionales: dos marcos de lectura abiertos (ORF; *rep* y *cap*) y las secuencias repetidas terminales invertidas (ITR) (Figura 6). Las ITR son secuencias multipalindrómicas ubicadas en los extremos del genoma viral que se doblan sobre sí mismas y por apareamiento de bases

complementarias forman una “T” (Figura 6), funcionan como origen de replicación y juegan un papel importante en la integración del genoma viral en la célula huésped. Los AAV silvestres tienen la capacidad de insertarse de manera específica en el cromosoma 19q13.4 (Daya y Berns, 2008).

El ORF *rep* codifica para una familia de proteínas multifuncionales (Rep) involucradas en la replicación, transcripción, integración y encapsidación del genoma viral, en tanto que el ORF *cap* codifica para las tres proteínas que constituyen la cápside VP1, VP2 y VP3, que se ensamblan en una relación molar 1:1:10 respectivamente (Coura y Nardi., 2007).

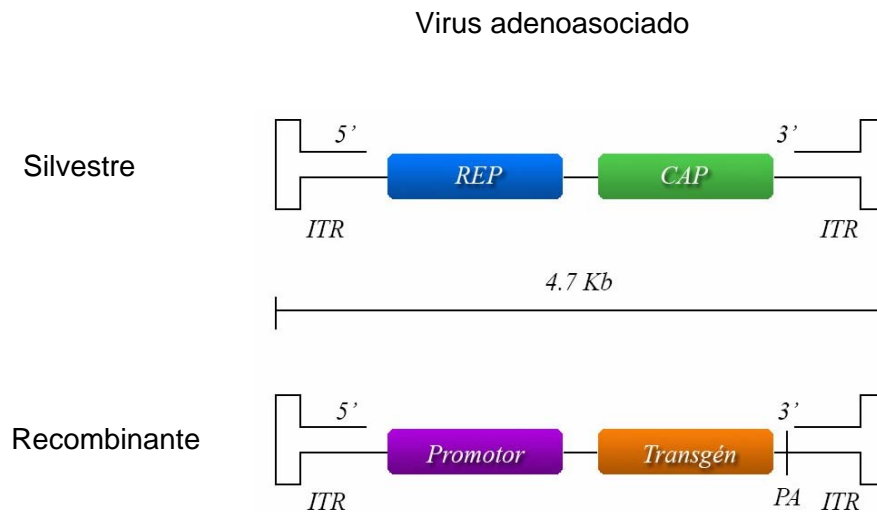


Figura 6. Esquema de la estructura del genoma de los virus adenoasociados. El genoma de un virus adenoasociado silvestre tiene una longitud aproximada de 4.7 kb y consiste de dos marcos de lectura abiertos, *rep* y *cap*, que codifican para las proteínas de la replicación y de la cápside, respectivamente. Estas secuencias están flanqueadas por las secuencias terminales repetidas (ITR). Los vectores recombinantes se generan sustituyendo las secuencias *rep* y *cap* por un promotor y el transgén de interés. PA = sitio de poliadenilación.

Los AAV recombinantes (rAAV) se generan eliminando los ORFs y en su lugar se coloca el transgén de interés junto con los elementos regulatorios necesarios para su expresión, los ITRs son los únicos elementos virales presentes en el vector (Henckaerts y Linden, 2010). Los rAAV no pueden replicarse ni integrarse de manera sitio-específica porque no poseen las proteínas virales necesarias, por lo que persisten principalmente en la célula como elementos extra cromosómicos (episomas) (Daya y Berns, 2008).

La mayoría de los rAAV probados hasta ahora en ensayos clínicos son basados en el serotipo 2 (AAV2), los vectores AAV2 pueden transducir músculo, hígado, cerebro, pulmones y retina. El receptor de superficie celular primario para el anclaje de los viriones AAV2 son los proteoglicanos de heparan sulfato. Otras moléculas que actúan como co-receptores y ayudan en la internalización son los heterodímeros de integrina $\alpha_v\beta_5$, el receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos, el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos y el receptor de la laminina (Goncalves, 2005; Daya y Berns, 2008).

2.5.1.1.1 rAAV2 para el tratamiento de padecimientos oculares

En particular, el ojo es un órgano con características que lo hacen un buen candidato para emplear la terapia génica: es una estructura accesible, pequeña y compartimentalizada por lo que requiere una menor dosis para obtener el efecto deseado. Además, se pueden emplear diferentes rutas de administración de acuerdo a la zona o el tipo celular que se desee transducir y la presencia de las barreras hematoretiniana interna y externa ayudan a limitar la posible diseminación sistémica del vector o del transgén contribuyendo así a evitar la generación de una respuesta inmune (Colella et al., 2009).

El mejor ejemplo del uso potencial de los rAAV2 administrados intraocularmente es su utilización en el tratamiento de pacientes con amaurosis congénita de Leber (LCA). El 10% de los casos de LCA son a causa de mutaciones en el gen *RPE65*, la deficiencia en

el producto de este gen ocasiona una distrofia de la retina que eventualmente produce ceguera en la adultez temprana. Tres estudios clínicos fase I independientes muestran que el tratamiento con una sola inyección subretinana de un vector AAV2 que contiene el cDNA de RPE65 produce una mejora permanente en las mediciones objetivas y subjetivas de la visión y que no posee efectos colaterales adversos a nivel ocular y sistémico (Bainbridge et al., 2008; Hauswirth et al., 2008; Maguire et al., 2008; Cideciyan et al., 2009; Maguire et al., 2009; Jacobson et al., 2011).

La terapia génica con rAAV2 para el tratamiento de padecimientos oculares neovasculares se presenta como una buena estrategia para suministrar genes que codifican para factores antiangiogénicos o inhibidores de la acción de factores proangiogénicos específicos involucrados en este tipo de enfermedades, para que puedan ser expresados en la retina de manera sostenida después de administrarlos mediante una sola inyección intraocular (Colella y Auricchio, 2010).

En este trabajo de tesis evaluamos el potencial terapéutico de la administración intravitreal de un rAAV2 que contiene el cDNA que codifica una vasoinhibina humana en la prevención del aumento de la permeabilidad vascular en la retina de ratas tratadas con VEGF y en ratas diabéticas.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Trabajo reciente muestra que las vasoinhibinas derivadas de la proteólisis de la PRL pueden bloquear alteraciones vasculares en la retina asociadas a la diabetes. Estos hallazgos abren dos grandes interrogantes que fueron abordadas en este trabajo de tesis: (1) si la generación de vasoinhibinas intraoculares se puede regular en la diabetes y, (2), si la terapia génica con vasoinhibinas tiene valor potencial para el control de la retinopatía diabética. Así, por una parte, se analizó la presencia en el vítreo de la rata de metaloproteasas de matriz (MMP) capaces de generar vasoinhibinas a partir de PRL y si la actividad de dichas proteasas se regula por efecto de factores determinantes de la retinopatía diabética como el VEGF. Por otra parte, se evaluó si la inyección intravitreal de vectores recombinantes derivados de AAV2 capaces de transducir células de la retina e inducir la expresión de vasoinhibinas (AAV2-Vi) tienen efecto preventivo contra el aumento en la permeabilidad vascular que ocurre en el ojo de las ratas diabéticas o luego de la administración intravitreal de VEGF.

IV. HIPOTESIS

Hipótesis general

Las vasoinhibinas participan en el control fisiológico de la vascularización ocular y alteraciones en sus niveles pueden influir sobre los cambios microvasculares determinantes de la RD.

Hipótesis particulares

1. MMP presentes en el vítreo generan y degradan vasoinhibinas durante la retinopatía diabética.
2. La administración intravítreal de AAV2-Vi previene el incremento en la permeabilidad vascular retiniana debido a la diabetes o al tratamiento intraocular con VEGF.

V. OBJETIVOS

I. Analizar si la actividad de proteasas intraoculares generadoras de vasoinhibinas se modifica en la RD.

- a) Evaluar la presencia de proteasas capaces de generar vasoinhibinas a partir de PRL administrada intravítrealmente. Determinar si dicha actividad se bloquea con inhibidores de MMP.
- b) Determinar si la actividad de las MMP generadoras de vasoinhibinas se modifica por acción de la administración intravítreal de VEGF.
- c) Evaluar la actividad de las proteasas generadoras de vasoinhibinas en ratas diabéticas inyectadas con estreptozotocina.

II. Evaluar el efecto de la inyección intravítreal de AAV2-Vi sobre el aumento de la permeabilidad vascular retiniana debido a:

- a) la administración intravítreal de VEGF o
- b) la diabetes inducida por estreptozotocina,

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En todos los experimentos se emplearon ratas Wistar macho (250 a 300 gramos) que fueron mantenidas y tratadas de acuerdo al manual de organización y procedimientos del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM y las normas de la declaración para el uso de animales en la investigación oftalmológica y de la visión de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) de EUA.

Inyección intravítreal

Los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal (ip) de una solución de ketamina 70% y xilacina 30% (1 μ l/g peso corporal). La inyección intravítreal de las diversas sustancias empleadas se realizó de acuerdo al método previamente descrito (Aranda et al. 2005). Brevemente, se sujetó el ojo de la rata anestesiada y 2 mm por debajo del limbo esclerocorneal se introdujo una aguja hipodérmica calibre 27 para realizar un orificio que permitiera introducir la aguja de una microjeringa Hamilton que contenía las diversas preparaciones a inyectar en el ojo.

Proteólisis de la PRL en el vítreo de la rata

Se inyectaron intravítrealmente 5 μ g de PRL de rata (grado biológico suministrada por el Programa Nacional de Hormonas e Hipófisis (NHPP), Torrance, CA, EUA) sola o en combinación con 300 ng de VEGF recombinante humano (rhVEGF165, donado por Genentech, South San Francisco, CA) solo o en combinación con el inhibidor de MMP, Galardina 10 μ M (GM6001, Calbiochem, Merck Darmstadt, Alemania). El volumen final inyectado fué de 4 μ l y el vehículo fue una solución amortiguada de fosfatos (PBS) pH 7.4. Los animales se sacrificaron 30 minutos o 6 horas después de la inyección y los productos de la proteólisis de la PRL se analizaron en los vítreos mediante Western blot. La preparación estándar de vaso-inhibinas se generó por proteólisis enzimática de la PRL

de rata utilizando un extracto de la glándula mamaria de la rata, seguida por filtración en gel y carbamidometilación de acuerdo al método previamente descrito (Clapp et al., 1987). Se utilizaron anticuerpos policlonales anti-PRL (C-1) o anti-vasoinhibinas y anticuerpos monoclonales anti-PRL (INN-1, INN-368) previamente caracterizados (Dueñas et al., 2004; Aranda et al., 2005). Los anticuerpos INN-1 e INN-368 fueron donados por el Dr. Peter Berger (Academia Nacional de Ciencias de Austria, Innsbruck, Austria).

Inducción de diabetes en la rata con estreptozotocina

La inducción de diabetes experimental en la rata empleando sustancias químicas capaces de destruir selectivamente las células beta del páncreas, como la estreptozotocina, es un procedimiento simple y eficiente (Lenzen, 2008). Luego de ayunar a las ratas toda la noche, se indujo diabetes por la mañana mediante la inyección intraperitoneal de una solución de estreptozotocina (STZ, 60 mg/kg de peso corporal; Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) en solución amortiguada de citratos, pH 4.5. Cuarenta y ocho horas después se determinaron los niveles de glucosa sanguínea y se consideraron diabéticos aquellos animales con valores de más de 250 mg/dl (Navaratna et al. 2007).

Construcciones de los plásmidos y producción de los AAV recombinantes (rAAV)

El cDNA de la PRL humana, amplificado mediante PCR a partir de una construcción preexistente, se digirió usando BamHI y NotI y clonó entre los sitios BamHI y NotI del vector pcDNA3. El cDNA de una vasoinhibina humana (codones 1-142 de la PRL humana) se amplificó a partir de una construcción modificada en la cual el codón 58 fue cambiado de una Cys a una Ser. La amplificación introdujo un codón de paro en la posición 143. El producto fue clonado en el plásmido pcDNA3 de la misma manera que para el de PRL. Se empleó también el cDNA completo que codifica para el sFlt-1 humano

y la proteína verde fluorescente (GFP). Todas las construcciones fueron secuenciadas, verificándose que no tuvieran errores provocados por la PCR. Como se muestra en la figura 7, las construcciones introducidas en el genoma del vector AAV2 contienen el transgen de interés río abajo del promotor inmediato del citomegalovirus (CMV) y de un intron quimérico del CMV y la β -globina, y río arriba del sitio de poliadenilación de la β -globina humana (Figura 7). Las partículas de AAV2 recombinantes fueron producidas por el método de triple transfección y purificadas por precipitación con polietilenglicol seguida de una centrifugación fraccionada en gradiente de densidad con cloruro de cesio de acuerdo al método previamente descrito (Grimm et al., 2003). Los vectores purificados fueron formulados en Tris-HCl 10 mM, NaCl 180 mM, pH 7.4 y almacenados a -80°C hasta el momento de usarlos. Las preparaciones de los vectores fueron examinadas mediante SDS-PAGE para verificar la pureza y por DLS (dynamic light scattering) para examinar su estado de agregación. La cuantificación de los vectores se hizo mediante PCR en tiempo real usando plásmidos estándar linearizados.

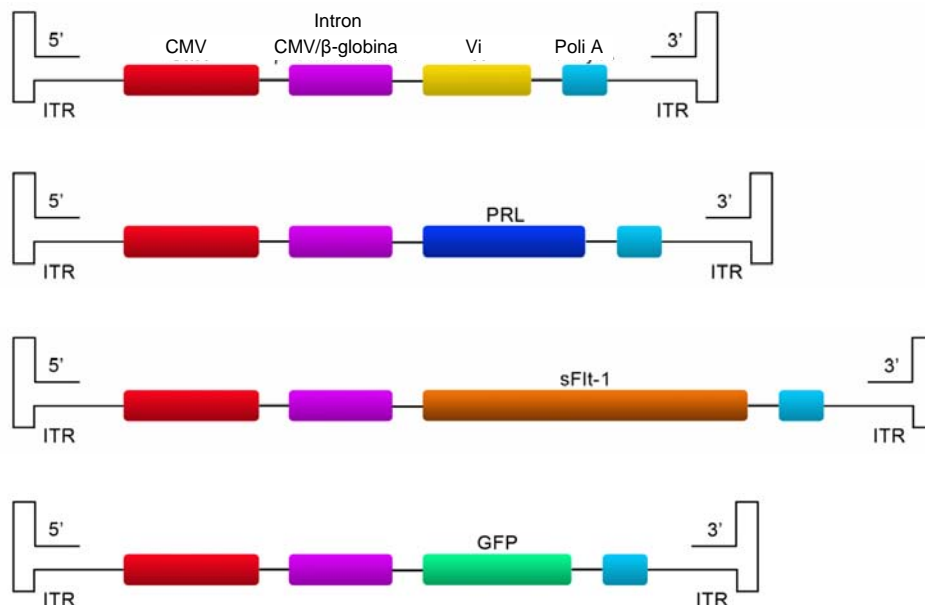


Figura 7. Esquema que ilustra la estructura de los AAV2 recombinantes compuesta por el promotor del citomegalovirus (CMV), un intrón quimérico CMV- β -globina humana, el transgén de interés (Vi, PRL, sFlt-1 o GFP) y el sitio de poliadenilación de la β -globina humana (Poly-A). Secuencias repetidas terminales invertidas (ITR). Los diversos vectores fueron empaquetados en cápsides del serotipo 2.

Análisis de la transducción por rAAV In vitro

Las células HEK293 fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) complementado con 1% penicillina-estreptomicina, 1% fungizona, y 10% suero fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, EUA). Se sembraron 9×10^4 células HEK293 por pozo en placas de 24 pozos. Las células fueron tratadas con 1.4×10^{11} genomas de vector (vg) AAV2 (MOI de 1.5×10^6) conteniendo cada uno de los transgenes o con el vehículo, en presencia de etoposide (Sigma.Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) a una concentración final de 2.5 nM. Luego de 16 horas de incubación las células se lavaron con PBS y se colocaron en medio fresco. Veinticuatro horas después se colectó el medio condicionado y las células fueron lisadas para evaluar la expresión y secreción de las proteínas codificadas en los transgenes mediante RT-PCR y Western blot, respectivamente. Para obtener el lisado celular las HEK293 tratadas con los diferentes vectores o con el vehículo se homogenizaron en 100 μ l de buffer de lisis (50 mM Tris pH 7.4, 0.5% Igepal, 100 mM NaCl, 1 μ g/ μ l aprotinina, 0.5 mM PMSF) y se centrifugaron para eliminar los restos celulares (12,000 X g por 10 min at 4°C). Para el análisis mediante Western blot se empleó el volumen correspondiente a 20 μ g de proteína total del lisado celular o 15 μ l del medio condicionado.

Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El RNA total de las células HEK293 y de los lisados de retinas tratadas con los diversos vectores o con el vehículo se extrajo y se purificó por el método de isotiocianato de guanidina empleando el reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA se incubó con DNasa para eliminar la posible contaminación con el DNA del vector AAV2 y se analizó mediante RT-PCR y electroforesis en geles de agarosa por el método previamente descrito (Aranda et al., 2005). La detección del cDNA de la PRL y vasoinhibinas humanas se realizó empleando

los oligonucleotidos CTG CCC GAT GCC AGG TGA (sentido) y GAA AGT CTT TTT GAT TCA TCT GT (antisentido) que generan un producto de 219 pares de bases (pb). Estos oligonucleotidos corresponden a una secuencia presente tanto en la PRL como en las vasoinhibinas humanas y se verificó que no amplifican a la PRL endógena. Los parámetros de amplificación usados fueron 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C, y 30 segundos a 72°C por 35 ciclos. Los oligonucleotidos empleados para amplificar al sFlt-1 humano fueron GAC CTG GAG TTA CCC TGA TGA (sentido) y ATG GTC CAC TCC TTA CAC GAC (antisentido), bajo una temperatura de alineamiento de 61°C y 30 ciclos, generan un producto de 159 pb. Para la actina se usaron los oligonucleotidos CCA TCA TGA AGT GTG ACG TTG (sentido) y ACA GAG TAC TTG CGC TCA GGA (antisentido) a una temperatura de alineamiento de 58°C por 26 ciclos que generan un producto de 173 pb.

Western blot

Volúmenes apropiados de la muestra o de la proteína estándar se mezclaron en relación 1:1 con buffer Laemmli 2X en condiciones reductoras y se incubaron a 100°C por 5 minutos. Las preparaciones se analizaron en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa que fueron bloqueadas con leche en polvo sin grasa al 4% por 1 hora y luego se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-PRL humana previamente caracterizado (HC-1, Dueñas et al., 2004) o bien con el anticuerpo monoclonal anti-sFlt-1 humano (ab9540; Abcam Inc., Cambridge, MA, EUA) en una dilución 1:500 en PBS-Tween 0.05% durante toda la noche. La detección se realizó incubando las membranas con anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina en una dilución 1:5000 en PBS-Tween 0.05% por 2 horas y revelando la reacción mediante el uso de un estuche comercial de detección colorimétrica (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Deglicosilación de proteínas

La deglicosilación de las proteínas presentes en el medio condicionado por las células HEK293 transducidas con los vectores AAV2-PRL y AAV2-Vi se llevó a cabo usando la enzima N-glicosidasa F (New England BioLabs, Ipswich, MA, EUA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron 5 μ l de medio condicionado con 5 μ l de buffer desnaturizante (5% SDS, 0.4M DTT) a 100°C por 10 minutos. Se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se adicionaron 4 μ l de agua desionizada, 2 μ l de buffer de fosfato de sodio 0.5 M (pH 7.5), 2 μ l de 10% NP-40 y 1 μ l (500 U) de N-glicosidasa F. La mezcla de reacción se incubó nuevamente a 37°C durante 1 hora. Se tomaron 10 μ l de dicha mezcla y se analizaron mediante SDS-PAGE-Western blot.

