



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

ESCUELA DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOLÓGICA Y AMBIENTAL

Doctorado en Biotecnología

**DESARROLLO DE MODELOS CELULARES Y ANIMALES PARA
EL ESTUDIO DE TERAPIA GÉNICA NO VIRAL ANTI-
ANGIOGÉNICA EN RETINA**

- Tesis doctoral -

Anna Salas Torras

Los directores de la tesis:

Dr. José García Arumí
Catedrático de Oftalmología.
Universitat Autònoma de
Barcelona

Dr. Simo Schwartz Navarro
Jefe del grupo CIBBIM-
Nanomedicina. Direccionamiento y
liberación farmacológica.
Vall d'Hebrón Institut de Recerca.

Dra. Ibane Abasolo Olaortua
IP del grupo CIBBIM-
Nanomedicina. Direccionamiento y
liberación farmacológica.
Vall d'Hebrón Institut de Recerca.

Bellaterra, Junio 2017

A la meva família.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	13
I1. EL OJO	15
I1.1. LA RETINA Y LA FUNCIÓN VISUAL	16
I1.2. EL SISTEMA VASCULAR OCULAR	19
I2. PATOLOGÍA DE LA RETINA	20
I2.1. PRINCIPALES ENFERMEDADES OCULARES CAUSANTES DE PÉRDIDA DE VISIÓN	20
I2.2. LA RETINOPATÍA DIABÉTICA	21
I2.2.1. Progresión y principales acontecimientos patológicos de la RD	22
I2.2.2. Principales terapias para la RD	24
I2.3. LA DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD	26
I2.3.1. Progresión y patogenia de la DMAE	27
I2.3.2. Principales terapias para la DMAE	28
I3. MODELOS ANIMALES DE RD Y DMAE	30
I3.1. PRINCIPALES MODELOS DE RD	30
I3.1.1. Modelo de RD en rata inducido con estreptozotocina (STZ).	32
I3.2. PRINCIPALES MODELOS DE DMAE	33
I3.2.1. Modelo de DMAE húmeda: neovascularización coroidea inducida con láser en ratón	34
I4. FACTORES IMPLICADOS EN EL CONTROL DE LA NEOVASCULARIZACIÓN OCULAR	35
I4.1. EL FACTOR DERIVADO DE EPITELIO PIGMENTADO	36
I4.1.1. Propiedades tróficas del PEDF	37
I4.1.2. Propiedades neuroprotectoras del PEDF	38
I4.1.3. Propiedades anti-angiogénicas del PEDF	38
I4.1.4. El PEDF como factor terapéutico en RD y DMAE	39
I4.2. LA SOMATOSTATINA	39
I4.2.1. Propiedades neuromoduladoras de la SST	40
I4.2.2. Propiedades anti-angiogénicas de la SST	41
I4.2.3. La SST como agente terapéutico en RD y el DMAE	41
I5. NANOMEDICINA Y TERAPIA GÉNICA OCULAR	42
I5.1. TERAPIA GÉNICA OCULAR	42
I5.2. TERAPIA GÉNICA NO VIRAL	46
I5.2.1. ADN desnudo	46
I5.2.2. Métodos físicos	46
I5.2.3. Métodos químicos	47
I5.3. NPS POLIMÉRICAS POLIPEPTÍDICAS: R9-GFP-H6	49
I5.4. NPS POLISACÁRIDAS: QUITOSANOS	51
OBJETIVOS	53
MATERIAL Y MÉTODOS	57
MM1. CULTIVOS CELULARES	59
MM1.1. LÍNEAS CELULARES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS	59
MM1.1.1. Protocolo de sub-cultivo	59

MM1.2.	ENSAYO DE PROLIFERACIÓN ENDOTELIAL	60
MM1.2.1.	Ensayo MTT	60
MM1.3.	ENSAYO DE MIGRACIÓN ENDOTELIAL	61
MM1.4.	ENSAYO DE FORMACIÓN TUBULAR	61
MM1.4.1.	Establecimiento del co-cultivo de fibroblastos y células endoteliales	61
MM1.4.2.	Ensayo de angiogénesis con PEDF y SST	62
MM1.4.3.	Immunocitoquímica anti-vWf	62
MM1.5.	ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN	63
MM1.5.1.	Transfección con X-Treme	63
MM1.5.2.	Inmunocitoquímica	63
MM1.5.3.	Citometría de Flujo	65
MM1.5.4.	Extracción de RNA y qPCR	65
MM2.	GENERACIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN DE PEDF, SST Y tDTOMATO.	66
MM2.1.	MATERIALES Y REACTIVOS	66
MM2.2.	CLONACIÓN DIRECCIONADA DE LOS GENES PEDF, SST Y tDTOMATO EN EL VECTOR PMC.BESPX	66
MM2.3.	INTRODUCCIÓN DEL PROMOTOR VMD-2 Y LA SECUENCIA S/MAR EN LOS PLÁSMIDOS PMC.PEDF, PMC.SST Y PMC.tDTOMATO.	68
MM2.3.1.	Extracción de ADN genómico de ARPE-19	68
MM2.3.2.	Clonación direccionada de las secuencias VMD-2 y SMAR	68
MM2.4.	GENERACIÓN DE LOS MINICÍRCULOS	71
MM2.4.1.	Generación de bacterias ZCY10P3S2T electrocompetentes	71
MM2.4.2.	Generación de los minicírculos	71
MM3.	EXPERIMENTOS CON ANIMALES: TÉCNICAS IN VIVO	72
MM3.1.	ANIMALES USADOS EN LOS PROCESOS EXPERIMENTALES	72
MM3.2.	GENERACIÓN DEL MODELO DE DIABETES INDUCIDO CON ESPREPTOZOTOCINA (STZ) EN RATA	73
MM3.3.	GENERACIÓN DEL MODELO DE NEOVASCULARIZACIÓN COROIDEA EN RATÓN MEDIANTE FOTOCOAGULACIÓN CON LÁSER	74
MM3.4.	ELECTRORETINOGRAMA	75
MM3.4.1.	Electroretinograma Ganzfeld en el modelo de diabetes inducida en rata	75
MM3.4.2.	Electroretinograma focal en el modelo de NVC en ratón	76
MM3.5.	ANGIOGRAFÍA FLUORESCÉINICA	77
MM3.5.1.	AF en modelo de diabetes en rata	77
MM3.5.2.	AF en modelo de NVC en ratón	77
MM3.6.	TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA	78
MM3.7.	INYECCIÓN SUB-RETINIANA	78
MM4.	EXPERIMENTOS CON ANIMALES: TÉCNICAS POST-MORTEM	79
MM4.1.	EUTANASIA Y PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS	79
MM4.2.	TÉCNICAS DE ANÁLISIS GENÉTICO	80
MM4.2.1.	Extracción de RNA	80
MM4.2.2.	Retrotranscripción y PCR a tiempo real	80
MM4.3.	TÉCNICAS DE ANÁLISIS HISTOLÓGICO	80
MM4.3.1.	Hematoxilina/Eosina	80
MM4.3.2.	Inmunofluorescencia en <i>flat-mounts</i>	81
MM4.3.3.	Inmunofluorescencia en criosecciones	81
MM4.3.4.	TUNEL	82
MM5.	PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS PROTEICAS R9-GFP-H6	83