Análisis de la transducción por rAAV in vivo

En cada ojo, se inyectaron 2 μ l conteniendo 2.8×10^{10} vg de cada uno de los AAV2, o bien 2 μ l de vehículo. Un mes después, un grupo de animales se anestesió introduciéndolo en una cámara de inhalación saturada de CO₂ para luego ser sacrificado por decapitación. La expresión de las proteínas codificadas por los vectores se evaluó mediante RT-PCR en extractos de retinas. Además, la expresión y localización de los transgenes se evaluó utilizando como modelo el vector AAV2-GFP a través de la visualización directa de la fluorescencia de la GFP en montajes planos de retina o en secciones sagitales de retinas mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti-GFP (ab6556, Abcam Inc., Cambridge, MA, EUA).

Localización de las células transducidas por el AAV2-GFP en la retina

La fluorescencia de la GFP fué visualizada directamente en montajes planos de retinas previamente fijadas por 30 minutos en paraformaldehído al 4% y montadas en

medio Vectashield (Vector laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA) como ya ha sido descrito (Martin et al., 2002). También se realizó la detección de la GFP por inmunohistoquímica en cortes sagitales de la retina. Las retinas fueron fijadas en paraformaldehído al 4% durante 30 minutos, lavadas y colocadas en una solución de sacarosa al 20% y al 30% en PBS (24 horas en cada caso). El tejido fué incluido en medio tissue-tek y congelado para luego hacer cortes sagitales en el crióstato de 12 μ m de espesor que fueron montados en portaobjetos. Los cortes fueron bloqueados con una solución que contenía 1% de albumina sérica de bovino, 1% de suero normal de cabra y 0.1% de Triton X-100 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y luego incubados con una dilución 1:100 del anticuerpo policlonal anti-GFP (ab6556, Abcam Inc., Cambridge, MA, EUA) durante toda la noche a 4°C. Después de lavar el anticuerpo primario, los cortes se incubaron con una dilución 1:1000 del anticuerpo Alexa fluor 546 anti-IgG de conejo (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) durante 2 horas a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo se lavó y las preparaciones se montaron con Vectashield. Las preparaciones de montajes planos y cortes de retina se observaron con un microscopio confocal LSM 510 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemania). Se tomaron fotografías a las magnificaciones 25X y 40X.

Angiografía retiniana con fluoresceína

Los animales fueron inyectados intravitrealmente con AAV2-Vi o con el vehículo del vector. Un mes después ambos grupos de animales fueron inyectados intravitrealmente con 300 ng de VEGF (VEGF165 recombinante de humano, obsequio de Genentech, San Francisco, CA, EUA) en 2 μ l de PBS o solamente con PBS y 24 horas más tarde se evaluó la permeabilidad en los vasos de la retina mediante la técnica de fluorangiografía de acuerdo al método descrito (Li et al., 2009). Brevemente, los animales

se anestesiaron y se inyectaron intrayugularmente con 100 mg/kg de peso corporal de dextran marcado con isotiocianato de fluoresceína (50 mg/ml, FITC-Dextran peso molecular 2×10^6 ; Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA). Una hora después las ratas se sacrificaron y se hicieron montajes planos de las retinas que fueron fijados en paraformaldehído al 4% durante 4 horas a temperatura ambiente. Luego de lavar 3 veces con PBS, las retinas se colocaron en portaobjetos usando una solución de glicerol al 50% en PBS como medio de montaje. Las preparaciones se observaron y fotografiaron bajo un aumento de 4X empleando un microscopio de fluorescencia Olympus BX60 con una cámara Olympus DP70 adaptada. La intensidad total por área de la señal de fluorescencia se cuantificó mediante el software Image Pro-Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) y los valores se normalizaron tomando como referencia la intensidad total promedio de un grupo de retinas normales sin tratamiento. El área hemorrágica observada en las imágenes en campo claro de los montajes planos de retina se cuantificó con ayuda del escáner digital ScanScope y el software Color-Deconvolution (Aperio Technologies, Inc. Vista, CA, EUA).

Cuantificación de la permeabilidad vascular retiniana por el ensayo del azul de Evans

Los animales fueron inyectados intravitrealmente con los diversos vectores recombinantes AAV2 (AAV2-Vi, AAV2-PRL, AAV2-sFlt-1) o el vehículo. Un mes después se indujo diabetes en un grupo de estos animales mediante la inyección ip de una dosis única de STZ, y un mes después se cuantificó la permeabilidad vascular en la retina mediante el ensayo del azul de Evans de acuerdo al método previamente descrito (Xu et al., 2001). Brevemente, las ratas fueron anestesiadas e inyectadas intrayugularmente con una solución del colorante azul de Evans (45 mg/kg, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA). Después de 2 horas se obtuvo una muestra de sangre (1 ml) por punción

intracardiaca para medir la concentración del colorante en plasma, y entonces las ratas fueron perfundidas a través del ventrículo izquierdo a presión fisiológica y a 37°C con PBS (pH 3.5). Las retinas se secaron en un sistema de centrifugación en vacío (SPD 1010 SpeedVac System, ThermoSavant, USA) por 5 horas, para luego determinar su peso seco. El colorante azul de Evans se extrajo de las retinas mediante la incubación del tejido con 100 µl de formamida (Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ, EUA) por 18 horas a 72°C. El extracto se centrifugó a 300,000 X g durante 60 minutos a 4°C. La absorbancia del sobrenadante se determinó a 620 nm empleando el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). La concentración del colorante en los extractos de retina se calculó a partir de una curva estándar de azul de Evans en formamida y los datos fueron normalizados por el peso seco de la retina, el peso corporal y la concentración plasmática del colorante.

Análisis estadístico

Los valores se expresaron como promedio \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se determinaron mediante una prueba de ANOVA seguida de una prueba t de Student no pareada de dos colas. El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el software SigmaStat 7.0 (SYSTAT). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para un valor de $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS

Parte 1. Estudio sobre la actividad de enzimas convertidoras de PRL a vasoinhibinas en el ojo y de su relación con el VEGF y la diabetes.

1.1 El ojo de la rata contiene enzimas capaces de procesar a la PRL hacia vasoinhibinas y éstas enzimas son más activas en presencia de VEGF

Para determinar si el ojo de la rata posee enzimas capaces de cortar a la PRL para generar vasoinhibinas en condiciones normales, se inyectó PRL intravítreamente y 6 horas después se analizó la presencia de vasoinhibinas en el vítreo de estos animales mediante Western blot. Los resultados mostraron la presencia de una proteína inmunoreactiva que migra al nivel del estándar de vasoinhibinas. Esta proteína se generó a partir de la proteólisis de la PRL exógena puesto que no está presente en la preparación de PRL antes de inyectar (preparación estándar) y tampoco en la muestra de vítreo obtenida de ojos no inyectados con PRL (Fig. 8A). Cuando la PRL fue inyectada en conjunto con VEGF, el principal promotor de los efectos vasculares patológicos que se observan en la RD, se observó una marcada disminución en la cantidad de PRL y la ausencia (Fig. 8A) o reducción (Figura 8B) de las vasoinhibinas a niveles apenas detectables. Estos efectos del VEGF fueron estadísticamente significativos cuando se valoró la densitometría de la PRL y de las vasoinhibinas en 3 experimentos diferentes (Fig. 8B).

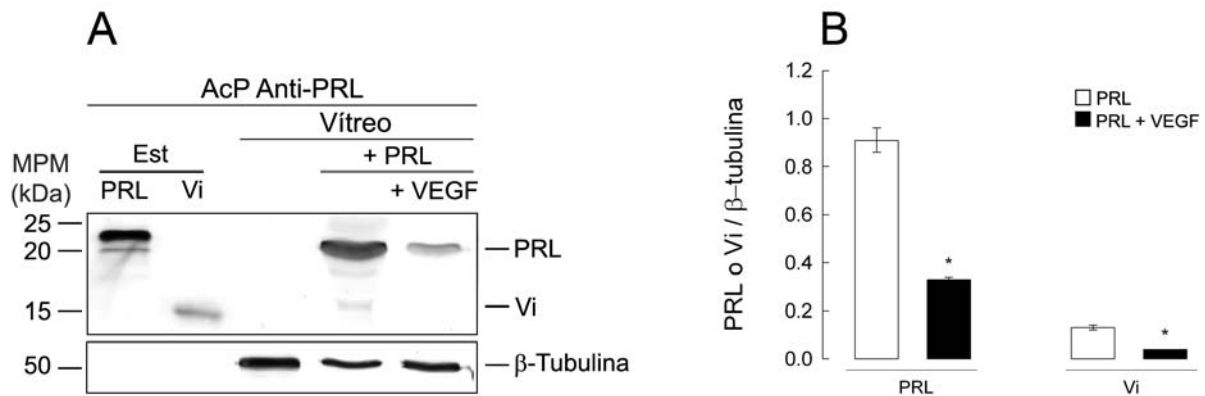


Figura 8. (A) Análisis mediante Western blot de los productos de la proteólisis de la PRL inyectada en el vítreo de la rata, sola o en combinación con VEGF empleando un anticuerpo policlonal anti-PRL (AcP anti-PRL). El vítreo fué obtenido 6 horas después de la inyección, también se incluyó una muestra de vítreo obtenida de un ojo no inyectado. Se empleó la β -tubulina como control de carga, así como preparaciones estandar de PRL y Vi (Est). Los números a la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular (MPM). (B) Análisis densitométrico de las bandas de PRL y Vi normalizadas contra la intensidad de la β -tubulina correspondiente. Las barras representan promedio \pm EE de tres experimentos diferentes. * $p < 0.05$ vs PRL.

1.2 El VEGF activa MMP en el vítreo de la rata capaces de cortar a la PRL hacia Vi

La disminución de la PRL y de las vasoinhibinas por efecto del VEGF podría sugerir el que dicho factor promueve la degradación intraocular de ambas proteínas en el vítreo. Para intentar disminuir dicha degradación, optamos por reducir el tiempo de exposición de la PRL y del VEGF en el ojo de 6 horas a 30 minutos. Además, para validar su naturaleza de vasoinhibinas, revelamos la presencia de estos péptidos utilizando anticuerpos policlonales anti-PRL y anticuerpos policlonales y monoclonales anti-vasoinhibinas. Después de 30 minutos de la inyección intravitreal de la PRL, los anticuerpos anti-vasoinhibinas detectaron la presencia de estas proteínas en el vítreo y su concentración fue menor cuando la PRL se inyectó conjuntamente con el VEGF (Figura 9A). A este tiempo se detectaron vasoinhibinas de dos pesos moleculares diferentes, a saber de 16 y 17 kDa. En apoyo a la identidad de estos fragmentos como vasoinhibinas, ambas isoformas fueron detectadas por los anticuerpos anti-PRL (Figura 9B blot

izquierdo) y por un anticuerpo monoclonal dirigido contra el extremo N-terminal de la PRL, que es la región de la PRL presente en las vasoinhibinas (Fig. 9B, blot derecho). Existen reportes de que el VEGF puede inducir la activación de MMPs que son enzimas capaces tanto de procesar a la PRL hacia vasoinhibinas como de degradar a estas últimas (Macotela et al., 2006). Por ello quisimos evaluar si la inyección de PRL y VEGF en conjunto con un inhibidor específico de MMPs, la galardina, podía bloquear la generación y degradación de las vasoinhibinas. En apoyo a esta posibilidad, la administración de galardina previno la proteólisis de la PRL y de las vasoinhibinas inducida por el VEGF (Fig. 9B blot izquierdo).

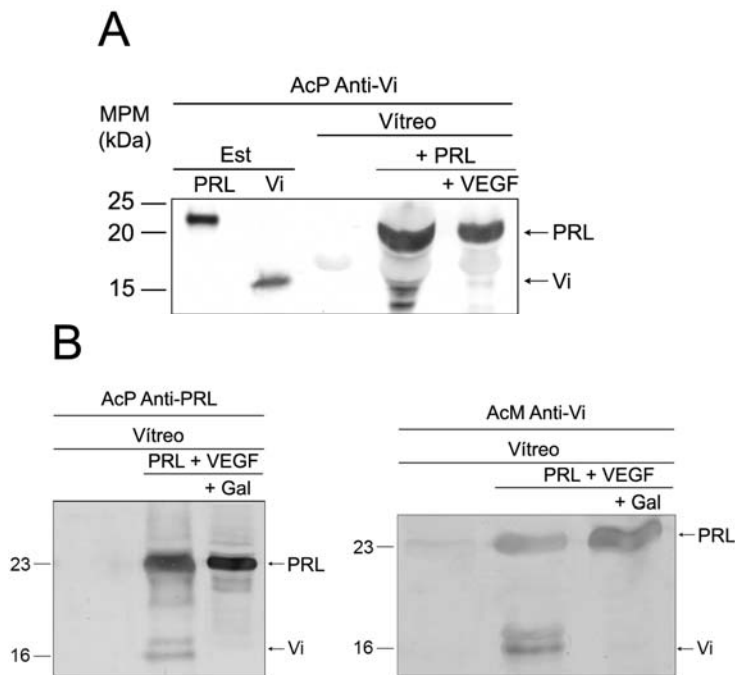


Figura 9. (A) Análisis por Western blot de los productos de la proteólisis de la PRL inyectada en el vítreo de la rata, sola o en combinación con VEGF empleando un anticuerpo policlonal anti-Vi. (B) Análisis por Western blot de los productos de la proteólisis de la PRL inyectada en el vítreo en combinación con VEGF o bien con VEGF y galardina. La inmunodetección se llevó a cabo empleando un anticuerpo policlonal anti-PRL (AcP anti-PRL) y con un anticuerpo monoclonal anti-vasoinhibinas (AcM anti-Vi), los números a la izquierda indican la posición de las preparaciones estandar de PRL y Vi en kDa. El vítreo fué obtenido y procesado por Western blot 30 minutos después de la inyección intravitreal. Se incluyó en el análisis una muestra el vítreo de un ojo no inyectado.

1.3 El procesamiento de la PRL a vasoinhibinas se incrementa en el ojo de ratas diabéticas

Para evaluar si el procesamiento de la PRL hacia vasoinhibinas se modifica en el ojo de ratas diabéticas, se indujo diabetes en ratas con estreptozotocina y luego de 6 semanas de diabetes se realizó la inyección intravítrea de la PRL. Después de 6 horas se colectaron las muestras de vítreo y se analizaron por Western blot empleando un anticuerpo policlonal anti-PRL (C2). Se encontró una mayor generación de vasoinhibinas en el vítreo de las ratas diabéticas en comparación con las que se generan en el vítreo de una rata normal (Fig. 10).

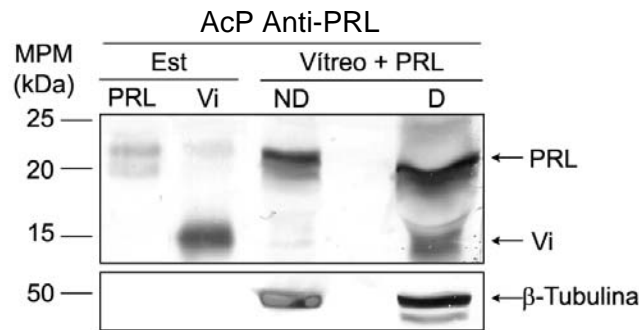


Figura 10. Análisis por Western blot de los productos de la proteólisis de la PRL inyectada en el vítreo de una rata no diabética (ND) o de una rata diabética con estreptozotocina (D) empleando un anticuerpo policlonal anti-prolactina. El vítreo fué obtenido y procesado por Western blot 6 horas después de la inyección.

Parte 2. Estudio sobre el efecto de la inyección intravítrea de AAV2-Vi sobre el aumento de la vasopermeabilidad retiniana debido al VEGF y a la diabetes.

2.1 Verificación de la expresión de los transgenes en las células HEK293

Se emplearon las células HEK293 para evaluar la capacidad de los vectores AAV2-PRL, AAV2-Vi y AAV2-sFlt-1 para inducir la expresión y secreción de las proteínas

codificadas por los transgenes. Los oligonucleótidos complementarios a una secuencia común presente en la PRL y las vasoinhibinas de origen humano, pero no de rata, amplificaron un producto único con el tamaño esperado de 219 pb en las muestras obtenidas de las células tratadas con los vectores AAV2-PRL y AAV2-Vi. Como era de esperarse, este producto no se observó en muestras de las células tratadas solamente con el vehículo del virus (Fig. 11).

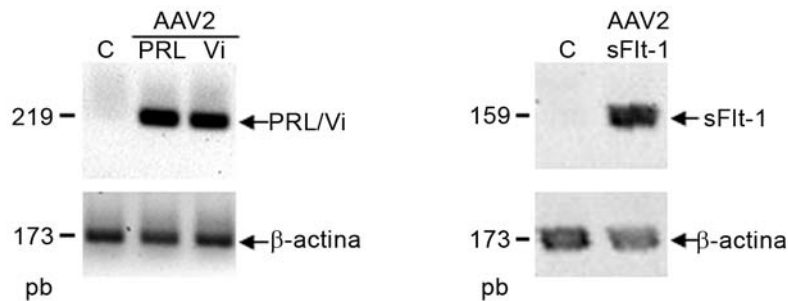


Figura 11. Análisis por RT-PCR del cDNA de las células HEK293 tratadas con el vehículo (C) o con los vectores AAV2-PRL, AAV2-Vi o AAV2-sFlt-1. El tamaño de los productos de amplificación está dado en pares de bases (pb), se empleó la amplificación de la β -actina como control.

El análisis de las muestras de medio condicionado y lisado de células transducidas por los vectores mostró las bandas inmunorreactivas esperadas de 23 kDa para la PRL y de 16 kDa para la vasoinhibina. Adicionalmente, en ambos casos se observaron bandas inmunorreactivas de un peso molecular mayor al predicho para los productos de la traducción (25 kDa y 18 kDa para los AAV2- PRL y AAV2-Vi, respectivamente) (Fig. 12A). Estas proteínas de mayor tamaño son el resultado de la N-glicosilación de la PRL y la vasoinhibina, ya que su movilidad se incrementó luego de incubar las muestras de medio condicionado con N-glicosidasa F, de tal suerte que después del tratamiento solamente se observaron las bandas de 23 y 16 kDa (Fig. 12B).

La N-glicosilación en el residuo Asn31 ocurre normalmente en una cierta proporción de las moléculas de PRL (Sinha, 1995), y esta modificación parece no tener efecto en la actividad biológica de las vasoinhibinas (Kim et al., 2003; Pan et al., 2004). Por otra parte, el ARNm del sFlt-1 se amplificó de las muestras de células tratadas con el AAV2-sFlt-1 (Fig. 11 der.), que también produjeron y secretaron una proteína con un peso de 82 kDa que corresponde a la masa molecular del sFlt-1 (Fig. 12C). Estos experimentos demuestran que todos los vectores son capaces de introducir los transgenes a las células de manera que se lleve a cabo la expresión y secreción de las proteínas codificadas en ellos.