MM6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	84
RESULTADOS	85
RESULTADOS - PARTE I: ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> DE LA ACCIÓN ANTI-ANGIOGÉNICA DEL FACTOR DERIVADO DE EPITELIO PIGMENTADO Y LA SOMATOSTATINA	87
R1.1- EL PEDF Y LA SST INHIBEN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES INDUCIDA POR VEGF	89
R1.2- EL PEDF Y LA SST INHIBEN LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES INDUCIDA POR VEGF	89
R1.3- EL PEDF Y LA SST INHIBEN LA FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS TUBULARES <i>IN VITRO</i>	91
RESULTADOS - PARTE II: GENERACIÓN DE MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE TERAPIA GÉNICA OCULAR CON PEDF Y SST	93
R2.1- MODELO INDUCIDO DE RETINOPATÍA DIABÉTICA NO PROLIFERATIVA EN RATA	95
R2.1.1. Inducción de la diabetes con STZ	95
R2.1.2. Evaluación <i>in vivo</i> de la función visual	96
R2.1.2.1. Análisis del ERG a 1 mes post-inducción.	97
R2.1.2.2. Análisis del ERG a 2 meses post-inducción.	99
R2.1.2.3. Análisis del ERG a 3 meses post-inducción.	101
R2.1.2.4. Progresión cronológica de la respuesta ERG de ratas STZ.	103
R2.1.3. Análisis angiográfico	105
R2.1.4. Evaluación <i>post-mortem</i> de los eventos patológicos en la retina	106
R2.1.4.1. Análisis morfológico	107
R2.1.4.2. Análisis de la expresión génica	108
R2.1.4.3. Análisis inmunohistoquímico	109
R2.2- MODELO DE NEOVASCULARIZACIÓN OCULAR EN RATÓN	111
R2.2.1. Generación del modelo de NVC mediante fotocoagulación con láser verde de 532 nm	111
R2.2.2. Caracterización <i>in vivo</i> de la progresión de las lesiones	113
R2.2.3. Evaluación de la función visual mediante electroretinograma focal (fERG)	116
R2.2.4. Cuantificación de las áreas neovasculares mediante inmunofluorescencia en <i>flat-mounts</i>	118
R2.2.5. Evaluación de la expresión génica	119
R2.2.6. Evaluación histológica	122
R2.3- INYECCIÓN SUB-RETINIANA PARA ADMINISTRACIÓN DE TERAPIA GÉNICA OCULAR	124
R2.3.1. Puesta a punto de la técnica de inyección sub-retiniana en roedores	124
R2.3.2. Caracterización de los eventos derivados de la inyección	125
R2.3.3. Transfección con <i>Lipofectamina</i> [®] y plásmido de expresión de tdTomato en EPR de rata mediante inyección sub-retiniana	126
RESULTADOS - PARTE III: ESTUDIO DE SISTEMAS NO VIRALES DE TERAPIA GÉNICA EN RETINA	129
R3.1- GENERACIÓN DE VECTORES NO VIRALES DE EXPRESIÓN DE PEDF Y SST	131
R3.1.1. Clonación de los vectores plasmídicos	131
R3.1.2. Generación de los minicírculos	131
R3.1.3. Análisis <i>in vitro</i> de la expresión de tdTomato, SST y PEDF	133
R3.2- ESTUDIO DE LAS NANOPARTÍCULAS PROTEICAS R9-GFP-H6 COMO SISTEMAS TRANSFERENCIA GÉNICA NO VIRAL EN RETINA	135
R3.2.1. Producción y caracterización de las nanopartículas R9-GFP-H6	135
R3.2.2. Estudios de unión a ADN plasmídico	137

R3.2.3.	Estudios de transfección <i>in vitro</i>	138
R3.2.4.	Estudios de transfección <i>in vivo</i>	139
R3.3-	ESTUDIO DE LOS QUITOSANOS NOVAFACT O15 COMO SISTEMAS DE TRANSFERENCIA GÉNICA NO VIRAL EN RETINA	140
R3.3.1.	Caracterización de los complejos quitosano-ADN	140
R3.3.2.	Estudios de transfección <i>in vitro</i>	141
R3.3.3.	Estudios de transfección <i>in vivo</i>	143
DISCUSIÓN		145
D1. EL FACTOR DERIVADO DE EPITELIO PIGMENTADO (PEDF) Y LA SOMATOSTATINA (SST) COMO CANDIDATOS PARA TERAPIA GÉNICA EN RD Y DMAE		147
D2. EL MODELO DE DIABETES TIPO I INDUCIDO CON STZ EN RATA COMO MODELO DE RD		149
D3. EL MODELO DE NEOVASCULARIZACIÓN COROIDEA INDUCIDA CON LÁSER EN RATÓN COMO MODELO DE DMAE HÚMEDA		153
D4. ESTRATEGIAS DE TERAPIA GÉNICA NO VIRAL EN RETINA		156
D4.1.	EL VECTOR PLASMÍDICO	157
D4.2.	TÉCNICA DE INYECCIÓN SUB-RETINIANA PARA LA ADMINISTRACIÓN DE LA TERAPIA GÉNICA	158
D4.3.	ESTUDIO DE DOS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE TRANSFERENCIA NO VIRAL EN RETINA	160
D4.3.1.	Nanopartículas proteicas R9-GFP-H6 como sistemas de transferencia genética no viral en retina	161
D4.3.2.	Nanopartículas poliméricas de quitosano O15 como sistemas de transferencia genética no viral en retina	162
D5. ÚLTIMOS APUNTES Y PERSPECTIVAS FUTURAS		163
CONCLUSIONES		167
BIBLIOGRAFÍA		171

INTRODUCCIÓN

La visión es el sentido más importante para muchas especies, incluido los humanos. Ninguna otra de las señales sensoriales llega al cerebro en semejante variedad y ninguna es procesada por tantas áreas corticales como las señales visuales.

11. EL OJO

El ojo es el órgano encargado de detectar la luz y transformar la energía lumínica en señales eléctricas que son enviadas al cerebro a través del nervio óptico. La estructura del globo ocular es muy similar en la mayoría de vertebrados, y consta de tres capas (figura I-01): la capa externa, que incluye la esclerótica y en la parte anterior la córnea transparente; la capa media, que incluye la coroides, con abundantes vasos sanguíneos, y el tejido conjuntivo del cuerpo ciliar y el iris; y la capa interna, llamada retina. En esta última se encuentran las células neuronales sensibles a la luz (fotorreceptores) y otras neuronas encargadas de la transmisión de la señal eléctrica, junto con células gliales y una fina capa de células epiteliales cúbicas que contienen melanina (el epitelio pigmentado de la retina, o EPR). Externamente, la retina descansa en la coroides e internamente está en contacto con el humor vítreo, un gel transparente que rellena el espacio entre la retina y el cristalino. El cristalino, la lente ajustable que permite enfocar las imágenes captadas, actúa, junto con el iris, de separación entre la cámara anterior y la cámara posterior, que contienen el humor acuoso (Kaufman y Alm, 2004).

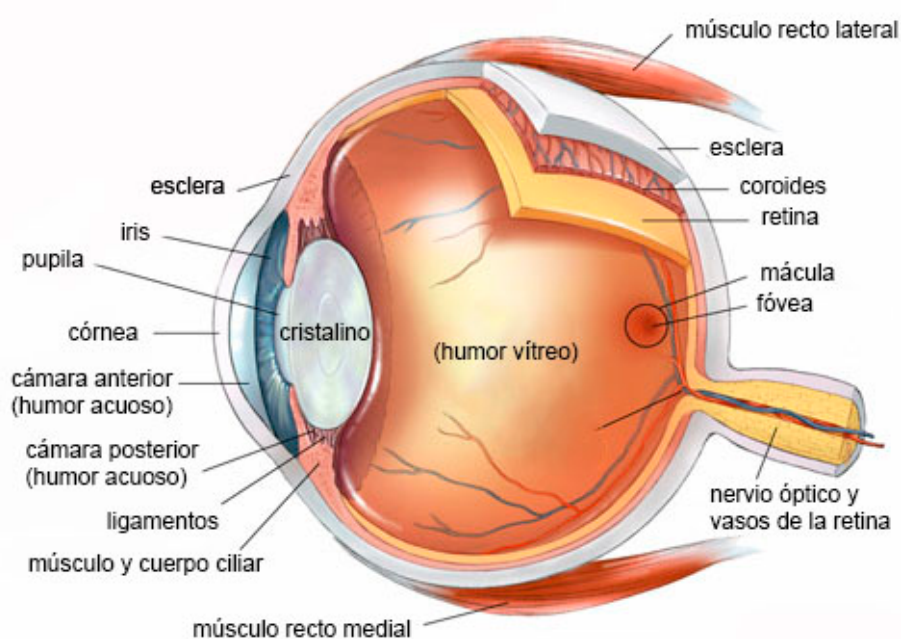


Figura I-01: Anatomía del ojo. Principales componentes del ojo humano (imagen adaptada de <https://scienceeasylearning.wordpress.com>).

11.1. La retina y la función visual

La retina neural forma parte del sistema nervioso central ya que embriológicamente deriva del tubo neural. Tiene un grosor aproximado de unos 100-200 μm , dependiendo de la especie, y consta de varias capas de células ordenadas según su función en el ciclo visual, formando una red compleja de conexiones sinápticas (figura I-02). Existen tres capas de núcleos que se pueden distinguir fácilmente en la retina. La capa nuclear externa (ONL, del inglés) contiene los cuerpos celulares de los fotorreceptores (los conos y los bastones), que captan la energía luminosa y la transforman en señal eléctrica. La capa nuclear interna (INL, del inglés) contiene los cuerpos celulares de las células horizontales, bipolares y amacrinas, junto con los cuerpos celulares de las células gliales radiales (células de Müller). Por último, la capa de células ganglionares (GCL, del inglés) que también contiene células amacrinas desplazadas, conforman la vía de salida de la retina hacia el cerebro a través del nervio óptico. Estas tres capas de células están separadas por dos capas sinápticas o plexiformes que contienen la gran mayoría de dendritas y sinapsis: la capa plexiforme externa (OPL, del inglés), que se encuentra entre la capa nuclear externa y la capa nuclear interna, y la capa plexiforme interna (IPL, del inglés), separando la capa nuclear interna y la capa de células ganglionares (Ryan *et al.*, 2013).