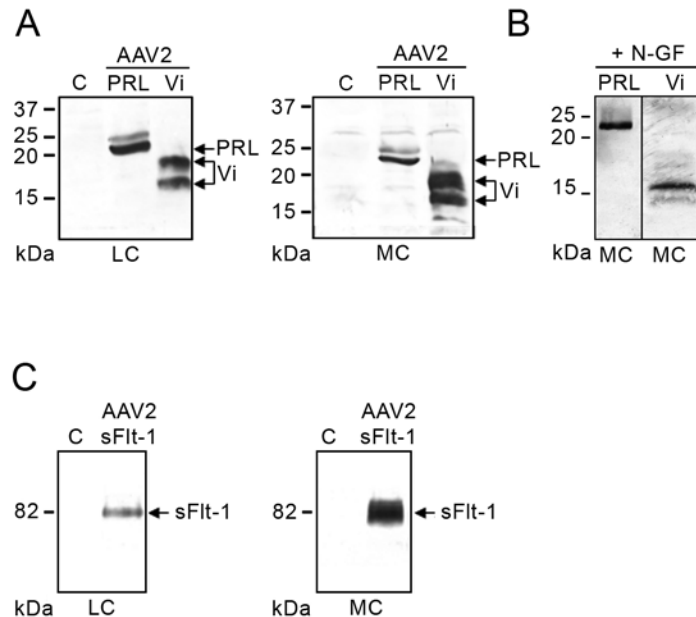


Figura 12. Análisis por Western blot en condiciones reductoras de los lisados celulares (LC) y el medio condicionado (MC) de las células HEK293 tratadas con los vectores (A) AAV2-PRL, AAV2-Vi y (C) AAV2-sFlt-1. (B) Análisis por Western blot del medio condicionado por las células HEK293 tratadas con los AAV2-PRL o AAV2-Vi que fue recolectado y luego incubado con la N-Glicosidasa (+N-GF). Los números a la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular en kDa.

2.2 Verificación y localización de la expresión de los transgenes en la retina

La expresión de los transgenes en las células de la retina se evaluó mediante RT-PCR. Para esto, el RNA total se extrajo de las retinas inyectadas con el vehículo (control) o con los diversos AAV2 y se incubó con DNasa para eliminar la posible contaminación con DNA genómico. En ningún caso se obtuvieron productos de amplificación en las muestras tratadas con DNasa sin transcriptasa reversa (resultados no mostrados). En las retinas transducidas con los vectores AAV2-PRL y AAV2-Vi se amplificó el producto correspondiente a la región compartida del cDNA de la PRL humana. Asimismo, se amplificó el cDNA para el sFlt-1 humano en las retinas de los ojos inyectados con el vector AAV2-sFlt-1 (Fig. 13A). No se detectó el mensajero de la PRL en las retinas de los ojos control o en aquellos tratados con el AAV2-sFlt-1, lo que confirma que los oligonucleotidos empleados no amplifican al transcrito de la PRL endógena (Fig. 13A). Tampoco se obtuvieron productos de amplificación con los oligonucleótidos para sFlt-1 en muestras de retinas tratadas con vehículo o con alguno de los otros dos vectores (Fig. 13A). Un mes después de la inyección intravitreal del AAV2-GFP, se evaluó la fluorescencia de montajes planos de retina y se observó señal fluorescente de la GFP en el soma y las proyecciones de las células ganglionares (Fig. 13B).

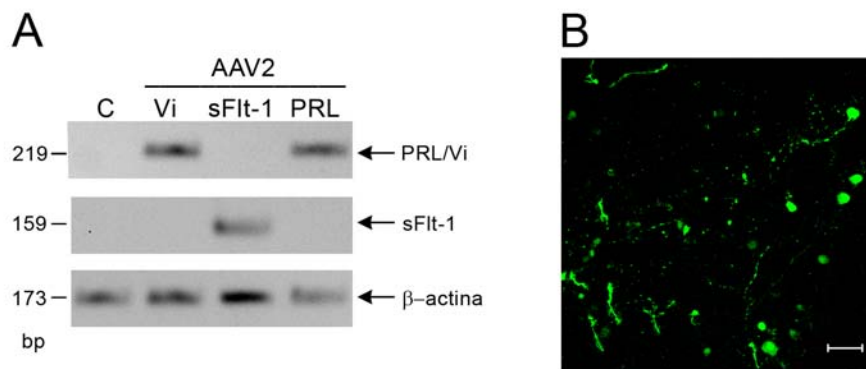


Figura 13. Verificación y localización de la expresión de los vectores AAV2-recombinantes en la retina. (A) Análisis por RT-PCR del cDNA de la vasoinhibina, sFlt-1 y la PRL en las retinas de rata obtenidas un mes después de la inyección intravitreal de los vectores AAV2-Vi, AAV2-sFlt-1 y AAV2-PRL. Los tamaños de los productos de la RT-PCR están dados en pares de bases (pb). Se empleó la amplificación de la β -actina como control. (B) Visualización directa de la fluorescencia de la GFP en las células ganglionares en un montaje plano de retina observada al microscopio confocal un mes después de haber sido inyectado el vector AAV2-GFP. La barra de calibración corresponde a 50 μ m.

También fué posible corroborar mediante inmunohistoquímica en cortes sagitales de la retina que células localizadas en la capa de células ganglionares son blanco de transducción de éste vector (Fig. 14C). No se observó señal positiva cuando se omitió la adición del anticuerpo anti-GFP (14B) o en los ojos de los animales control inyectados solamente con el vehículo (Fig. 14A). Con estos resultados se verificó que los diversos vectores AAV2 son capaces de transducir células de la retina y confirman reportes previos donde AAV2 administrados de manera intravitreal transducen principalmente células ganglionares (Hellström et al. 2009).

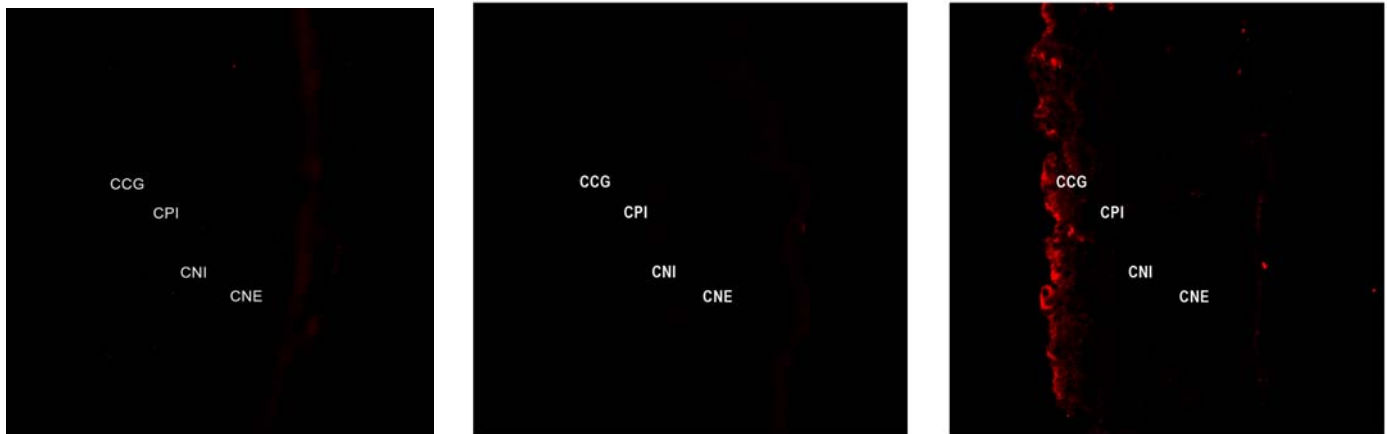


Figura 14. Confirmación de la expresión de la GFP en la capa de las células ganglionares mediante inmunohistoquímica en un corte representativo de la retina de rata obtenido un mes después de la inyección intravitreal del AAV2-GFP (C) observada en el microscopio confocal. (B) Un corte representativo en el que se omitió la adición del anticuerpo primario anti-GFP. En (A) se muestra que en la retina normal de la rata no hay señal positiva para GFP. CCG, capa de células ganglionares; CPI, capa plexiforme interna; CNI, capa nuclear interna; CNE, capa nuclear externa.

2.3 La inyección intravitreal del vector AAV2-Vi disminuye la vasopermeabilidad inducida por el VEGF en la retina

El VEGF es uno de los principales factores que inducen vasopermeabilidad en la retinopatía diabética (Caldwell et al., 2003). En este experimento se determinó si el aumento en los niveles de Vi mediante el AAV2-Vi protege contra el aumento de vasopermeabilidad inducida por una inyección intravitreal de VEGF. Un mes después de la administración del AAV2-Vi, las ratas recibieron una dosis intravitreal de VEGF o del vehículo del VEGF (PBS) y 24 horas después se evaluó la vasopermeabilidad retiniana. Por microscopía de campo claro se observó una apariencia normal de la retina de ojos inyectados con PBS (Fig. 15A) en tanto que el tratamiento con VEGF indujo hemorragias visibles en varias zonas de la retina (Fig. 15B). La inyección previa del AAV2-Vi previno casi en su totalidad las hemorragias (Fig. 15C). El análisis de las imágenes para cuantificar las zonas hemorrágicas normalizadas por el área total de cada retina mostró que el AAV2-Vi disminuyó un 95% las zonas de hemorragia inducidas por el VEGF (Fig. 15D). El efecto protector del AAV2-Vi también se evaluó mediante la extravasación del FITC-dextran debida al aumento de la vasopermeabilidad retiniana. El VEGF indujo una señal fluorescente intensa afuera de la vasculatura (Fig. 15F) claramente mayor a la que presentan las retinas no inyectadas con el VEGF (Fig. 15E) o en las retinas inyectadas con VEGF y transducidas con el vector de Vi (Fig. 15G). Al cuantificar la intensidad de la señal fluorescente por área se determinó que la inhibición de la permeabilidad por efecto del tratamiento con el AAV2-Vi corresponde a un 64% (Fig. 15H).

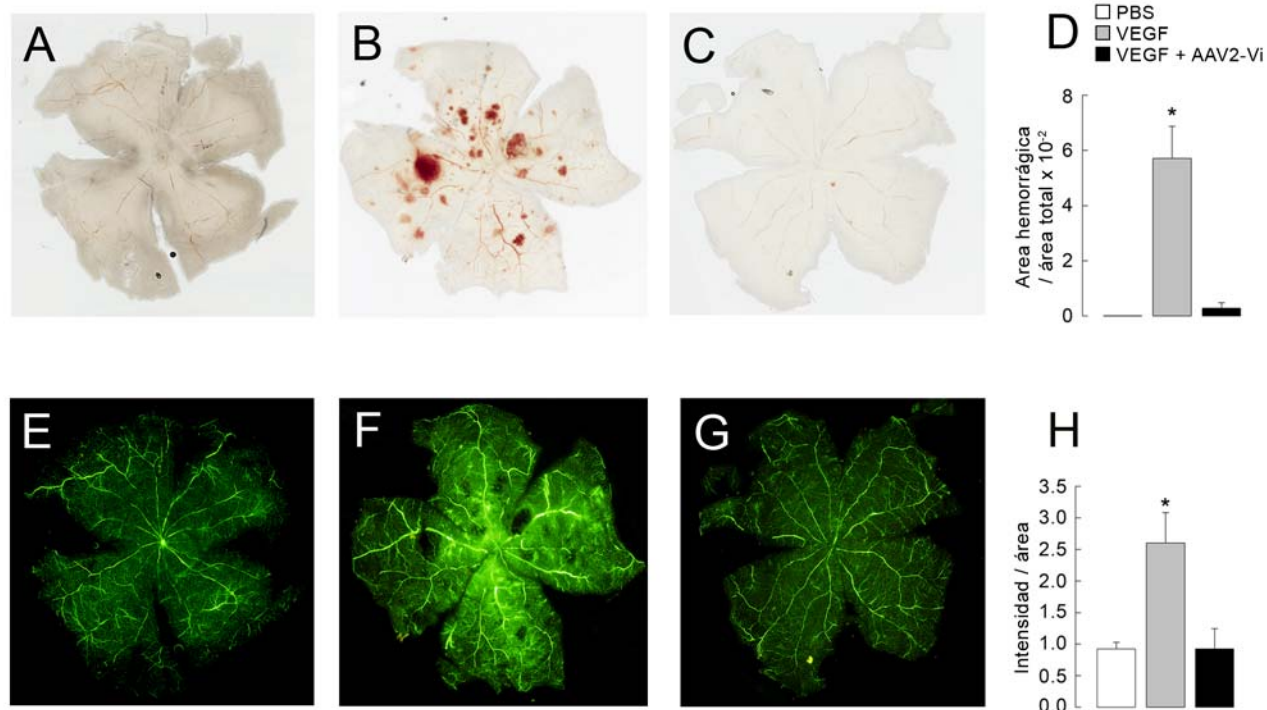


Figura 15. La inyección intravitreal del vector AAV2-vasoinhibina previene el aumento en la vasopermeabilidad de la retina inducido por VEGF. Imágenes representativas de montajes planos de las retinas de ratas que recibieron una inyección intravitreal de PBS (A, E) o de VEGF en PBS (B, C, F, G) un mes después de haber sido inyectadas (C, G) o no (A,B, E, F) con el vector AAV2-vasoinhibina (VEGF + AAV2-Vi). Veinticuatro horas después de la inyección intravitreal de PBS o VEGF los animales fueron perfundidos con FITC-Dextran. Montajes planos de retina vistas por microscopía en campo claro (A-C) y en fluorescencia (E-G) que ilustran la presencia de hemorragias y la extravasación del FITC-Dextran respectivamente. Se cuantificó el área hemorrágica (D) y la intensidad de señal fluorescente del FITC-Dextran (H) en tres y cinco retinas diferentes, respectivamente. Las barras representan promedio \pm EE; * $p < 0.05$ vs inyectadas con PBS o VEGF + AAV2-Vi.

2.4 El vector AAV2-Vi es capaz de prevenir el aumento en la vasopermeabilidad inducida por la diabetes en la retina

Para determinar el efecto protector del vector AAV2-Vi contra la vasopermeabilidad excesiva en la retina diabética, un mes después de la inyección intravitreal de los diversos vectores o del vehículo, se indujo diabetes en las ratas mediante el tratamiento con estreptozotocina. Cuatro semanas más tarde se cuantificó la permeabilidad vascular en la retina mediante el ensayo del azul de Evans. La diabetes indujo un aumento significativo

en la vasopermeabilidad retiniana en comparación a las ratas normales sin inyección intraocular o en aquellas inyectadas con el vehículo del vector (control) (Fig. 16). El tratamiento con el vector AAV2-Vi previno este incremento, en tanto que el vector AAV2-sFlt-1 lo redujo significativamente pero no lo bloqueó totalmente. El vector AAV2-PRL no tuvo efecto sobre la vasopermeabilidad retiniana inducida por la diabetes. Ninguno de los vectores modificó por sí mismo la vasopermeabilidad basal en las ratas no diabéticas.

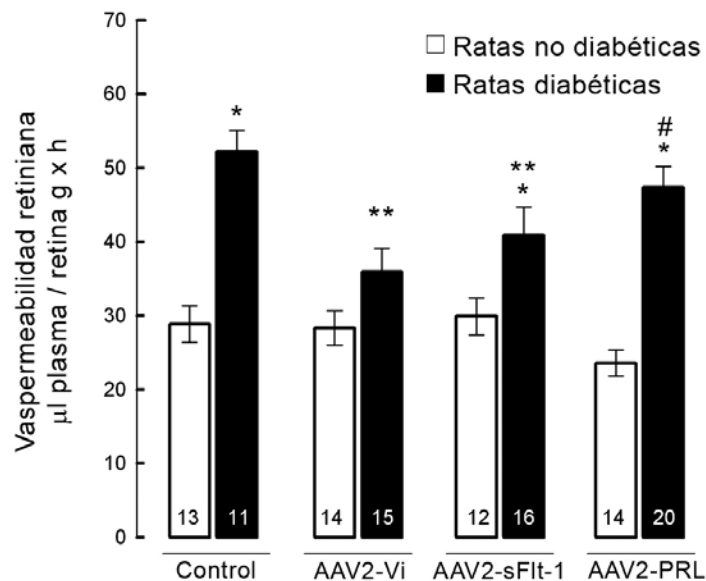


Figura 16. La inyección intravitreal del vector AAV2-Vi previene el aumento en la vasopermeabilidad retiniana en las ratas diabéticas. Evaluación de la vasopermeabilidad retiniana por medio del ensayo del azul de Evans en extractos de retinas de ratas no diabéticas o de ratas en las que se indujo diabetes con estreptozotocina un mes después de haber recibido una inyección intravitreal del vehículo del vector (Control) o de alguno de los vectores AAV2-Vi, AAV2-sFlt-1, o AAV2-PRL. Las barras representan promedio \pm EE. Los números al pie de cada barra corresponden al valor de n. * $p < 0.05$ vs. Ratas no diabéticas respectivas; ** $p < 0.05$ vs. Ratas diabéticas control; # $p < 0.05$ vs. Ratas diabéticas con AAV2-Vi.

VIII. DISCUSION

En la diabetes, la hiperglucemia crónica, la hipertensión arterial y el descontrol en los niveles de lípidos en la sangre contribuyen al daño microvascular que conlleva al desarrollo de la RD que es la principal causa de ceguera a nivel mundial en adultos en edad laboral. Algunas de las características que se observan en las etapas tempranas de la RD son la presencia de microaneurismas, un aumento en la permeabilidad vascular, el engrosamiento de la retina y la formación de exudados duros, todo ello conlleva a alteraciones en la visión, especialmente cuando la zona afectada es la mácula. Con el paso del tiempo estos eventos contribuyen a que se generen zonas de isquemia en la retina. La subsecuente hipoxia estimula la producción de factores proangiogénicos tales como el VEGF que a su vez promueven el rompimiento de la barrera hematoretiniana y la formación de nuevos vasos que ocasionan hemorragias en el vítreo, fibrosis y el desprendimiento de la retina por tracción del tejido fibrovascular y, por ende, ceguera (Kollias & Ulbig 2010). Los tratamientos actuales son aplicables solamente en los estados avanzados de la RD y si bien pueden preservar la visión tienen una baja eficiencia para revertir el daño. La fotocoagulación con láser continua siendo el tratamiento mas efectivo, sin embargo su carácter destructivo puede por si mismo reducir la agudeza y el campo visual (Wilkinson-Berka y Miler, 2008). Por su parte, la farmacoterapia intraocular con inhibidores del VEGF ha mostrado tener efectos benéficos (Cunningham et al., 2005; Chun et al., 2006; Iturralde et al., 2006; Elman et al., 2011; Mitchell et al. 2011), pero este tratamiento no es efectivo en todos los casos y frecuentemente requiere de inyecciones intraoculares repetidas con riesgo de efectos colaterales serios como el aumento de la presión intraocular y la endoftalmitis (Simó y Hernández. 2008).

Por todo lo anterior, es claro que los principales focos de la investigación científica de este campo se centran en el mejor entendimiento de los factores que participan en la

fisiopatología de la RD con el propósito de lograr nuevas modalidades terapéuticas efectivas y con menos riesgos colaterales para un segmento más amplio de la población.