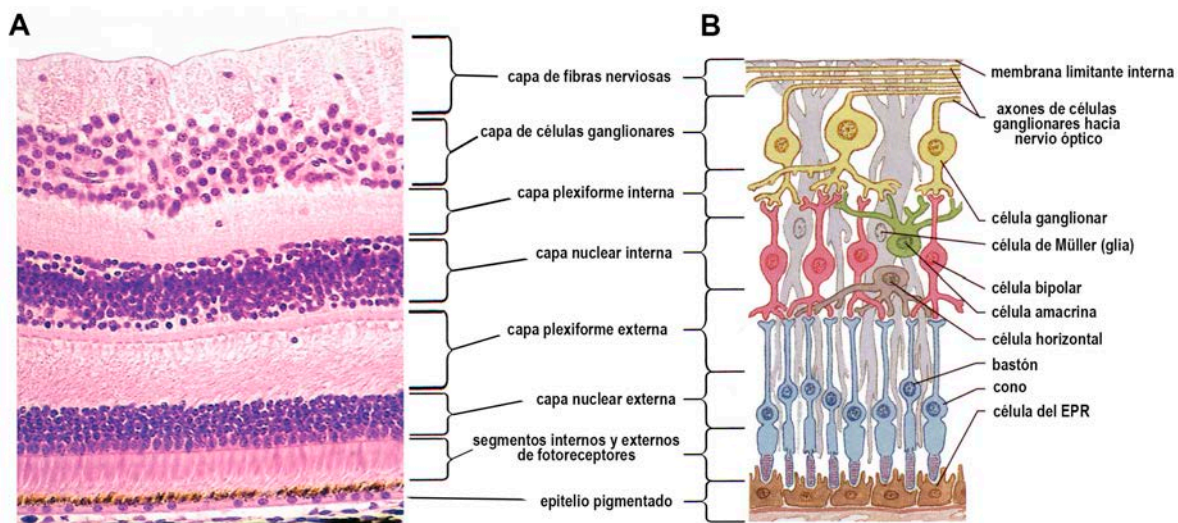


Figura I-02: Capas de la retina. Situación de las distintas capas de la retina en (A) una tinción hematoxilina-eosina de una criosección de retina humana, y (B) un esquema de la retina, con los distintos tipos celulares presentes (Imágenes adaptadas de *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas* y www.netterimages.com).

La comunicación entre las neuronas de la retina se establece principalmente por neurotransmisión química. Esta se basa en la liberación de neurotransmisores (normalmente los aminoácidos glutamato, GABA y glicina, más acetilcolina, dopamina y serotonina) por parte de la neurona pre-sináptica, la difusión de éstos a través de la hendidura sináptica, y finalmente la unión a una variedad de receptores en la membrana de la célula post-sináptica. Además de la neurotransmisión química,

muchas neuronas están directamente conectadas vía sinapsis eléctricas conocidas como uniones Gap, formadas por poros compuestos de conexinas que conectan directamente dos células y permiten el paso de iones y pequeñas moléculas a través de ellos.

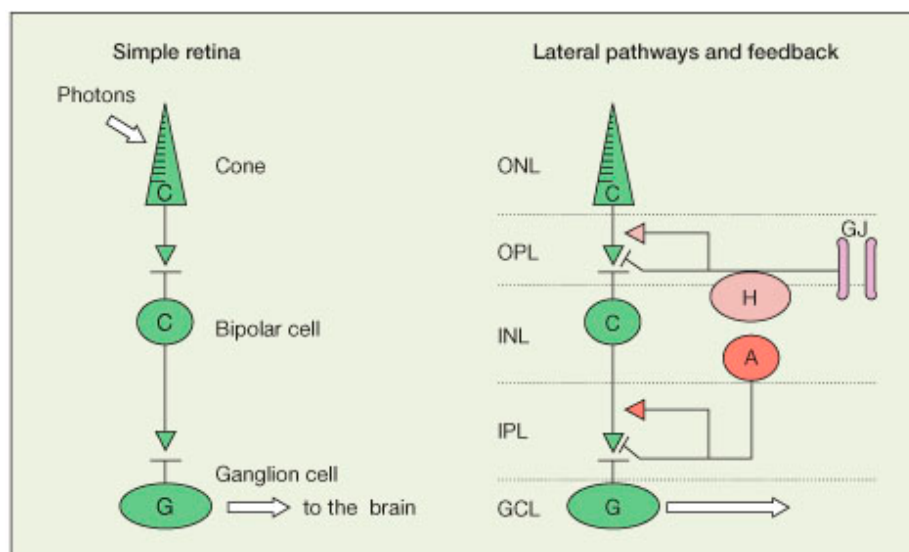


Figura I-03: Circuitos neuronales simples. A la izquierda, diagrama del circuito más simple que contiene la esencia de la transmisión a través de la retina. Los conos (C) contactan con las células bipolares (B) que, a su vez, contactan con las células ganglionares (G). Además de la vía vertical, existen elementos laterales, mostrados en el diagrama de la derecha. Las células horizontales (H) generan un *feedback* negativo a los conos. Las células amacrinas (A) son muy diversas y tienen varias funciones, como por ejemplo proveer de un segundo *feedback* a las células bipolares. Figura tomada del libro *Retina* (imagen extraída de Ryan *et al.* Elsevier, 2013)