Las vasoinhibinas son reguladores naturales de los vasos sanguíneos retinianos (Aranda et al., 2005) y se presentan como opciones terapéuticas potenciales en la RD (Clapp et al., 2008). Las vasoinhibinas inhiben la vasopermeabilidad y la angiogénesis en la retina en modelos experimentales de diabetes (Pan et al., 2004; Clapp et al., 2008; Arnold et al., 2010) y su concentración sistémica se encuentra reducida en los pacientes con retinopatía diabética (Triebel et al., 2009). En este trabajo de tesis investigamos si en la RD puede ocurrir una disminución en la generación de vasoinhibinas oculares y si la terapia génica con vasoinhibinas tienen la potencialidad de contrarrestar la vasopermeabilidad excesiva que caracteriza a este padecimiento, y por lo tanto puede ser desarrollada como una nueva herramientas terapéutica.

En la primera parte de este estudio evaluamos la presencia en el ojo de la rata de proteasas capaces de generar vasoinhibinas a partir de PRL y determinamos si su actividad se modifica por efecto de la administración intravitreal de VEGF, el principal promotor de la RD. Con este propósito inyectamos PRL o PRL + VEGF en el vítreo y analizamos la presencia de productos de su proteólisis en muestras de vítreo extraídas a diferentes tiempos. Encontramos que bajo condiciones normales (ausencia de VEGF) la PRL se procesa parcialmente hacia vasoinhibinas desde los treinta minutos y hasta las seis horas posteriores a su inyección intravitreal. Las enzimas responsables de dicho procesamiento son las MMP, ya que el corte de la PRL se bloqueó cuando junto con la PRL se inyectó en el ojo un inhibidor potente de amplio espectro de las MMP, la galardina (GM6001/Ilomastat). La galardina es un inhibidor de las MMP que fue diseñado como una molécula que mimetiza los sustratos naturales de las MMP lo que permite que esta molécula se una fuertemente al sitio activo que contiene el átomo de zinc de estas proteasas (Almholt et al., 2008). Importantemente, se ha demostrado que las MMPs

generan vasoinhibinas a partir de PRL a un pH fisiológico (Macotela et al., 2006). En apoyo a la identidad de estos fragmentos como vasoinhibinas fue posible detectarlos empleando un anticuerpo monoclonal que reconoce la región N-terminal de la PRL que está presente en las vasoinhibinas. La presencia de MMP en el vítreo capaces de generar vasoinhibinas apoya la posible generación intraocular de dichos péptidos bajo condiciones fisiológicas y por ende su contribución a la inhibición natural de la angiogénesis que caracteriza a la retina adulta y a otras estructuras oculares como el cristalino, la córnea y el propio vítreo (Aranda et al 2005).

En las condiciones de la RD, el incremento en la expresión de VEGF podría estar modificando la producción de vasoinhibinas intraoculares. Nuestros experimentos muestran que la proteólisis de la PRL inyectada intravitrealmente se incrementa en presencia de VEGF y dado que este efecto se inhibe por la coadministración de galardina, se infiere que el VEGF aumenta la generación de vasoinhibinas a través de la activación de MMPs intraoculares. Al respecto, se ha observado que el VEGF estimula la expresión de la MMP-9 en la línea celular 1A9 de carcinoma de ovario humano (Belotti et al., 2007); que el tratamiento con VEGF induce la secreción de pro-MMP7, pro-MMP9 y TIMP2 y la activación de la MMP2 en la línea celular de cáncer de epitelio ovárico DOV13 (Wang et al., 2006); y que el VEGF induce no solo la expresión sino también la actividad de la MMP-2 en un modelo de hipertrofia cardíaca en conejos (Friehs et al., 2006). Más aún, Ottino et al. (2004) demostraron que la hipoxia, que es el principal estímulo para la producción intraocular de VEGF, estimula de manera intensa la expresión y la actividad de la MMP-2 en las células endoteliales de la coroides y la retina del mono. El hecho de que el VEGF promueve la generación de vasoinhibinas a un tiempo corto (30 min) sugiere que el efecto involucra la activación de MMP existentes y no su síntesis de novo.

El VEGF es considerado como el principal responsable de las alteraciones vasculares que resultan en la progresión de la RD. La administración de anticuerpos

monoclonales anti-VEGF o de antagonistas del receptor de VEGF, previenen eficientemente la vasodilatación, vasopermeabilidad y neovascularización en la retina de modelos animales de RD (Caldwell, 2003). En particular, en el modelo de diabetes en la rata inducido por la inyección de estreptozotocina se reportó que los niveles oculares de VEGF se incrementan a partir de la primera semana después de la inducción de la diabetes (Qaum et al., 2001) y se mantienen elevados de manera más o menos constante hasta las 24 semanas (Zhang et al., 2005; Kusari et al., 2007; Kusari et al., 2010; Yu et al. 2010). Estos niveles incrementados de VEGF podrían contribuir al aumento en la producción de MMP intraoculares que tiene lugar en la diabetes. Pero además la expresión de dichas enzimas es estimulada por la hiperglucemia. Se sabe que altos niveles de glucosa estimulan la expresión y la actividad de las MMP 1, 2 y 9 en cultivos de células endoteliales (Kadoglou et al., 2005), en las células de músculo liso de la aorta (Hao y Yu, 2003) y en el plasma y el tejido vascular de ratón (Uemura et al., 2001). Interesantemente, la concentración de las MMP 2 y 9 está incrementada en la retina de ratas diabéticas con STZ (Giebel et al., 2005, Bhatt y Addepalli, 2010) y en el vítreo y las membranas fibrovasculares de pacientes con RDP (Noda et al., 2003).

De manera consistente con las observaciones de que tanto la hiperglucemia como los niveles elevados de VEGF en el ojo de las ratas diabéticas pueden estimular la expresión, secreción y activación de MMP, encontramos que cuando se inyectó la preparación de PRL en el ojo de las ratas diabéticas se observó una mayor cantidad de vasoinhibinas en comparación a la observada en el vítreo de animales no diabéticos. Si bien estos resultados apuntan a que durante la diabetes podría haber una mayor generación de vasoinhibinas oculares, también encontramos que 6 horas después de la administración intravítrea de PRL y de VEGF disminuye tanto la PRL como las vasoinhibinas recuperadas del vítreo con respecto al grupo control solamente inyectado

con PRL. Estos hallazgos deben ser caracterizados mayormente con la ayuda de inhibidores de MMP, pero sugieren que bajo ciertas condiciones oculares la activación de proteasas puede no solo generar a las vasoinhibinas sino también degradarlas. Esta posibilidad se apoya en estudios previos (Macotela et al., 2006) donde en experimentos in vitro se incubó a la PRL con diferentes concentraciones de varias MMP puras. Se encontró que concentraciones bajas y altas de estas enzimas generan y degradan a las vasoinhibinas, respectivamente. Por lo tanto, es factible proponer que la generación de vasoinhibinas o su degradación en la RD puede ser función de la temporalidad y/o magnitud de la producción y activación de MMP oculares. En relación a ello se ha reportado que en condiciones de RD el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), que es una de los principales factores antiangiogénicos, es degradado por las MMP-2 y 9 en el ojo (Notari et al., 2005). También cabe señalar que la habilidad de las MMP para generar vasoinhibinas intraoculares en la RD estaría influida por el grado de disponibilidad de su sustrato, la PRL. A este respecto, se ha mostrado que los niveles circulantes de PRL se incrementan en pacientes diabéticos con respecto a los no diabéticos y que este incremento es menor en aquellos pacientes con el grado mas avanzado de la RD (RDP) (Arnold et al., 2010). Dado que en la rata, la hiperprolactinemia resulta en niveles incrementados de vasoinhibinas en la retina (Arnold et al., 2010), es posible considerar que durante las fases iniciales de la diabetes, la hiperprolactinemia traería consigo un aumento en la disponibilidad de PRL lo que aunado a la mayor actividad de las MMP favorecería la generación de vasoinhibinas intraoculares capaces de contrarrestar la progresión del padecimiento. Eventualmente la disminución en los niveles circulantes de PRL y la posible sobreactivación de las MMP, asociada al agravamiento del padecimiento, se traducirían en la menor generación y mayor degradación de las vasoinhibinas oculares, respectivamente. Estas posibilidades están siendo evaluadas por experimentos en curso

que utilizan animales diabéticos bajo diferentes grados de progresión del padecimiento y en combinación con concentraciones elevadas de VEGF y otras sustancias vasoactivas.

En la segunda parte de esta tesis evaluamos la potencialidad de la terapia génica con vasoinhibinas para el tratamiento de la RD y el EMD. La retina posee características que la hacen particularmente adecuada para la terapia génica con vectores virales pues es un tejido fácilmente accesible por medio de una inyección intraocular intravitreal o subretiniana que puede acceder a las células de las capas internas o externas del tejido, respectivamente. Además, el ojo es un compartimento pequeño que gracias a la barrera hematorretiniana se encuentra relativamente aislado de la circulación sistémica. Esto permite el empleo de dosis pequeñas y limita su diseminación sistémica.

Los vectores de AAV son herramientas muy atractivas para su uso en la terapia génica ocular porque poseen una baja inmunogenicidad, pueden transducir eficientemente varios tipos celulares en la retina e inducir la expresión del transgén de interés a largo plazo luego de una sola inyección (Colella et al., 2009). La seguridad y eficacia en el uso de los vectores de AAV en la retina ha sido evaluada en varios modelos animales y más recientemente en humanos (Colella y Auricchio, 2010). Hasta el momento, las moléculas antiangiogénicas probadas para el tratamiento de padecimientos neovasculares en el ojo mediante una inyección intraocular de vectores AAV incluyen al sFlt-1 (Lai et al., 2005; Ideno et al., 2007), al PEDF (Mori et al., 2002), a la angiostatina (Shyong et al., 2007), a la endostatina (Auricchio et al., 2002) y al inhibidor tisular de metaloproteasas-3 (TIMP-3) (Auricchio et al., 2002). El presente trabajo es el primero que examina los efectos de la terapia génica con vasoinhibinas por medio de un vector AAV2 en la RD.

La potencialidad terapéutica de las vasoinhibinas en la RD se apoya principalmente en dos estudios previos que mostraron por una parte el que la expresión

de vasoinhibinas por medio de un vector adenoviral inhibe la angiogénesis en la retina inducida por isquemia en el ratón (Pan et al., 2004), y por otra, que la inyección intravitreal de vasoinhibinas puras bloquea la vasopermeabilidad retiniana inducida por VEGF y por la diabetes en la rata (Garcia et al., 2008). El presente estudio es una extensión lógica de estos trabajos donde nuevamente probamos el valor preventivo de las vasoinhibinas contra la vasopermeabilidad retiniana excesiva, pero en este caso a través de una estrategia de terapia génica utilizada en la práctica clínica para el tratamiento de trastornos oftálmicos (Cideciyan, 2010). Encontramos que la inyección intravitreal del vector AAV2-Vi confiere protección contra el aumento en la vasopermeabilidad retiniana inducida por el VEGF o debida a la diabetes en la rata. Evaluamos la vasopermeabilidad a través de determinar la acumulación en la retina del trazador dextran acoplado a fluoresceína mediante la técnica de angiografía. También utilizamos el ensayo del azul de Evans, un colorante inyectado sistémicamente que se une de manera irreversible a la albúmina circulante, de manera que la determinación de la acumulación de este colorante en la retina es una medida directa de la cantidad de albúmina extravasada en este tejido. La acumulación de ambos trazadores en la retina refleja la alteración de la barrera hematorretiniana debida a una vasopermeabilidad excesiva. También es posible que los mecanismos por los cuales se elimina el exceso de agua en la retina participan en la acumulación de ambos trazadores, ya que estos procesos se alteran en la diabetes y son estimulados por el VEGF (Reichenbach et al., 2007; Kollias y Ullbig, 2010; Xu y Le, 2011). Adicionalmente, el valor protector de los AAV2-Vi contra la vasopermeabilidad retiniana se apoya en el hecho de que las vasoinhibinas previenen la permeabilidad inducida por VEGF en monocapas de células endoteliales (García et al., 2008) y en el hallazgo de esta tesis que muestra que los AAV2-Vi disminuyen las hemorragias inducidas por VEGF en la retina (Fig 15).

El efecto del vector AAV2-Vi sobre la vasopermeabilidad retiniana es similar a las acciones de la inyección intravítrea de las vasoinhibinas puras (García et al., 2008). Es posible que este efecto inhibitorio sea una propiedad de la vasoinhibina independientemente del método de administración. Se conoce que las vasoinhibinas inhiben el efecto estimulador del VEGF sobre la permeabilidad endotelial a través de bloquear su efecto sobre la activación de la eNOS. Las vasoinhibinas activan a la proteína fosfatasa 2A (PP2A) que defosforila e inactiva a la eNOS (García et al., 2008) y también interfieren con la movilización de calcio intracelular que se requiere para la activación de la eNOS por el sistema calcio-calmodulina (Gonzalez et al., 2004).

En apoyo al papel protagónico del VEGF en la RD y el EMD, se conoce que su concentración se encuentra elevada en el vítreo de pacientes con RD y EMD (Aiello et al. 1994, Funatsu et al. 2006) y que el uso de moléculas anti-VEGF se traduce en una reducción en la vasopermeabilidad y la extravasación de fluido en pruebas clínicas en ambos padecimientos (Cunningham et al., 2005; Chun et al. 2006; Iturralde et al. 2006; Elman et al. 2011; Mitchell et al. 2011). Por lo tanto, la demostración de que el vector AAV2-Vi inhibe la vasopermeabilidad retiniana inducida por el VEGF lo convierte en un candidato atractivo con potencial terapéutico para el tratamiento de la RD y el EMD. Sin embargo, la cascada de eventos patológicos que conducen a la RD y el EMD involucran no sólo al VEGF sino también a otras sustancias vasoactivas tales como la angiopoyetina-2 (Rangasamy et al. 2011), la eritropoyetina (Zhang et al., 2010), la bradicinina (Gao et al. 2007), el FGF-2 (Praidou et al. 2010), la interleucina-1 β (Vincent et al., 2007), la interleucina-6, el factor de necrosis tumoral alfa y el factor derivado de las células del estroma (Ambati, 2007). Todos ellos se encuentran elevados en el vítreo de pacientes con RD y EMD y están siendo investigados como probables blancos terapéuticos (Brooks et al., 2004; Grant et al., 2004; Demircan et al., 2006; Hernandez et al., 2006; Ambati, 2007;

Gao et al., 2007). Se ha mostrado que las vasoinhibinas bloquean el incremento de la vasopermeabilidad retiniana en respuesta a la inyección intravitreal del vítreo de pacientes con RD (García et al., 2008) y que interfieren con los efectos vasculares y las vías de señalización de la bradicinina (Gonzalez et al., 2004), del FGF-2 (D'Angelo et al., 1995) y de la interleucina-1 β (Lee et al., 2007). Debido a que las vasoinhibinas pueden bloquear la acción de múltiples factores vasoactivos su valor un agente terapéutico podría ser más amplio que la de los agentes dirigidos solamente contra el VEGF.

Para evaluar esta posibilidad, se comparó la efectividad del vector AAV2-Vi contra la del vector AAV2-sFlt-1, el inhibidor endógeno del VEGF, para contrarrestar el aumento de la permeabilidad vascular retiniana inducida por la diabetes. El sFlt-1 corresponde a la forma secretada de la región extracelular del receptor tipo 1 del VEGF. sFlt-1 bloquea la actividad del VEGF a través de adherirse al VEGF y prevenir la unión de este factor a sus receptores membranales, o bien a través de formar dímeros con los receptores membranales tipo 1 o 2 (Kendall et al., 1996; He et al., 1999). Estudios previos han mostrado que la administración de vectores que codifican a sFlt-1 inhibe la interrupción de la barrera hemato-retiniana en la diabetes, lo que apoya la importancia del VEGF como un mediador predominante de la permeabilidad vascular retiniana excesiva en este padecimiento (Gehlbach et al. 2003, Ideno et al. 2007). En la presente tesis, encontramos que ambos vectores AAV2-Vi y AAV2-sFlt-1 inhiben la vasopermeabilidad retiniana inducida por la diabetes. Sin embargo, el vector AAV2-Vi bloqueó por completo el aumento en la vasopermeabilidad retiniana provocado por la diabetes, en tanto que el vector AAV2-sFlt-1 la redujo pero no fue capaz de eliminarla totalmente. El mayor efecto inhibitorio del vector AAV2-Vi puede explicarse a través de su capacidad de inhibir la acción de otros factores que inducen vasopermeabilidad además del VEGF.

Estos resultados apoyan el uso del AAV2-Vi como una estrategia terapéutica promisoriosa. Los vectores AAV2 se utilizan para la transferencia de genes terapéuticos en la clínica, donde han demostrado ser relativamente seguros con prácticamente ningún efecto colateral negativo (Cideciyan et al., 2009). En un estudio reciente se evaluó la seguridad de la administración intravitreal de un AAV2-sFlt-1 similar al empleado en nuestro trabajo. El estudio abarcó 12 meses y se llevó a cabo tanto en primates no-humanos como en ratas (MacLachlan et al., 2010). A una dosis (2.4×10^{10} vg) similar a la utilizada por nosotros no se observaron alteraciones de la visión, ni cambios estructurales en regiones oculares, pero se detectó una inflamación leve en el vítreo a partir de los 2 o 3 meses de la inyección del vector, que se autocontroló y que parece ser dirigida contra las proteínas de la cápside porque también se observó en los ojos inyectados con el vector AAV2 vacío. Consistentemente con estas observaciones, no detectamos anomalías aparentes en las preparaciones de retina examinadas bajo campo claro o por fluoresceinografía un mes después de inyectar el vector AAV2-Vi. Futuros trabajos deberán examinar en forma detallada tanto la seguridad como la eficacia de estos vectores a través de evaluaciones oftalmológicas completas, tiempos prolongados de seguimiento y biodistribución de la proteína. Esta información es indispensable para validar la potencialidad terapéutica del uso de los AAV2-Vi contra la RD y el EMD, pero también contra otras enfermedades que como el desarrollo tumoral involucran alteraciones en la vascularización. Al respecto, se ha observado que la producción elevada de vasoinhibinas bloquea la angiogénesis, el crecimiento, la infiltración de leucocitos y la generación de metástasis en modelos experimentales de tumores (Bentzien et al., 2001; Kim et al., 2003; Nguyen et al., 2007; Tabruyn et al. 2007).

En resumen, las vasoinhibinas son inhibidores endógenos de la angiogénesis en la retina y la desregulación en su producción podría influenciar el desarrollo de las alteraciones vasculares que se presentan en la RD. Proponemos que la generación ocular

de vasoinhibinas es función de la disponibilidad de la PRL y de la actividad de MMP y que una alteración en ambos factores conlleva a la menor producción de estas proteínas bajo estadios avanzados de la RD. Así, la disminución en los niveles de vasoinhibinas oculares podría ser parte de los mecanismos por lo que se propone su uso como terapia para controlar el padecimiento. Al respecto, nuestros resultados muestran que la administración intravitreal de vasoinhibinas por medio de un vector AAV2 confiere protección a la retina contra la permeabilidad vascular excesiva asociada a la diabetes, y sugiere que éste vector puede ser una herramienta terapéutica efectiva en la RD, el EMD y otros padecimientos angiogénico dependientes.

IX. REFERENCIAS

Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, Yeo KT 1994. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994; 118(4):445-50.

Adamis AP, Altaweel M, Bressler NM, Cunningham ET Jr, Davis MD, Goldbaum M, Gonzales C, Guyer DR, Barret K, Patel M, Macugen Diabetic Retinopathy Study Group 2006. Changes in retinal neovascularization after pegaptanib (Macugen) therapy in diabetic individuals. *Ophthalmology* 2006; 113(1):23-8.

Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE et al. 1994. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Eng J Med* 1994; 331(22):1480-7.

Almholt K, Juncker-Jensen A, Laerum OD, Dano K, Johnsen M, Lund LR y Romer J 2008. Metastasis is strongly reduced by the matrix metalloproteinase inhibitor Galardin in the MMTV-PymT transgenic breast cancer model. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(9):2758-67.

Ambati J 2007. A molecular understanding of macular edema. *Adv Stud Ophthalmol* 2007; 4:179-81.

Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC, Riesgo-Escovar J, Nava G, López-Barrera F, Quiróz-Mercado H, Berger P, Martínez de la Escalera G, Clapp C (2005). Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(8): 2947-53.

Arevalo JF y García-Amaris RA 2009. Intravitreal bevacizumab for diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* 2009; 5(1):39-46.

Arnold E, Rivera JC, Thebault S, Moreno-Paramo D, Quiroz-Mercado H, Quintanar-Stephano A, Binart N, Martínez de la Escalera G y Clapp C 2010. High levels of serum prolactin Project against diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. *Diabetes* 2010; 59(12):3192-7.

Atchison RW, Casto BC y Hammon WM 1965. Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* 1965; 149:754-6.

Auricchio A, Behling KC, Maguire AM, O'Connor EM, Bennett J, Wilson JM y Tolentino MJ 2002. Inhibition of retinal neovascularization by intraocular viral-mediated delivery of anti-angiogenic agents. *Mol Ther* 2002; 6(4):490-4.

Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA, Giust MJ, Wendel R y Patel A 2006. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 2006; 113(10):1695e1-15.

Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N, Petersen-Jones S, Bhattacharya SS, Thrasher AJ, Fitzke FW, Carter BJ, Rubin GS, Moore AT y Ali RR 2008. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Eng J Med* 2008; 358(21):2231-9.

Belotti D, Calcagno C, Garofalo A, Caronia D, Riccardi E, Giavazzi R, Taraboletti G 2008. Vascular endothelial growth factor stimulates organ-specific host matrix metalloproteinase-9 expression and ovarian cancer invasion. *Mol Cancer Res* 2008; 6(4):525-534.

Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD y LaPensee CR 2006. Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17(3):110-6.

Bentzien F, Struman I, Martini JF, Martial J y Weiner R 2001. Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1(-/-) mice. *Cancer Res* 2001; 61(19):7356-62.

Bhatt LK y Addepalli V 2010. Attenuation of diabetic retinopathy by enhanced inhibition of MMP-2 and MMP-9 using aspirin and minocycline in streptozotocin-diabetic rats. *Am J Transl Res* 2010; 2(2):181-9.

Bhisitkul RB 2006. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol* 2006; 90(12):1542-7.

Blume-Jensen P y Hunter T 2001. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 2001; 411:355-65.

Brooks HL Jr, Caballero S Jr, Newell CK, Steinmetz RL, Watson D, Segal MS, Harrison JK, Scout EW y Grant MB 2004. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1 in patients with diabetic retinopathy and cystoid macular edema before and after intraocular injection of triamcinolone. *Arch Ophthalmol* 2004; 122(12):1801-1.

Brownlee M 2005. The pathobiology of diabetic complications, a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54:1615-25.

Caldwell RB, Bartoli M, Behzadian MA, El-Remessy AE, Al-Shabrawey M, Platt DH, Caldwell RW 2003. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev* 2003; 19(6):442-455.

Cervia D, Casini G y Bagnoli P 2008. Physiology and pathology of somatostatin in the mammalian retina: a current view. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 286(1-2):112-22.

Cheung N, Mitchell P, Wong TY 2010. Diabetic retinopathy. *Lancet* 2010; 376:124-36.

Chun DW, Heier JS, Topping TM, Duker JS y Bankert JM 2006. A pilot study of multiple intravitreal injections of ranibizumab in patients with center-involving diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2006; 113(10):1706-12.

Cideciyan AV, Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Schwartz SB, Boye SL, Windsor EAM, Conlon TJ, Sumaroka A, Pang JJ, Roman AJ, Byrne BJ y Jacobson SG 2009. Human RPE65 gene therapy for Leber congenital amaurosis: persistence of early visual improvements and safety at 1 year. *Hum Gene Ther* 2009; 20(9):999-1004.

Cideciyan AV 2010. Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. *Prog Retin Eye Res* 2010; 29(5):398-427.

Ciulla TA, Amador AG, Zinman B (2003) Diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Diabetes care* 26(9): 2653-64.

Clapp C y Weiner RI 1992. A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* 1992; 130(3):1380-6.

Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delure F, Weiner RI 1993. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 1993; 133: 1292-9.

Clapp C, Aranda J, Gonzalez C, Jeziorski MC, Martinez de la Escalera G 2006. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17: 301-307.

Clapp C, Thebault S, Arnold E, García C, Rivera JC, Martínez de la Escalera G 2008. Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295(4):E772-8.

Colella P, Cotugno G y Auricchio A 2009. Ocular gene therapy: current progress and future prospects. *Trend Mol Med* 2009; 15(1):23-31.

Colella P y Auricchio A 2010. AAV-Mediated gene supply for treatment of degenerative and neovascular retinal diseases. *Curr Gene Ther* 2010; 10(5):371-80.

Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, Pierce RA y Shapiro SD 1998. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol* 1998; 161(12):6845-52.

Coura Rdos S y Nardi NB 2007. The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virol J* 2007; 4:99.

Cruz-Soto ME, Cosio G, Jeziorski MC, Vargas-Barroso V, Aguilar MB, Cárabaz A, Berger P, Saftig P, Arnold E, Thebault S, Martínez de la Escalera G y Clapp C 2009. Cathepsin D is the primary protease for the generation of adeno-hypophyseal vasoinhibins: cleavage occurs within the prolactin secretory granules. *Endocrinology* 2009; 150(12):5446-54.

Cunningham ET Jr, Adamis AP, Altaweel M, Aiello LP, Bressler NM, D'Amico DJ, Goldbaum M, Guver DR, Katz B, Patel M, Schwartz SD, Macugen diabetic retinopathy study group 2005. A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2005; 112(10):1747-57.

D'Angelo G, Struman I, Martial J y Weiner RI 1995. Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(14):6374-8.

Daneman D 2006. Type 1 diabetes. *Lancet* 2006; 367:847-58.

Das A y McGuire PG 2003. Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. *Prog Retin Eye Res* 2003; 22(6):721-48.

Daya S y Berns KI 2008. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21(4):583-93.

Demircan N, Safran BG, Soylu M, Ozcan AA y Sizmaz S 2006. Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye (Lond)* 2006; 20(12):1366-9.

Deshpande AD, Harris-Hayes M y Schootman M 2008. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther* 2008; 88:1254-64.

Diabetes atlas 4th edition, International Diabetes Federation <http://www.eatlas.idf.org> consultado en Septiembre 2011.

Do DV, Nguyen QD, Shah SM, Browning DJ, Haller JA, Chu K, Yang K, Cedarbaum JM, Vitti RL, Ingerman A y Campochiaro PA 2009. An exploratory study of the safety, tolerability and bioactivity of a single intravitreal injection of vascular endothelial growth factor Trap-Eye in patients with diabetic macular oedema. *Br J Ophthalmol* 2009; 93(2):114-9.

Dueñas Z, Rivera JC, Quiróz-Mercado H, Aranda J, Macotela Y, Montes de Oca P, López-Barrera F, Nava G, Guerrero JL, Suarez A, De Regil M, Martínez de la Escalera G, Clapp C (2004). Prolactin in the eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(7): 2049-2055.

Elman MJ, Bressler NM, Qin H, Beck RW, Ferris FL 3rd, Friedman SM, Glassman AR, Scott IU, Stockdale CR y Sun JK; Diabetic retinopathy clinical research network 2011. Expanded 2-year follow-up of ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2011; 118(4):609-14.

Fante RJ, Durairaj VD y Oliver SCN 2010. Diabetic retinopathy: an update on treatment. *Am J Med* 2010; 123:213-6.

Federación mexicana de diabetes (www.fmdiabetes.org). Accesado en Septiembre de 2011.

Ferris FL III 1993. How effective are treatments for diabetic retinopathy?. *JAMA* 1993; 269:1290-1.

Flotte TR 2007. Gene therapy: the first two decades and the current state-of-the-art. *J Cell Physiol* 2007; 213(2):301-5.

Frank RN 2004. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 2004; 350:48-58.

Friehs I, Margossian RE, Moran AM, Cao-Danh H, Moses MA, del Nido PJ 2006. Vascular endothelial growth factor delays onset of failure in pressure-overload hypertrophy through matrix metalloproteinase activation and angiogenesis. *Basic Res Cardiol* 2006; 101(3):204-213.

Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL y Jain RK 2001. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(5):2604-9.

Funatsu H y Yamashita H 2002. Pathophysiology of diabetic retinopathy. *Drugs News Perspect* 2002; 15(10):633-9.

Funatsu H, Yamashita H y Noma H 2003. Outcome of vitreous surgery and the balance between vascular endothelial growth factor and endostatin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:1042-7.

Funatsu H, Yamashita H, Nakamura S, Mimura T, Eguchi S, Noma H y Hori S 2006. Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2006; 113(2):294-301.

Gao BB, Clermont A, Rook S, Fonda SJ, Srinivasan VJ, Wojtkowski M, Fujimoto JG, Avery RL, Arrigg PG, Bursell SE, Aiello LP y Feener EP 2007. Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nat Med* 2007; 13(2):181-8.

García C, Aranda J, Arnold E, Thébault S, Macotela Y, López-Casillas F, Mendoza V, Quiroz-Mercado H, Hernández-Montiel HL, Lin SH, de la Escalera GM, Clapp C (2008). Vasoinhibins prevent increased retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest* 118:2291-2300.

García Fernández M, García Alonso A, Fonollá Gil M y Rodríguez Villa S 2011. Intravitreal triamcinolone acetonide use in diffuse persistent diabetic macular edema. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2011; 86(10):314-9.

Ge G, Fernández CA, Moses MA, Greenspan DS 2007. Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104(24):10010-15.

Gehlbach P, Demetriades AM, Yamamoto S, Deering T, Xiao WH, Duh EJ, Yang HS, Lai H, Kovessi I, Carrion M, Wei L y Campochiaro PA 2003. Periocular gene transfer of sFlt-1 suppresses ocular neovascularization and vascular endothelial growth factor-induced breakdown of the blood-retinal barrier. *Hum Gene Ther* 2003; 14(2):129-41.

Giebel SJ, Menicucci G, McGuire PG y Das A 2005. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Lab Invest* 2005; 85(5):597-607.

Gillies MC, McAllister IL, Zhu M, Wong W, Louis D, Arnold JJ y Wong TY 2011. Intravitreal triamcinilone prior to laser treatment of diabetic macular edema: month results of a randomized controlled trial. *Ophthalmology* 2011; 118(5):866-72.

Goncalves MA 2005. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology* 2005; 2:43.

Gonzalez C, Corbacho AM, Eiserich JP, Garcia C, Lopez-Barrera F, Morales-Tlalpan V, Barajas-Espinosa A, Diaz-Muñoz M, Rubio R, Lin SH, Martínez de la Escalera G y Clapp C 2004. 16k-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium dependent vasorelaxation. *Endocrinology* 2004; 145(12):5714-22.

Grant MB, Afzal A, Spoerri P, Pan H, Shaw LC y Mames RN 2004. The role of growth factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Expert Opin Investig Drugs* 2004; 13(10):1275-93.

Grimm D, Zhou S, Nakai H, Thomas CE, Storm TA, Fuess S, Matsushita T, Allen J, Surosky R, Lochrie M, Meuse L, McClelland A, Colosi P y Kay MA 2003. Preclinical in vivo evaluation of pseudotyped adeno-associated virus vectors for liver gene therapy. *Blood* 2003; 102(7):2412-9.

Grover D, Li TJ y Chong CC 2008. Intravitreal steroids for macular edema in diabetes. *Cochrane Database Syst Rev* 2008:CD005656.54.

Guthrie RA y Guthrie DW 2004. Pathophysiology of diabetes mellitus. *Crit Care Nurs Q* 2004; 27(2):113-25.

Hammes H, Lin J, Bretzel R, Brownlee M, Breier G 1998. Upregulation of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat. *Diabetes* 1998; 47(3):401-6.

Hammes HP 2005. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy, *Horm Metab Res* 2005; 37 Supp 1:39-43.

Hao F y Yu JD 2003. High glucose enhance expression of matrix metalloproteinase-2 in smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24(6):534-8.

Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, Conlon TJ, Boye SL, Flotte TR, Byrne BJ y Jacobson SG 2008. Treatment of Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther* 2008; 19(10):979-90.

He Y, Smith SK, Day KA, Clark DE, Licence DR y Chamock-Jones DS 1999. Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity. *Mol Endocrinol* 1999; 13(4):537-45.

Hellström M, Ruitenberg MJ, Pollet MA, Ehlert EME, Twisk J, Verhaagen J y Harvey AR 2009. Cellular tropism and transduction properties of seven adeno-associated viral vector serotypes in adult retina after intravitreal injection. *Gene Ther* 2009; 16(4):521-32.

Henckaerts E y Linden RM 2010. Adeno-associated virus: a key to the human genome?. *Future Virol* 2010; 5(5):555-74. *Trends Biotechnol.* 1998; 16(1):35-40.

Hernández C, Fonollosa A, García-Ramírez M, Higuera M, Catalán R, Miralles A, García-Arumi J y Simó R 2006. Erythropoietin is expressed in the human retina and it is highly elevated in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema. *Diabetes Care* 2006; 29(9):2028-33.

Ideno J, Mizukami H, Kakehashi A, Saito Y, Okada T, Urabe M, Kume A, Kuroki M, Kawakami M, Ishibashi S y Ozawa K 2007. Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. *Int J Mol Med* 2007; 19(1):75-9.

Ishida S, Usui T, Yamashiro K, Kaji Y, Ahmed E, Carrasquillo KG, Amano S, Hida T, Oguchi Y y Adamis AP 2003. VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(5):2155-62.

Iturralde D, Spaide RF, Meyerie CB, Klancnick JM, Yannuzzi LA, Fisher YL, Sorenson J, Slakter JS, Freund KB, Cooney M y Fine HF 2006. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of macular edema in central retinal vein occlusion: a short term study. *Retina* 2006; 26(3):279-84.

Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, Heon E, Schwartz SB, Roman AJ, Peden MC, Aleman TS, Boye SL, Sumaroka A, Conlon TJ, Calcedo R, Pang JJ, Erger KE, Olivares MB, Mullins CL, Swider M, Kaushal S, Feuer WJ, Iannaccone A, Fishman GA, Stone EM, Byrne BJ y Hauswirth WW 2011. Gene therapy for Leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Arch Ophthalmol* 2011; Sep 12. Publicación electrónica, en prensa.

Kadoglou NP, Daskalopoulou SS, Perrea D, Liapis CD 2005. Matrix Metalloproteinases and diabetic vascular complications. *Angiology* 2005; 56(2):173-89.

Kaur C, Sivakumar V, Yong Z, Lu J, Foulds WS y Ling EA 2007. Blood-retinal barrier disruption and ultrastructural changes in the hypoxic retina in adult rats: the beneficial effect of melatonin administration. *J Pathol* 2007; 212:429-39.

Kendall RL, Wang G y Thomas KA 1996. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226(2):324-8.

Kim J, Luo W, Chen DT, Earley K, Tunstead J, Yu.Lee LY y Lin SH 2003. Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer. *Cancer Res* 2003; 63(2):386-93.

Kollias AN y Uilbig MW 2010. Diabetic retinopathy: early diagnosis and effective treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107(5):75-83.

Kowluru RA, Zhong Q y Kanwar M 2010. Metabolic memory and diabetic retinopathy: role of inflammatory mediators in retinal pericytes. *Exp Eye Res* 2010; 90:617-623.

Kusari J, Zhou S, Padillo E, Clarke KG y Gil DW 2007. Effect of memantine on neuroretinal function and retinal vascular changes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(11):5152-9.

Kusari J, Zhou SX, Padillo E, Clarke KG y Gil DW 2010. Inhibition of vitreoretinal VEGF elevation and blood-retinal barrier breakdown in streptozotocin-induced diabetic rats by brimonidine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(2):1044-51.

Lai CM, Shen WY, Brankov M, Lai YK, Barnett L, Lee SY, Yeo IY, Mathur R, Ho JE, Pineda P, Barathi A, Ang CL, Constable IJ y Rakoczy EP 2005. Long-term evaluation of AAV-mediated sFlt-1 gene therapy for ocular neovascularization in mice and monkeys. *Mol Ther* 2005; 12(4):659-68.

Lee H, Struman I, Clapp C, Martial J y Weiner RI 1998. Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology* 1999; 139(9):3696-703.

Lee SH, Kunz J, Lin SH, Yu-Lee LY 2007. 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signalling pathway. *Cancer Res* 2007; 67: 11045-53.

Lenzen S 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008; 51(2):216-26.

Li B, Zhang HQ, Shi Y, Min YB, Lin SF, Wu KL, Hu J y Tang SB 2009. Overexpression of nuclear transport factor 2 may protect against diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2009; 15:861-9.

Lundstrom K 2003. Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol* 2003; 21(3):117-22.

MacLachlan TK, Lukason M, Collins M, Munger R, Isenberger E, Rogers C, Malatos S, Dufresne E, Morris J, Calcedo R, Veres G, Scaria A, Andrews L, Wadsworth S 2010. Preclinical safety evaluation of AAV2-sFLT01- a gene therapy for age-related macular degeneration. *Mol Ther* 2011; 19(2):326-34.

Macotela Y, Aguilar MB, Guzmán-Morales J, Rivera JC, Zermeño C, López-Barrera F, Nava G, Lavallo C, Martínez de la Escalera G, Clapp C 2006. Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci* 2006; 119: 1790-1800.

Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN Jr, Mingozzi F, Bennicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM, Rossi S, Lyubarsky A, Arruda VR, Konkle B, Stone E, Sun J, Jacobs J, Dell'Osso L, Hertle R, Ma JX, Redmond TM, Zhu X, Hauck B, Zeleniaia O, Shindler KS, Maguire MG, Wright JF, Volpe NJ, McDonnell JW, Auricchio A, High KA, Bennett J 2008. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Eng J Med* 2008; 358(21):2240-8.

Maguire AM, High KA, Auricchio A, Wright JF, Pierce EA, Testa F, Mingozzi F, Bennicelli JL, Ying GS, Rossi S, Fulton A, Marshall KA, Banfi S, Chung DC, Morgan JI, Hauck B, Zeleniaia O, Zhu X, Raffini L, Coppieters F, De Baere E, Shindler KS, Volpe NJ, Surace EM, Acerra C, Lyubarsky A, Redmond TM, Stone E, Sun J, McDonnell JW, Leroy BP, Simonelli F y Bennett J 2009. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2009; 374(9701):1597-605.

Martin KR, Klein RL y Quigley HA 2002. Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors. *Methods* 2002; 28:267-75.

Martini JF, Piot C, Humeau LM, Struman I, Martial JA, Weiner RI 2000. The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol Endocrinol* 2000; 14:1536-49.

Massin PG 2008. Anti-VEGF therapy for diabetic macular edema: an update. *Retina Today* 2008; september/october:54-6.