Las conexiones entre las neuronas de la retina forman los circuitos retinales. El más simple de todos es una cadena de 3 neuronas: fotorreceptor – célula bipolar – célula ganglionar. Esta es la llamada vía vertical, la vía más corta y rápida de transmisión hacia fuera de la retina. Además de esta vía vertical, existen dos clases de interneuronas laterales: las células horizontales, que proveen un *feedback* negativo a los conos, y las células amacrinas, que tienen diversos roles. (figura I-03).

El otro componente principal de la retina es el **epitelio pigmentado de la retina o EPR**, que es una monocapa de células pigmentadas situada entre la neuroretina y la coroides, considerada parte de la retina debido a su origen neuroectodérmico. Las células del EPR se encuentran polarizadas, formando, por un lado, una membrana apical que se enfrenta a los segmentos externos de los fotorreceptores, y por el otro lado, una membrana basal que linda con la membrana de Bruch, la cual separa el EPR del endotelio fenestrado de los coriocapilares.

El EPR es esencial para un correcto funcionamiento de la retina debido a sus múltiples funciones, tal y como se detallan en la figura I-04 y se describen a continuación (Simó, 2009).

Por un lado, el EPR es el encargado del transporte de nutrientes, iones y agua entre el espacio sub-retiniano y la coroides. El EPR toma nutrientes como glucosa, retinol, ácido ascórbico y ácidos grasos del torrente sanguíneo y los libera a los fotorreceptores. En el otro sentido, transporta electrolitos y agua desde el espacio sub-retiniano hacia la coroides estabilizando la composición iónica, lo cual es crucial para el mantenimiento de la excitabilidad de los fotorreceptores (Steinberg, 1985).

Otra función del EPR es la absorción de luz y protección de la retina frente a la fotooxidación. La retina es el único tejido neural que recibe una exposición directa y frecuente a la luz, hecho que favorece la fotooxidación de los lípidos, que se convierten en productos extremadamente tóxicos. El EPR controla esta fotooxidación absorbiendo y filtrando la luz mediante varios pigmentos (melanina, lipofucsina) contenidos en gránulos en el interior de sus células (Beatty *et al.*, 1999).

En tercer lugar, el EPR es un elemento clave en el ciclo visual debido a su función de intercambio de retinoides. Se encarga de la reisomerización de todo el *trans*-retinol, producido por los fotorreceptores en la absorción de luz, a 11-*cis*-retinal, y retorno de este a los fotorreceptores. Esta función es realizada por la proteína RPE-65 y es esencial para un correcto ciclo visual. (Wu *et al.*, 2007).

Por otro lado, el EPR es el encargado de la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores. Los fotorreceptores, debido a la constante exposición a la luz y a su elevada actividad metabólica, acumulan una gran cantidad de proteínas y lípidos de desecho que se van acumulando en sus segmentos externos, los cuales están sometidos a un proceso constante de renovación. El EPR fagocita todos estos productos de desecho y favorece, por tanto, un funcionamiento adecuado de estas células así como el mantenimiento de su excitabilidad (Nguyen-Legros and Hicks, 2000).

Finalmente, el EPR produce y secreta factores de crecimiento así como varios factores esenciales para la integridad estructural de la retina y la coroides, como son el factor derivado de epitelio pigmentado (PEDF), el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF-1, FGF-2 Y FGF-5) y muchos otros, así como miembros de la familia de las interleuquinas, quimiocinas y otros factores relacionados con el sistema inmunitario. Esta función secretora promueve la supervivencia de los fotorreceptores y asegura la base estructural para una óptima circulación y suplemento nutricional (Tanihara *et al.*, 1997).

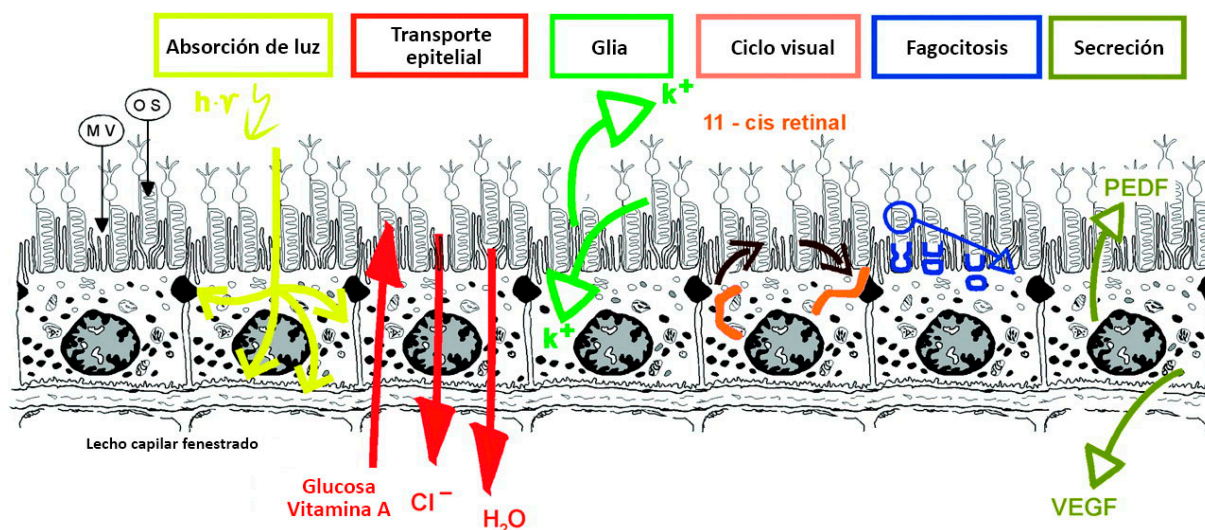


Figura I-04: Resumen de las funciones del EPR. MV: microvilli; OS: segmento externo, del inglés. (Imagen adaptada de Strauss *et al.*, 2005).

Además de estas funciones, la presencia de uniones estrechas (*tight junctions*) entre las células del EPR lo convierten en la **barrera hemato-retiniana externa** de la retina, ejerciendo un control estricto de los fluidos y solutos que cruzan a través de él y previniendo la entrada de moléculas tóxicas y componentes del plasma en la retina. Esta función de barrera del EPR, junto con la secreción de factores inmunosupresivos, contribuye al estado de inmunoprivilegio del ojo (Strauss, 2005).

I1.2. El sistema vascular ocular

La retina es el tejido del organismo que tiene una demanda metabólica más elevada (Saari 1987; Buttery *et al.*, 1991) y, debido a esto, la capacidad de regular el flujo sanguíneo es esencial. Esta demanda metabólica entra en conflicto con la necesidad de una interferencia mínima en el paso de la luz hasta los fotorreceptores, hecho que ha forzado a la evolución a desarrollar dos redes vasculares para el sustento de la retina: la **vasculatura retiniana**, que nutre las dos terceras partes internas de la retina, penetrando desde la membrana limitante interna hasta la capa nuclear interna, y la **vasculatura coroidea**, que nutre los fotorreceptores en la tercera parte externa de la retina, a través del epitelio pigmentado (figura I-05).

Los patrones circulatorios de la red vascular retiniana varían mucho entre especies (De Schaepprijver *et al.*, 1989). En los humanos, la vasculatura de la retina consta de una arteria retiniana central que entra por el disco óptico a través de la lámina cribosa y se ramifica en cuatro arterias intra-retinales principales. Éstas a su vez se bifurcan para formar ramas arteriales pequeñas y arteriolas terminales, que alimentan un lecho capilar a medida que se extienden hacia la retina periférica.