Mathews MK, Merges C, McLeod DS, Luttly GA 1997. Vascular endothelial growth factor and vascular permeability changes in human diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38:2729-41.

Matsuoka M, Ogata N, Minamino K y Matsumura M 2007. Leukostasis and pigment epithelium-derived factor in rat models of diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2007; 13:1058-65.

Miller JW, Adamis AP, Aiello LP (1997) Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Rev* 13: 37-50.

Mirshahi A, Roohipoor R, Lashay A, Mohammadi SF, Abdoallahi A y Faghihi H 2008. Bevacizumab-augmented retinal laser photocoagulation in proliferative diabetic retinopathy: a randomized double-masked clinical trial. *Eur J Ophthalmol* 2008; 18:263-9.

Mitchell P, Bandello F, Schmidt-Erfurth U, Lang GE, Massin P, Schlingemann RO, Sutter F, Simader C, Burian G, Gerstner O y Weichselberger A; RESTORE study group 2011. The RESTORE study: ranibizumab monotherapy or combined with laser versus laser monotherapy for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2011; 118(4):615-25.

Mohamed Q, Gillies MCy Wong TY 2007. Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *JAMA* 2007; 298:902-16.

Mori K, Gehlbach P, Yamamoto S, Duh E, Zack DJ, Li Q, Berns KI, Raisler BJ, Hauswirth WW y Campochiaro PA 2002. AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(6):1994-2000.

Navaratna D, McGuire PG, Menicucci G y Das A 2007. Proteolytic degradation of VE-cadherin alters the blood-retinal barrier in diabetes. *Diabetes* 2007; 56(9):2380-7.

Nguyen NQ, Cornet A, Blacher S, Tabruyn SP, Foidart JM, Noël A, Martial JA y Struman I 2007. Inhibition of tumor growth and metastasis establishment by adenovirus-mediated gene transfer delivery of the antiangiogenic factor 16K hPRL. *Mol Ther* 2007; 15(12):2094-100.

Nishijima K, Ng YS, Zhong L, Bradley J, Schubert W, Jo N, Akita J, Samuelsson SJ, Robinson GS, Adamis AP y Shima DT 2007. Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *Am J Pathol* 2007; 171(1):53-67.

Noda K, Ishida S, Inoue M, Obata K, Oguchi Y, Okada Y, Ikeda E (2003). Production and activation of matrix metalloproteinase-2 in proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(5):2163-2170.

Notari L, Miller A, Martínez A, Amaral J, Ju M, Robinson G, Smith LE y Becerra SP 2005. Pigment epithelium-derived factor is a substrate for matrix metalloproteinase type 2 and type 9: implications for downregulation in hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(8):2736-47.

Ohno-Matsui K, Hirose A, Yamamoto S, Saikia J, Okamoto N, Gehlbach P, Duh RJ, Hackett S, Chang m, Bok D, Zack DJ, Campochiaro PA 2002. Inducible expression of vascular endothelial growth factor in adult mice causes severe proliferative retinopathy and retinal detachment. *Am J Pathol* 2002; 160(2): 711-719.

O'Steen WK y Sundberg DK 1982. Patterns of Radioactivity in the eyes of rats after Injections of Iodinated Prolactin. *Ophthalmic Res* 1982; 14(1):54-62.

Ottino P, Finley J, Rojo E, Otlecz A, Lambrou GN, Bazan HE, Bazan NG 2004. Hypoxia activates matrix metalloproteinase expression and the VEGF system in monkey choroid-retinal endothelial cells: involvement of cytosolic phospholipase A2 activity. *Mol Vis* 2004; 17(10):341-50.

Pan H, Nguyen NQN, Yoshida H, Bentzien F, Shaw LC, Rentier-Delrue F, Martial JA, Weiner R, Struman I y Grant MB 2004. Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K-hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(7):2413-9.

Penn JS, Madan A, Caldwell RB, Bartoli M, Caldwell RW y Hartnett ME 2008. Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 2008; 27:331-71.

Piwnica D, Touraine P, Struman I, Tabruyn S, Bolbach G, Clapp C, Martial JA, Kelly PA, Goffin V 2004. Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Mol Endocrinol* 2004; 18(10):2522-42.

Pournaras CJ, Rungger-Brändle E, Riva CE, Hardarson SH y Stefansson E 2008. Regulation of retinal blood flow in health and disease. *Prog Retin Eye Res* 2008; 27(3):284-330.

Praidou A, Androudi S, Brazitikos P, Karakiulakis G, Papakonstantinou E, Dimitrakos S 2010. Angiogenic growth factors and their inhibitors in diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* 2010; 6(5): 304-12.

Qaum T, Xu Q, Jousen AM, Clemens MW, Qin W, Miyamoto K, Hassessian H, Wiegand SJ, Rudge J, Yancopoulos GF y Adamis AP 2001. VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(10):2408-13.

Qazi Y, Maddala S y Ambati BK 2009. Mediators of ocular angiogenesis. *J Genet* 2009; 88(4):495-515.

Raffetto JD y Khalil RA 2008. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2008; 75(2):346-59.

Rangasamy S, Srinivasan R, Maestas J, McGuire PG y Das A 2011. A potential role for angiopoietin 2 in the regulation of the blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(6):3784-91.

Reichenbach A, Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Wiedemann P y Bringmann A 2007. Müller cells as players in retinal degeneration and edema. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245:627-36.

Rivera JC, Aranda J, Riesgo J, Nava G, Thebault S, López-Barrera F, Ramírez M, Martínez de la Escalera G, Clapp C 2008. Expression and cellular localization of prolactin and the prolactin receptor in mammalian retina. *Exp Eye Res* 2008; 86(2):314-21.

Robbins PD, Tahara H y Ghivizzani SC 1998. Viral vectors for gene therapy. Trends Biotechnol 1998; 16(1):35-40.

Salzmann J, Limb GA, Khaw PT, Gregor ZJ, Webster L, Chignell AH y Charteris DG 2000. Matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy. Br J Ophthalmol 2000; 84(10):1091-6.

Sapieha P, Joyal JS, Rivera JC, Kermovant-Duchemin E, Sennlaub F, Hardy P, Lachapelle P y Chemtob S 2010. Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. J Clin Invest 2010; 120(9):3022-32.

Schlehofer JR, Ehrbar M y Zur Hausen H 1986. Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a herpesvirus dependent parvovirus. Virology 1986; 152(1):110-7.

Shyong MP, Lee FL, Kuo PC, Wu AC, Cheng HC, Chen SL, Tung TH y Tsao YP 2007. Reduction of experimental diabetic vascular leakage by delivery of angiostatin with a recombinant adeno-associated virus vector. Mol Vis 2007; 13:133-41.

Simó R, Carrasco E, García-Ramírez M, Hernández C 2006. Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. Current Diabetes Rev 2006; 2(1):71-98.

Simó R y Hernández C 2008. Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: hopes and fears for a new therapeutic strategy. Diabetologia 2008; 51(9): 1574-80.

Sinha YN 1995. Structural variants of prolactin occurrence and physiological significance. Endocr Rev 1995; 16:354-69.

Singh R, Ramasamy K, Abraham C, Gupta V y Gupta A 2008. Diabetic retinopathy: an update. Indian J Ophthalmol 2008; 56(3):178-88.

Sivak JM y Fini ME 2002. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. Prog Retin Eye Res 2002; 21(1):1-14.

Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R y D'Amore PA 1994. Oxygen induced retinopathy in the mouse Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 35(1):101-111.

Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, Sekine Y, Hondura S, Matsuo K, Segawa T, Suzuki H, Yamashita K (1997). Ocular vascular endothelial growth factor levels in diabetic rats are elevated before observable retinal proliferative changes. Diabetologia 40(6): 726-30.

Spranger J, Hammes HP, Preissner KT, Schatz H y Pfeifer AF 2000. Release of angiogenesis inhibitor angiostatin in patients with proliferative diabetic retinopathy: association with retinal photocoagulation. Diabetologia 2000; 43:1404-7.

Starita C, Patel M, Katz B y Adamis AP 2007. Vascular endothelial growth factor and the potential therapeutic use of pegaptanib (macugen) in diabetic retinopathy. Dev Ophthalmol 2007; 39:122-48.

Stefansson E 2009. Physiology of vitreous surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; 247(2):147-63.

Stellmach V, Crawford SE, Zhou W y Bouck N 2001. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98(5):2593-7.

Sternlicht MD y Werb Z 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:463-516.

Stewart EA, Samaranayake GJ, Browning AC, Hopkinson A y Amoaku WM 2011. Comparison of choroidal and retinal endothelial cells: characteristics and response to VEGF isoforms and anti-VEGF treatments. *Exp Eye Res* 2001; 93(5):761-6.

Stieger K y Lorenz B 2010. Gene therapy for vision loss – recent developments. *Discov Med* 2010; 10(54):425-33.

Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo, Goffin V, Weiner RI y Martial JA 1999. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(4):1246-51.

Stumvoll M, Goldstein BJ y van Haeften TW 2005. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005; 365:1333-46.

Suzuma K, Takagi H, Otani A, Suzuma I, Honda Y 1998. Increased expression of KDR/Fik-1 (VEGFR-2) in murine model of ischemia-induced retinal neovascularization. *Microvasc Res* 1998; 56(3):183-91.

Tabruyn SP, Sabatel C, Nguyen NQ, Verhaeghe C, Castermans K, Malvaux L, Griffioen AW, Martial JA y Struman I 2007. The angiostatic 16K human prolactin overcomes endothelial cell anergy and promotes leucocyte infiltration via nuclear factor-kappaB activation. *Mol Endocrinol* 2007; 21(6):1422-9.

Takamura Y, Kubo E y Akagi Y 2009. Analysis of the effect of intravitreal bevacizumab injection on diabetic macular edema after cataract surgery. *Ophthalmology* 2009; 116:1151-7.

Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Jakobiec FA, Flynn E, Chatzistefanou K, Ferrara N, Adamis AP 1996. Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. *Ophthalmology* 1996; 103(11):1820-8.

Triebel J, Huefner M y Ramadori G 2009. Investigation of prolactin-related vasoinhibin in sera from patients with diabetic retinopathy. *Eur J Endocrinol* 2009; 161(2):345-53.

Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, Harrison DG y Tsao PS 2001. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res* 2001; 88(12):1291-8.

Vincent JA y Mohr S 2007. Inhibition of caspase-1/interleukin-1 beta signaling prevents degeneration of retinal capillaries in diabetes and galactosemia. *Diabetes* 2007; 56(1):224-30.

Wang FQ, So J, Reierstad S y Fishman DA 2006. Vascular endothelial growth factor-regulated ovarian cancer invasion and migration involves expression and activation of matrix metalloproteinases. *Int J Cancer* 2006; 118(4):879-88.

Willkinson-Berka JL y Miller AG 2008. Update on the treatment of diabetic retinopathy. *ScientificWorldJournal* 2008; 8:98-120.

Wolburg H y Lippoldt A 2002. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* 2002; 38:323-337.

Xu HZ y Le YZ 2011. Significance of outer blood-retina barrier breakdown in diabetes and ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(5):2160-4.

Xu Q, Qaum T y Adamis AP 2001. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(3):789-94.

Yam JCS y Kwok AKH (2007) Update on the treatment of diabetic retinopathy. *Hong kong Med J* 13(1): 46-60.

Yilmaz T, Weaver CD, Gallagher MJ, Cordero-Coma M, Cervantes-Castaneda RA, Kilsovic D, Lavaque AJ and Larson RJ. Intravitreal triamcinolone acetonide injection for treatment of refractory diabetic macular edema: a systematic review. *Ophthalmology* 2008; 116(5):902-11.

Yonekura H, Sakurai S, Liu X, Migita H, Wang H, Yamagishi S, Nomura M, Abedin MJ, Unoki H, Yamamoto Y y Yamamoto H 1999. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis. *J Biol Chem* 1999; 274(49):35172-8.

Yu H, Chen L y Jiang J 2010. Administration of pigment epithelium-derived factor delivered by adeno-associated virus inhibits blood-retinal barrier breakdown in diabetic rats. *Mol Vis* 2010; 16:2384-94.

Zhang J, Hu LM, Xu G, Wu Y, Shen J, Luo Y, Zhong Y, Sinclair SH, Yanoff M, Li W y Xu GT 2010. Anti-VEGF effects of intravitreal erythropoietin in early diabetic retinopathy. *Front Biosci (Elite Ed)* 2010; 2:912-27.

Zhang SX, Ma JX, Chen Y, Hu MS, Otlecz A y Lambrou GN 2005. Genetic difference in susceptibility to the blood-retina barrier breakdown in diabetes and oxygen-induced retinopathy. *Am J Pathol* 2005; 166(1):313-21.

Vasoinhibin Gene Transfer by Adenoassociated Virus Type 2 Protects against VEGF- and Diabetes-Induced Retinal Vasopermeability

Mayda Ramírez,¹ Zhijian Wu,² Bibiana Moreno-Carranza,¹ Michael C. Jeziorski,¹ Edith Arnold,¹ Nundebui Díaz-Lezama,¹ Gonzalo Martínez de la Escalera,¹ Peter Colosi,² and Carmen Clapp¹

PURPOSE. Specific proteolytic cleavages of the hormone prolactin (PRL) generate vasoinhibins, a family of peptides (including 16-kDa PRL) that are able to inhibit the pathologic increase in retinal vasopermeability (RVP) associated with diabetes. Here the authors tested the ability of an adenoassociated virus type 2 (AAV2) vasoinhibin vector to inhibit vascular endothelial growth factor (VEGF)- and diabetes-induced RVP.

METHODS. AAV2 vectors encoding vasoinhibin, PRL, or soluble VEGF receptor 1 (soluble FMS-like tyrosine kinase-1 [sFlt-1]) were injected intravitreally into the eyes of rats. Four weeks later, either VEGF was injected intravitreally or diabetes was induced with streptozotocin. Tracer accumulation was evaluated as an index of RVP using fluorescein angiography or the Evans blue dye method. RT-PCR verified transgene expression in the retina, and the intravitreal injection of an AAV2 vector encoding green fluorescent protein revealed transduced cells in the retinal ganglion cell layer. In addition, Western blot analysis of AAV2-transduced HEK293 cells confirmed the expression and secretion of the vector-encoded proteins.

RESULTS. The AAV2-vasoinhibin vector prevented the increase in tracer accumulation that occurs 24 hours after the intravitreal injection of VEGF. Diabetes induced a significant increase in tracer accumulation compared with nondiabetic controls. This increase was blocked by the AAV2-vasoinhibin vector and reduced by the AAV2-sFlt-1 vector. The AAV2-PRL vector had no effect.

CONCLUSIONS. These results show that an AAV2-vasoinhibin vector prevents pathologic RVP and suggest it could have therapeutic value in patients with diabetic retinopathy. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:8944–8950) DOI:10.1167/iovs.11-8190

From the ¹Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Mexico; and ²Ocular Gene Therapy Laboratory, Neurobiology, Neurodegeneration and Repair Laboratory, National Eye Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland.

Supported in part by National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT) Grants SALUD-2008-C01-87015 and SALUD-2011-1-161594 (CC).

Submitted for publication July 8, 2011; revised September 28, 2011; accepted October 9, 2011.

Disclosure: **M. Ramírez**, None; **Z. Wu**, None; **B. Moreno-Carranza**, None; **M.C. Jeziorski**, None; **E. Arnold**, None; **N. Díaz-Lezama**, None; **G. Martínez de la Escalera**, None; **P. Colosi**, None; **C. Clapp**, None

Corresponding author: Carmen Clapp, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, 76230 Querétaro, Mexico; clapp@unam.mx.

Diabetic retinopathy (DR) is the primary cause of irreversible blindness and visual impairment in working-age adults in developed countries.¹ Blood-retinal barrier breakdown and enhanced retinal vasopermeability (RVP) are early complications of DR that contribute to diabetic macular edema (DME) and can lead to the overproliferation of retinal blood vessels in advanced DR.² The current treatments for DR and DME, which include laser photocoagulation, vitrectomy, and intravitreal pharmacotherapy, are frequently effective, but the first two can treat only the advanced disease and the latter often requires repeated injections, which raise important issues with patient convenience and compliance.^{2,3} Thus, developing new strategies to prevent both excessive RVP and angiogenic responses remains a major research focus.

Vasoinhibins are natural inhibitors of ocular blood vessels that may play a role in the progression of DR.^{4–6} They comprise a family of peptides generated by specific proteolytic cleavages of prolactin (PRL) that exert potent antiangiogenic, vasoconstrictive, and antivasopermeability actions.⁷ Vasoinhibins prevent vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced angiogenesis⁸ and promote apoptosis-mediated vascular regression,⁹ as observed, for example, in retinopathy of prematurity.¹⁰ Moreover, elevation of intraocular vasoinhibins inhibits ischemia-induced retinal angiogenesis¹¹ and prevents excessive RVP in diabetic rats and in rats treated with intravitreal injection of either VEGF or vitreous from patients with DR.⁵ Notably, patients with DR have reduced levels of vasoinhibins in the circulation,¹² and increasing systemic PRL levels in diabetic rats raises the concentration of vasoinhibins in the retina, which in turn reduce RVP.⁶

Viral vector-mediated delivery of antiangiogenic and antivasopermeability factors offers considerable promise for the treatment of DR.¹³ The most widely used vectors for ocular gene therapy are based on adenoassociated virus (AAV) because they produce long-term transgene expression in a variety of retinal cell types.¹⁴ In this study, we evaluated an AAV type 2 (AAV2)-vasoinhibin vector for the ability to inhibit VEGF- and diabetes-induced vasopermeability in rats after intravitreal injection.

METHODS

Plasmid Constructions and Production of Recombinant AAV2

Human PRL cDNA was amplified by PCR from an existing construct, digested with *Bam*HI and *Not*I, and cloned into the *Bam*HI and *Not*I sites of pcDNA3. Human vasoinhibin cDNA (codons 1 to 142 of human PRL) was amplified from a modified construct in which codon 58 had been converted from Cys to Ser. The amplification inserted a stop codon at position 143. The product was cloned into pcDNA3 as

described for PRL. Full-length cDNAs encoding soluble FMS-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) and green fluorescent protein (GFP) were used. All plasmid constructs were fully sequenced and verified to be free of PCR-induced errors. AAV2 vector genomes were constructed by placing the transgene of interest downstream of a cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter and a chimeric CMV/human β -globin intron and upstream of a human β -globin polyadenylation site (Fig. 1A). AAV2 particles were produced by the triple transfection method and purified by polyethylene glycol precipitation followed by cesium chloride density gradient fractionation by a previously described method.¹⁵ The purified vectors were formulated in 10 mM Tris-HCl and 180 mM NaCl (pH 7.4) and stored at -80°C before use. Vector preparations were examined by SDS-PAGE for purity and dynamic light scattering for aggregation state. Quantification of vectors was done by real-time PCR using linearized plasmid standards. A $2\text{-}\mu\text{L}$ suspension containing 2.8×10^{10} vector genomes (vg) of each vector or $2\text{-}\mu\text{L}$ vehicle was injected into the vitreous.

In Vitro Transduction Analysis

HEK293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 1% penicillin-streptomycin, 1% fungizone, and 10% fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY). HEK293 cells (9×10^4 in $300\text{-}\mu\text{L}$ medium) were transduced with 1.4×10^{11} vg of AAV2 (multiplicity of infection: 1.5×10^6) encoding each transgene in 24-well plates in the presence of etoposide (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), at a final concentration of 2.5 nM. After 16 hours, the cells were washed with PBS and then cultured in DMEM. The cells and

conditioned medium were harvested 24 hours later to evaluate the expression and secretion of the transgenes by Western blot.

RT-PCR

Total RNA extracted from retinal lysates was treated with DNase and subjected to RT-PCR and gel electrophoresis as previously described.¹⁶ Detection of human PRL and vasoinhibin cDNA was accomplished using primers CTG CCC GAT GCC AGG TGA (sense) and GAA AGT CTT TTT GAT TCA TCT GT (antisense) that generate a 219 basepair (bp) product. These primers correspond to the sequence shared by human PRL and human vasoinhibin and were verified not to amplify rat PRL. The amplification parameters used were 30 seconds at 94°C , 30 seconds at 57°C , and 30 seconds at 72°C for 35 cycles. Oligonucleotide primers used to amplify human sFlt-1 were GAC CTG GAG TTA CCC TGA TGA (sense) and ATG GTC CAC TCC TTA CAC GAC (antisense), with an annealing temperature of 61°C for 30 cycles, and yielded a 159-bp product; for actin, CCA TCA TGA AGT GTG ACG TTG (sense) and ACA GAG TAC TTG CGC TCA GGA (antisense) were used at an annealing temperature of 58°C for 26 cycles and generated a 173-bp product.

Western Blot Analysis

HEK293 cells were homogenized in $100\text{-}\mu\text{L}$ of lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 0.5% Igepal, 100 mM NaCl, $1\text{-}\mu\text{g}/\mu\text{L}$ aprotinin, 0.5 mM PMSF) and centrifuged to remove cellular debris (12,000g for 10 minutes at 4°C). Cell lysates containing $20\text{-}\mu\text{g}$ protein or $15\text{-}\mu\text{L}$ conditioned medium were resolved by 15% SDS-PAGE under reducing conditions and transferred to a nitrocellulose membrane. Blots were incubated overnight with a 1:500 dilution of either an anti-human PRL antiserum (HC-1)¹⁰ or an anti-sFlt-1 monoclonal antibody (ab9540; Abcam Inc., Cambridge, MA). Detection was performed using an alkaline phosphatase-coupled secondary antibody and a colorimetric detection kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Deglycosylation Procedure

Deglycosylation of glycoproteins in media conditioned by HEK293 cells was carried out using N-glycosidase F (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA) following the manufacturer's instructions. Briefly, $5\text{-}\mu\text{L}$ medium was incubated with $5\text{-}\mu\text{L}$ denaturing buffer (5% SDS, 0.4 M dithiothreitol) at 100°C for 10 minutes. Subsequently, $4\text{-}\mu\text{L}$ H_2O , $2\text{-}\mu\text{L}$ 0.5 M sodium phosphate buffer (pH 7.5), $2\text{-}\mu\text{L}$ 10% NP-40, and $1\text{-}\mu\text{L}$ (500 U) N-glycosidase F were added and the mixture was incubated at 37°C for 1 hour. A $10\text{-}\mu\text{L}$ sample of the final reaction mixture was analyzed by SDS-PAGE/Western blot.

Animals

Male Wistar rats (250 to 300 g) were maintained and treated in accordance with the guidelines in the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology of the National University of Mexico (UNAM) approved all animal experiments. Animals were anesthetized intraperitoneally (IP) with 70% ketamine and 30% xylazine ($1\text{-}\mu\text{L}/\text{g}$ body weight), and AAV2 vector or vehicle was injected into the vitreous as described.¹⁶ A month later, some animals were anesthetized in a CO_2 -saturated inhalation chamber and euthanized by decapitation, and their retinas were dissected to evaluate the expression of the vector-encoded proteins by RT-PCR or histochemistry. Other animals, injected a month earlier with the AAV2-vasoinhibin vector or vehicle, received an intravitreal injection of 300 ng VEGF (rhVEGF165; a gift from Genentech, South San Francisco, CA) in $2\text{-}\mu\text{L}$ PBS. Finally, other rats were injected with the various AAV2 vectors or vehicle and, a month later, were fasted overnight, then treated with a single IP dose of streptozotocin (60 mg/kg) (Sigma-Aldrich Co.). Forty-eight hours later, blood glucose levels were measured, and only the rats with a blood glucose concentration $> 250\text{-mg}/\text{dL}$ were considered diabetic.¹⁷ One month after

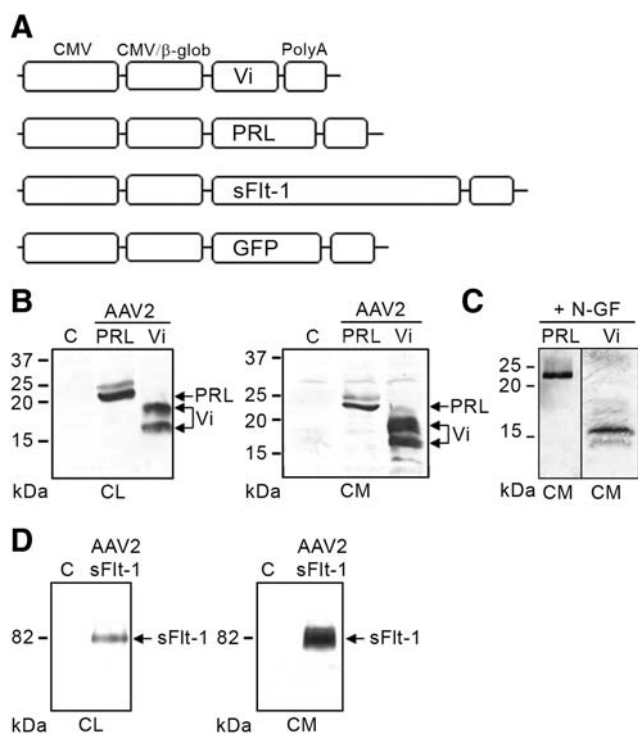


FIGURE 1. Analysis of AAV2-mediated transgene expression and secretion in HEK293 cells. (A) Schematic representation of the structure of plasmid-encoded vectors. All vectors use the cytomegalovirus (CMV) promoter, the CMV/ β -globin intron (CMV/ β -glob), and the β -globin polyadenylation site (PolyA). (B) Reducing Western blot analyses of PRL and vasoinhibin (Vi) proteins in cell lysates (CL) and conditioned media (CM) of HEK293 cells not transduced (C) or transduced with AAV2-PRL or AAV2-Vi are shown. (C) Reducing Western blot analysis of CM from HEK293 cells transduced with AAV2-PRL or AAV2-Vi vectors incubated with N-glycosidase F (+N-GF) after collection. (D) Reducing Western blot analysis of sFlt-1 protein in CL and CM of HEK293 cells transduced with AAV2-sFlt-1 vector. Numbers indicate the position of molecular weight markers.

inducing diabetes, animals were euthanized to evaluate RVP by the Evans blue dye method.

Retinal Localization of AAV2-GFP Transduction

Green fluorescent protein (GFP) fluorescence was directly detected in retinas fixed in 4% paraformaldehyde for 30 minutes, flat-mounted, and coverslipped with mounting media for fluorescence (Vectashield; Vector Laboratories, Burlingame, CA).¹⁸ GFP in retinal cell bodies and processes was also visualized by immunohistochemistry. Retinas fixed in 4% paraformaldehyde for 30 minutes were placed sequentially in PBS containing 20% and 30% sucrose (24 hours each). Cryosections (12 μ m) were blocked in PBS containing 1% bovine serum albumin, 1% normal goat serum, and 0.1% Triton X-100 for 1 hour at room temperature and labeled overnight at 4°C with a 1:100 dilution of anti-GFP polyclonal antibody (ab6556; Abcam Inc.). After incubation with the primary antibody, samples were rinsed three times in PBS and labeled for 2 hours with a 1:1000 dilution of a fluorescent dye-conjugated (Alexa Fluor 546; Invitrogen, Carlsbad, CA) goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, OR). Retinal flat-mounts and sections were examined with a confocal laser scanning microscope (LSM 510; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany). Photographs were taken and images prepared using a digital photo editing program (Adobe Photoshop CS3 Extended Version 10.0.1; Adobe, San Jose, CA).

Fluorescein Angiography

Twenty-four hours after the intravitreal injection of VEGF, the animals were injected (intrajugularly) with 100 mg/kg fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (50 mg/mL, FITC-dextran; MW 2×10^6 Da; Sigma-Aldrich Co.). One hour later, the rats were euthanized and their retinas were flat-mounted, fixed for 4 hours in 4% paraformaldehyde at room temperature, washed with PBS, and mounted on glass slides using 50% glycerol in PBS. Retinal flat-mounts were observed and photographed under a fluorescence microscope (Olympus BX60 with a DP70 Olympus camera), and the fluorescence intensity of each image was analyzed using commercial software (Image Pro-Plus Media; Cybernetics, Silver Spring, MD). The area of retinal hemorrhages in the flat-mounted retinas was quantified using a digital scanner (ScanScope; Aperio Technologies, Inc. Vista, CA) and color-deconvolution software (Aperio Technologies).

Evans Blue Dye Method

Retinal albumin accumulation was measured using the Evans blue dye technique.¹⁹ Briefly, after being anesthetized, the rats were injected (intrajugularly) with Evans blue dye (45 mg/kg; Sigma-Aldrich Co.). Two hours later, blood (1 mL) was drawn from the heart to measure the Evans blue concentration in plasma, and the rats were perfused via the left ventricle at physiologic pressure and at 37°C with PBS (pH 7.4). The retina was then dissected and vacuum-dried (SPD 1010 SpeedVac System; ThermoSavant) for 5 hours. After the tissue was weighed, the Evans blue dye was extracted by incubating each retina in 100 μ L formamide (Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ) for 18 hours at 72°C. The extract was centrifuged at 300,000g for 60 minutes at 4°C. Absorbance was measured in the supernatant at 620 nm using a spectrophotometer (NanoDrop 1000; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE). The concentration of the Evans blue-stained albumin accumulated in the extracts was calculated from a standard curve of Evans blue in formamide normalized to the retina and body weight and to the Evans blue concentration in plasma.

Statistical Analysis

Values are expressed as mean \pm SEM. The statistical significance of differences between groups was determined by ANOVA followed by the unpaired two-tailed Student's *t*-test. Statistical analysis was performed using commercial analytical software (SigmaStat 7.0, Systat

Software Inc., San Jose, CA). Differences in means with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Verification of Transgene Expression in HEK293 Cells

AAV2-PRL, -vasoinhibin, and -sFlt-1 vectors were tested in vitro using HEK293 cells to validate their usefulness for the expression and secretion of the transgenes. Western blot analysis detected the expected bands of 23 and 16 kDa for the AAV2-PRL and AAV2-vasoinhibin vectors, respectively, in both cell lysates and conditioned medium (Fig. 1B). Transduction by both vectors also yielded immunoreactive proteins having a slightly higher molecular weight (25 and 18 kDa for the AAV2-PRL and the AAV2-vasoinhibin vectors, respectively) than that predicted for the translation products (Fig. 1B). These larger proteins resulted from N-linked glycosylation of PRL and vasoinhibin because their mobility increased after incubating the conditioned medium with N-glycosidase F such that only 23- and 16-kDa bands were seen (Fig. 1C). The N-linked glycosylation of Asn31 occurs naturally in some PRL molecules,²⁰ but this posttranslational modification does not appear to affect the biological activity of vasoinhibins.^{11,21} HEK293 cells transduced with the AAV2-sFlt-1 vector contained and secreted substantial amounts of an immunoreactive protein of 82 kDa, the molecular mass of sFlt-1 (Fig. 1D). These results demonstrated that all vectors were able to deliver their transgenes to cells and establish protein expression and secretion.

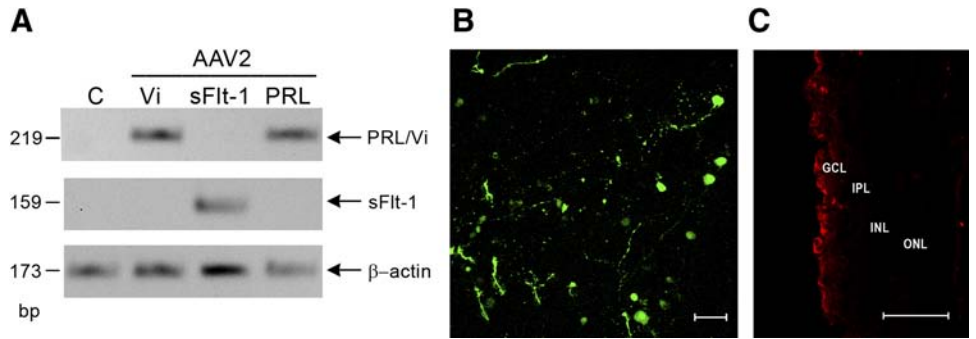
Verification and Localization of Retinal Transgene Expression

Transgene expression in target retinal cells was examined by RT-PCR analysis. Total retinal RNA from eyes injected with vehicle only (control) or with AAV2 was treated with DNase to eliminate genomic DNA contamination. Amplification of DNase-treated RNA samples without reverse transcriptase generated no products for PRL, vasoinhibin, or sFlt-1 (data not shown). A common human PRL cDNA region was amplified in retinas transduced with the AAV2-PRL and AAV2-vasoinhibin vectors, and the cDNA for human sFlt-1 was detected in retinas injected with the AAV2-sFlt-1 vector (Fig. 2A). No PRL message was detected in control eyes or eyes injected with the AAV2 vector encoding sFlt-1, confirming that the primers do not amplify endogenous rat PRL (Fig. 2A). The intravitreal injection of AAV2-GFP revealed transduced cells and their projections within the retinal ganglion cell layer, as indicated by the fluorescence detected directly on flat-mounted retinas (Fig. 2B) or after immunohistochemical analysis of retinal sections (Fig. 2C). No positive fluorescence signal was detected in the vehicle-injected controls (not shown). These results verified the transgene expression of each of the various AAV2 vectors in retinal cells and confirmed previous observations showing that intravitreal delivery of AAV2 vectors primarily transduces retinal ganglion cells.²²

AAV2-Vasoinhibin Vector Reduces VEGF-Induced Hemorrhages and FITC-Dextran Accumulation

Retinal hemorrhages and FITC-dextran accumulation were examined in AAV2-vasoinhibin-transduced retinas that were challenged with intravitreally injected VEGF, a major vasopermeability factor in DR.²³ In these experiments, rats were injected intravitreally with VEGF or with the VEGF vehicle (PBS) 1

FIGURE 2. Verification and localization of AAV2-mediated transgene expression in the retina. (A) RT-PCR analysis of vasoinhibins (Vi), sFlt-1, and PRL cDNA in retinas obtained from rats 1 month after being injected intravitreally with vehicle (C) or AAV2-Vi, AAV2-sFlt-1, or AAV2-PRL vectors. The sizes of RT-PCR products are given in base pairs (bp). Amplification of β -actin was used as an internal standard. (B, C) Confocal microscope visualization of direct GFP fluorescence in the ganglion cell layer of a flat-mounted retinal preparation (B) or of GFP immunoreactivity in a retinal section (C), obtained from rats 1 month after being injected intravitreally with the AAV2-GFP vector. Bars indicate 50 μ m. GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, internal nuclear layer; ONL, outer nuclear layer.



month after the intravitreal injection of vector vehicle or the AAV2-vasoinhibin vector, and retinas were evaluated 24 hours after VEGF injection. VEGF treatment caused multiple retinal hemorrhagic areas (Fig. 3B) that were absent in control retinas injected with PBS (Fig. 3A) and nearly absent in VEGF-injected eyes transduced with the AAV2-vasoinhibin vector (Fig. 3C). Image analysis showed that the AAV2-vasoinhibin vector reduced VEGF-induced hemorrhagic areas by 95% (Fig. 3D). The effect of the AAV2-vasoinhibin vector was further evaluated by measuring FITC-dextran accumulation. The strong fluorescence outside the vasculature that accompanied VEGF treatment (Fig. 3F) was markedly reduced in retinas transduced by the AAV2-vasoinhibin vector (Fig. 3G), corresponding to 64% inhibition after quantifying the intensity of retinal fluorescence (Fig. 3H). No extravascular fluorescence was detected in PBS-injected controls (Fig. 3E).

AAV2-Vasoinhibin Vector Prevents Diabetes-Induced, Evans Blue-Stained Albumin Accumulation

In these experiments, 1 month after intravitreal delivery of the vehicle or the various AAV2 vectors, the rats were made diabetic with streptozotocin, and a month later albumin accumulation was quantified by the Evans blue method. Diabetes induced a statistically significant increase in Evans blue-stained albumin accumulation in control, vehicle-injected rats (Fig. 4). Treatment with the AAV2-vasoinhibin vector prevented this effect, whereas using the AAV2-sFlt-1 vector reduced, but did not eliminate, diabetes-induced Evans blue-stained albumin accumulation. The AAV2-PRL vector had no effect and none of the vectors modified Evans blue-stained albumin accumulation in nondiabetic rats.

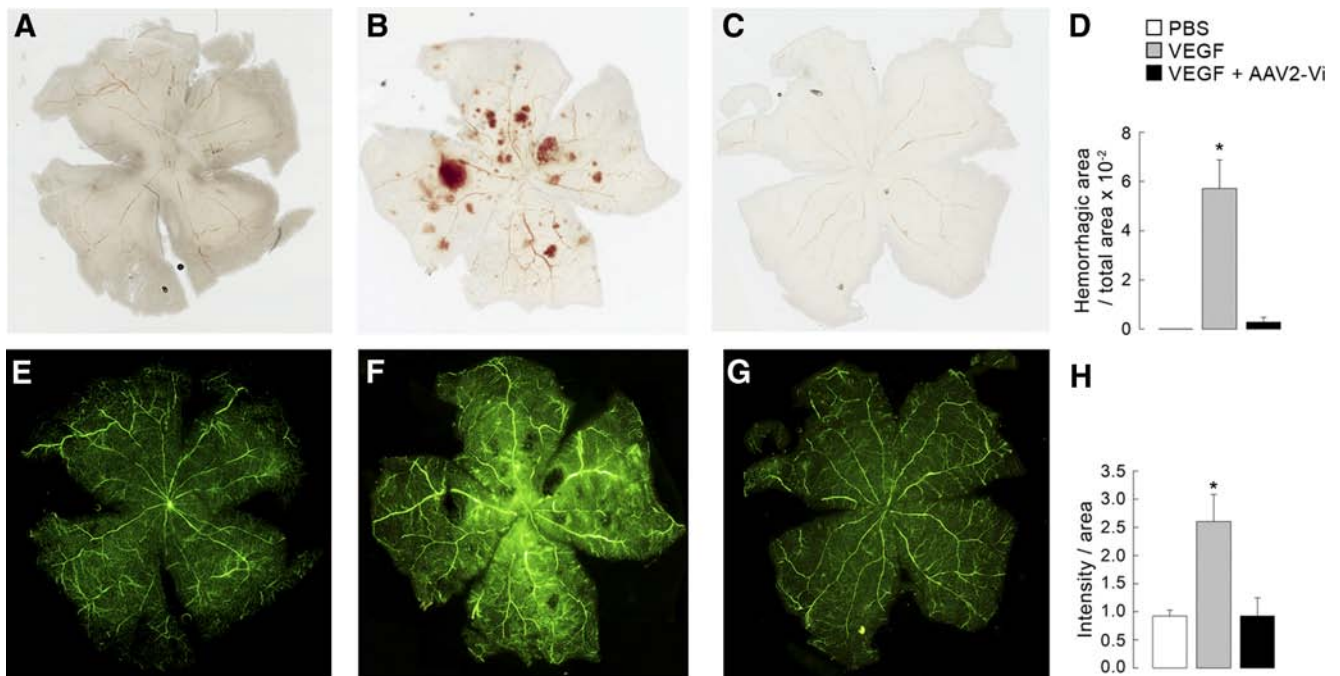


FIGURE 3. The intravitreal injection of AAV2-vasoinhibin vector inhibits VEGF-induced retinal vasopermeability. Age-matched rats were injected intravitreally with PBS (A, E) or VEGF in PBS (B, C, F, G) 1 month after receiving no injection (PBS) (A, E), vector vehicle (VEGF) (B, F), or the AAV2-vasoinhibin vector (VEGF + AAV2-Vi) (C, G). Animals were perfused with FITC-dextran 24 hours after treatment with PBS or VEGF. Representative flat-mounted retinas under light-field (A-C) and fluorescence (E-G) microscopy illustrate the presence of hemorrhages and the accumulation of FITC-dextran into the retinal parenchyma. Quantification of hemorrhagic area (D) and of FITC-dextran fluorescence intensity (H) from three and five flat-mounted retinas, respectively, is shown. * $P < 0.05$ vs. PBS- or VEGF + AAV2-Vi-injected rats.

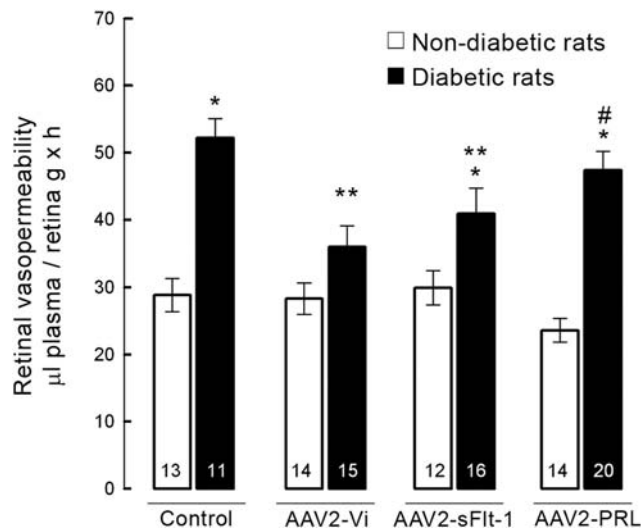


FIGURE 4. The intravitreal injection of the AAV2-vasoinhibin vector (AAV2-Vi) prevents retinal vasopermeability in diabetic rats. Evans blue evaluation of retinal vasopermeability in retinal extracts from control rats or rats made diabetic with streptozotocin 1 month after being injected intravitreally with vehicle without vector (Control) or with the AAV2-Vi, AAV2-sFlt-1, or AAV2-PRL vectors. Values are mean \pm SEM. Numbers inside bars correspond to *n* values. **P* < 0.05 vs. respective nondiabetic rats; ***P* < 0.05 vs. control diabetic rats; #*P* < 0.05 vs. AAV2-Vi diabetic rats.

DISCUSSION

In its early stages, DR is characterized by microaneurysms, enhanced vasopermeability, thickening of the retina, and formation of hard exudates, all of which lead to reduced vision when the macula is affected. Over time, ensuing retinal ischemia leads to an overproduction of proangiogenic factors, such as VEGF, that further promote the breakdown of the blood-retinal barrier and the formation of new blood vessels, causing vitreal hemorrhages, fibrosis, tractional retinal detachment, and blindness.² Inhibitors of VEGF have shown beneficial effects in clinical trials as intraocular therapeutic agents in DR and DME,^{24–28} but they are not effective in all patients and are still being used in combination with laser therapy to improve visual acuity and to help resolve the disease.^{27,28} Additionally, anti-VEGF agents need to be readministered monthly to ensure that disease does not progress. Repeated intravitreal injections increase the risk of endophthalmitis and are inconvenient for patients.³ New therapeutic modalities are needed that are capable of treating a broader segment of the patient population and that do not require numerous injections.

Vasoinhibins are attractive potential therapeutic agents for the management of DR. They are natural inhibitors of vasopermeability and angiogenesis in the retina,^{4,6,16} and their systemic concentration is reduced in patients with DR.¹² It was previously shown that adenoviral vector expression of vasoinhibins inhibits ischemia-induced retinal angiogenesis,¹¹ and that intravitreal injection of the purified vasoinhibin protein blocks VEGF-induced RVP and the increase in RVP in diabetic rats.⁵ Here we show that the intravitreal injection of an AAV2-vasoinhibin vector confers long-term protection against VEGF- and diabetes-induced accumulation of fluorescein and Evans blue tracer. Neither assay discriminates among increased RVP, blood-retinal barrier breakdown, and impaired intraretinal water clearance as the cause of tracer accumulation. All three processes occur in diabetes and are stimulated by VEGF.^{2,29,30} However, because vasoinhibins prevent VEGF-induced permeability of endothelial cell monolayers,⁵ and because the AAV2-

vasoinhibin vector reduces VEGF-induced retinal hemorrhages (Fig. 3), it is very likely that the inhibition of tracer accumulation observed in retinas transduced by the AAV2-vasoinhibin vector is largely due to a reduction of VEGF- and diabetes-induced RVP.

In this regard, the action of the AAV2-vasoinhibin vector on VEGF-induced RVP is similar to the effect of the injected vasoinhibin protein.⁵ This inhibitory effect is likely to be a property of the vasoinhibin molecule independent of the delivery method. Vasoinhibins inhibit VEGF action by blocking VEGF-induced activation of endothelial nitric oxide synthetase (eNOS),^{5,31} which is one of the signaling pathways by which VEGF stimulates vasopermeability.³² Vasoinhibins act directly on endothelial cells through a still-undefined saturable high-affinity binding site distinct from the PRL receptor,³³ and they block VEGF-induced eNOS activation by activating protein phosphatase 2A, which dephosphorylates and inactivates eNOS,⁵ and by interfering with Ca²⁺-calmodulin-dependent activation of eNOS.³¹

VEGF is the predominant mediator of elevated RVP in diabetes; its levels increase in the vitreous of patients with DR and DME^{34,35} and clinical trials using anti-VEGF molecules show reduced retinal permeability and leakage.^{24–28} Accordingly, the demonstration that the AAV2-vasoinhibin vector inhibits VEGF-induced RVP makes it an attractive potential therapeutic tool for the treatment of DR and DME. However, the development of DME depends not only on excessive RVP but also on impaired fluid absorption from the retinal tissue. The water content, retinal thickness, and osmotic swelling of Müller cells should be measured to predict the therapeutic value of AAV2-vasoinhibin vectors against DME. Notably, the pathologic cascade leading to DR and DME involves not only VEGF but also other vasoactive substances such as angiotensin-2,³⁶ erythropoietin,³⁷ bradykinin,³⁸ basic fibroblast growth factor (bFGF),³⁹ interleukin-1 β ,^{40,41} interleukin-6,⁴¹ tumor necrosis factor- α ,⁴¹ and stromal-cell-derived factor-1,⁴¹ all of which are elevated in the vitreous of patients with DR and DME and are under intensive investigation as therapeutic targets.^{38,41–45} It has been demonstrated that vasoinhibins inhibit the increase in RVP induced by the intravitreal injection of vitreous from patients with DR,⁵ and that they interfere with the vascular effects and signaling pathways of bradykinin,³¹ bFGF,⁴⁶ and interleukin-1 β .⁴⁷ Because vasoinhibins block the vascular actions of several factors, they may offer a broader and more comprehensive approach to suppress excessive RVP in diabetes than agents targeting solely VEGF.

To address this possibility, the effect of the AAV2-vasoinhibin vector on diabetes-induced RVP was compared with that of an AAV2 vector encoding sFlt-1, a natural VEGF inhibitor. sFlt-1 corresponds to the secreted extracellular domain of VEGF receptor 1, and blocks VEGF action by either sequestering VEGF or forming inactive heterodimers with membrane VEGF receptors 1 and 2.^{48,49} Previous studies have shown that sFlt-1 vectors inhibit the breakdown of the blood-retinal barrier, emphasizing the importance of VEGF as the predominant mediator of RVP in diabetes.^{50,51} In our study, both the AAV2-vasoinhibin and -sFlt-1 vectors inhibited diabetes-induced RVP. Interestingly, the AAV2-vasoinhibin vector completely blocked the diabetes-induced increase in RVP, whereas the AAV2-sFlt-1 vector reduced, but did not eliminate, this increase. The greater inhibition by the AAV2-vasoinhibin vector is consistent with vasoinhibins blocking the action of other vasopermeability factors in addition to VEGF.

AAV vectors are attractive tools for therapeutic gene transfer to the retina and are being increasingly used to target retinal disorders in animal studies.⁵² Recently, they have been successfully used to treat genetic retinal diseases in the clinic.⁵³ Our results show that the intravitreal delivery of vasoinhibins via an AAV2 vector can confer protection against excessive

RVP associated with diabetes, and suggest that these vectors may be effective therapeutic tools in DR, DME, and other vasoproliferative retinopathies. Preclinical studies of the efficacy, safety, expression, and biodistribution of the AAV2-vasoinhibin vector over longer time intervals are required to confirm this therapeutic potential. Moreover, AAV2-vasoinhibin vectors may be of benefit in other vascular-related disorders. Elevated production of vasoinhibins blocks angiogenesis, growth, leukocyte infiltration, and metastasis in experimental tumors.^{21,54-56} The value of this vector to treat these types of conditions should also be assessed.

Acknowledgments

The authors thank Fernando López-Barrera, Gabriel Nava, Nydia Hernández-Ríos, Daniel Mondragón, Antonio Prado, and Martín García for their technical assistance, and Dorothy D. Pless for critically editing the manuscript.

References

- Centers for Disease Control and Prevention. National Diabetes Fact Sheet, 2007-2008. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services.
- Kollias AN, Ulbig MW. Diabetic retinopathy: early diagnosis and effective treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2010;107:75-83, quiz 84.
- Simo R, Hernandez C. Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: hopes and fears for a new therapeutic strategy. *Diabetologia.* 2008;51:1574-1580.
- Clapp C, Thebault S, Arnold E, Garcia C, Rivera JC, de la Escalera GM. Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295:E772-E778.
- Garcia C, Aranda J, Arnold E, et al. Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest.* 2008;118:2291-2300.
- Arnold E, Rivera JC, Thebault S, et al. High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. *Diabetes.* 2010;59:3192-3197.
- Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martinez de la Escalera G. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev.* 2009;89:1177-1215.
- Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delure F, Weiner RI. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology.* 1993;133:1292-1299.
- Martini JF, Piot C, Humeau LM, Struman I, Martial JA, Weiner RI. The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol Endocrinol.* 2000;14:1536-1549.
- Duenas Z, Rivera JC, Quiroz-Mercado H, et al. Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:2049-2055.
- Pan H, Nguyen NQ, Yoshida H, et al. Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:2413-2419.
- Triebel J, Huefner M, Ramadori G. Investigation of prolactin-related vasoinhibin in sera from patients with diabetic retinopathy. *Eur J Endocrinol.* 2009;161:345-353.
- Auricchio A, Rolling F. Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer and treatment of retinal diseases. *Curr Gene Ther.* 2005;5:339-348.
- Colella P, Cotugno G, Auricchio A. Ocular gene therapy: current progress and future prospects. *Trends Mol Med.* 2009;15:23-31.
- Grimm D, Zhou S, Nakai H, et al. Preclinical in vivo evaluation of pseudotyped adeno-associated virus vectors for liver gene therapy. *Blood.* 2003;102:2412-2419.
- Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC, et al. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:2947-2953.
- Navaratna D, McGuire PG, Menicucci G, Das A. Proteolytic degradation of VE-cadherin alters the blood-retinal barrier in diabetes. *Diabetes.* 2007;56:2380-2387.
- Martin KR, Klein RL, Quigley HA. Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors. *Methods.* 2002;28:267-275.
- Xu Q, Qaum T, Adamis AP. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:789-794.
- Sinha YN. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev.* 1995;16:354-369.
- Kim J, Luo W, Chen DT, et al. Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer. *Cancer Res.* 2003;63:386-393.
- Hellstrom M, Ruitenberg MJ, Pollett MA, et al. Cellular tropism and transduction properties of seven adeno-associated viral vector serotypes in adult retina after intravitreal injection. *Gene Ther.* 2009;16:521-532.
- Caldwell RB, Bartoli M, Behzadian MA, et al. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev.* 2003;19:442-455.
- Chun DW, Heier JS, Topping TM, Duker JS, Bankert JM. A pilot study of multiple intravitreal injections of ranibizumab in patients with center-involving clinically significant diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2006;113:1706-1712.
- Cunningham ET Jr, Adamis AP, Altaweel M, et al. A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2005;112:1747-1757.
- Iturralde D, Spaide RF, Meyerle CB, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of macular edema in central retinal vein occlusion: a short-term study. *Retina.* 2006;26:279-284.
- Elman MJ, Bressler NM, Qin H, et al. Expanded 2-year follow-up of ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2011;118:609-614.
- Mitchell P, Bandello F, Schmidt-Erfurth U, et al. The RESTORE study: ranibizumab monotherapy or combined with laser versus laser monotherapy for diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2011;118:615-625.
- Reichenbach A, Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Wiedemann P, Bringmann A. Muller cells as players in retinal degeneration and edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007;245:627-636.
- Xu HZ, Le YZ. Significance of outer blood-retina barrier breakdown in diabetes and ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:2160-2164.
- Gonzalez C, Corbacho AM, Eiserich JP, et al. 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology.* 2004;145:5714-5722.
- Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:2604-2609.
- Clapp C, Weiner RI. A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology.* 1992;130:1380-1386.
- Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med.* 1994;331:1480-1487.
- Funatsu H, Yamashita H, Nakamura S, et al. Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2006;113:294-301.
- Rangasamy S, Srinivasan R, Maestas J, McGuire PG, Das A. A potential role for angiopoietin 2 in the regulation of the blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:3784-3791.
- Elayappan B, Ravinarayanan H, Pasha SP, Lee KJ, Gurunathan S. PEGF inhibits VEGF- and EPO-induced angiogenesis in retinal endothelial cells through interruption of PI3K/Akt phosphorylation. *Angiogenesis.* 2009;12:313-324.
- Gao BB, Clermont A, Rook S, et al. Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nat Med.* 2007;13:181-188.

39. Praidou A, Androudi S, Brazitikos P, Karakiulakis G, Papakonstantinou E, Dimitrakos S. Angiogenic growth factors and their inhibitors in diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev.* 2010;6:304-312.
40. Vincent JA, Mohr S. Inhibition of caspase-1/interleukin-1beta signaling prevents degeneration of retinal capillaries in diabetes and galactosemia. *Diabetes.* 2007;56:224-230.
41. Ambati J. A molecular understanding of macular edema. *Adv Stud Ophthalmol.* 2007;4:179-181.
42. Demircan N, Safran BG, Soylu M, Ozcan AA, Sizmaz S. Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye.* 2006;20:1366-1369.
43. Brooks HL Jr, Caballero S Jr, Newell CK, et al. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1 in patients with diabetic retinopathy and cystoid macular edema before and after intraocular injection of triamcinolone. *Arch Ophthalmol.* 2004;122:1801-1807.
44. Hernandez C, Fonollosa A, Garcia-Ramirez M, et al. Erythropoietin is expressed in the human retina and it is highly elevated in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema. *Diabetes Care.* 2006;29:2028-2033.
45. Grant MB, Afzal A, Spoerri P, Pan H, Shaw LC, Mames RN. The role of growth factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Expert Opin Investig Drugs.* 2004;13:1275-1293.
46. D'Angelo G, Struman I, Martial J, Weiner RI. Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:6374-6378.
47. Lee SH, Kunz J, Lin SH, Yu-Lee LY. 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway. *Cancer Res.* 2007;67:11045-11053.
48. He Y, Smith SK, Day KA, Clark DE, Licence DR, Charnock-Jones DS. Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity. *Mol Endocrinol.* 1999;13:537-545.
49. Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;226:324-328.
50. Gehlbach P, Demetriades AM, Yamamoto S, et al. Periocular gene transfer of sFlt-1 suppresses ocular neovascularization and vascular endothelial growth factor-induced breakdown of the blood-retinal barrier. *Hum Gene Ther.* 2003;14:129-141.
51. Ideno J, Mizukami H, Kakehashi A, et al. Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. *Int J Mol Med.* 2007;19:75-79.
52. Rolling F. Recombinant AAV-mediated gene transfer to the retina: gene therapy perspectives. *Gene Ther.* 2004;11(suppl 1):S26-S32.
53. Cideciyan AV, Hauswirth WW, Aleman TS, et al. Human RPE65 gene therapy for Leber congenital amaurosis: persistence of early visual improvements and safety at 1 year. *Hum Gene Ther.* 2009;20:999-1004.
54. Bentzien F, Struman I, Martini JF, Martial J, Weiner R. Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1(-/-) mice. *Cancer Res.* 2001;61:7356-7362.
55. Nguyen NQ, Cornet A, Blacher S, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis establishment by adenovirus-mediated gene transfer delivery of the antiangiogenic factor 16K hPRL. *Mol Ther.* 2007;15:2094-2100.
56. Tabruyn SP, Sabatel C, Nguyen NQ, et al. The angiostatic 16K human prolactin overcomes endothelial cell anergy and promotes leukocyte infiltration via nuclear factor- κ B activation. *Mol Endocrinol.* 2007;21:1422-1429.

ANEXO II. LISTA DE ABREVIATURAS

AAV	Virus adenoasociado
Ang	Angiopietina
BMP-1	Proteína morfogénica de hueso tipo 1
CCG	Capa de células ganglionares
CFN	Capa de fibras nerviosas
CNE	Capa nuclear externa
CNI	Capa nuclear interna
CPE	Capa plexiforme externa
CPI	Capa plexiforme interna
DM	Diabetes mellitas
EMD	Edema macular diabético
eNOS	Sintetasa de óxido nítrico endotelial
Epo	Eritropoietina
EPR	Epitelio pigmentario retiniano
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2
Gal	Galardina (GM 6001/Ilomastat)
HEK	Línea celular de células embrionarias de riñón humano
IGF-1	Factor de crecimiento tipo insulina 1
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton
LCA	Amaurosis congénita de Leber
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
MOI	Multiplicidad de infección
MLI	Membrana limitante interna
MMP	Metaloproteasas de matriz
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEDF	Factor derivado del epitelio pigmentario
PKC	Proteína cinasa C
PIGF	Factor de crecimiento derivado de la placenta
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
PRL	Prolactina
PVR	Permeabilidad vascular retiniana
rAAV	Virus adenoasociado recombinante
RD	Retinopatía diabética
RDP	Retinopatía diabética proliferativa
RDNP	Retinopatía diabética no proliferativa
RT	Retrotranscripción
SDF-1	Factor derivado del estroma tipo 1
sFlt-1	Forma soluble del receptor del VEGF tipo 1
STZ	Estreptozotocina
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TSP	Trombospondina
uPA	Activador del plasminógeno tipo urocinasa
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGF-R1	Receptor tipo 1 del VEGF (Flt-1)
VEGF-R2	Receptor tipo 2 del VEGF (KDR)
vg	Genomas de vector
Vi	Vasoinhibina