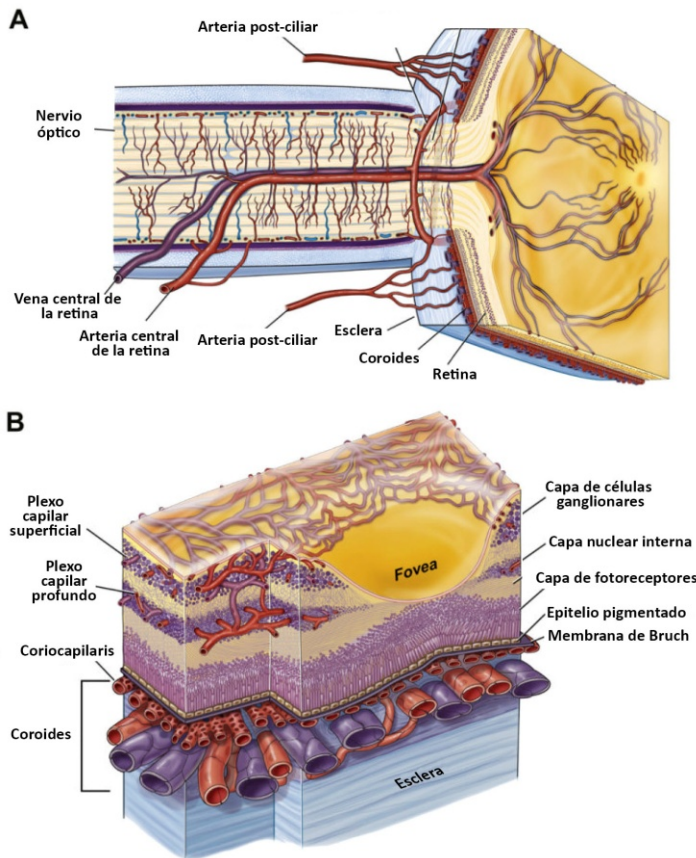


Figura I-05: Anatomía de la circulación ocular. (A) Esquema de un corte transversal por el eje superior-interior del ojo humano, a través del nervio óptico, mostrando el suministro vascular de la retina y la coroides. (B) Esquema de la vasculatura de la retina y la coroides. (Imagen adaptada de Kur *et al.*, 2012).

El sistema venoso de la retina tiene una disposición similar, con una vénula retiniana central que abandona el ojo a través del disco óptico. Los capilares de la retina se organizan en una red bicapa interconectada: una capa superficial localizada en la capa de células ganglionares y una segunda capa más profunda localizada en las capas nuclear interna y plexiforme externa (Kur *et al.*, 2012). Los microvasos de la retina no son fenestrados y poseen complejos de uniones estrechas entre las células endoteliales en su cara luminal. Esta característica representa el componente estructural de la **barrera hemato-retiniana interna**. La circulación coroidea deriva principalmente de las arterias ciliares, y se divide en cinco capas. Desde la retina, primero encontramos la membrana de Bruch, seguido de tres capas vasculares y terminando por la capa supracoroidea. En contraste con la retina, los microvasos de la coroides son fenestrados (Bill *et al.*, 1980) (figura I-05).

I2. PATOLOGÍA DE LA RETINA

I2.1. Principales enfermedades oculares causantes de pérdida de visión

Existen un sinnúmero de afecciones oculares que afectan en mayor o menor medida a la pérdida de visión. Generalmente se clasifican según la parte del ojo afectada (conjuntiva, párpados, córnea, retina,...) y pueden tener orígenes diversos. Según el origen pueden ser infecciosas, debidas a errores

refractivos, causadas por un trauma o tener causas ambientales o genéticas. Además, las afecciones oculares pueden ser o no degenerativas.

En particular, a nivel de la retina, las patologías degenerativas pueden ser debidas enteramente a una causa genética o pueden ser una combinación de causas ambientales y genéticas. Las enfermedades degenerativas de la retina más prevalentes en los países industrializados son la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y la retinopatía diabética (RD).

12.2. La Retinopatía Diabética

En las últimas décadas, la diabetes mellitus (DM) se ha convertido en una epidemia en todo el mundo. Según las estimaciones, 422 millones de adultos en todo el mundo tenían diabetes en 2014, frente a los 108 millones de 1980, pasándose de una prevalencia del 4,7% al 8,5% en la población adulta (Organización mundial de la Salud, 2016). Estudios epidemiológicos sugieren que en el 2050 el número de personas de afectadas de diabetes se habrá triplicado, indicando una carga importante en los sistemas de salud pública por los costos médicos directos y la pérdida de trabajo y sueldos. Se trata por tanto de un problema relevante en países en desarrollo, con importantes implicaciones en la salud global.

De entre todas las afectaciones derivadas de la diabetes, la **retinopatía diabética** (RD) es una de las más importantes, siendo la principal causa de pérdida de visión en adultos entre 20 y 70 años. Se estima que más del 60% de los pacientes con diabetes Mellitus tipo 2 y prácticamente todos los pacientes con diabetes Mellitus tipo 1 sufrirán algún tipo de retinopatía (Shaya y Aljawadi, 2007), y esto se debe a que la estructura única de la retina comporta limitaciones fisiológicas especiales en comparación con otros tejidos del sistema nervioso, que la hace más susceptible a la hiperglicemia.

La RD se ha definido como una microangiopatía de la retina que involucra cambios en la pared vascular y en las propiedades reológicas de la sangre. La combinación de estos factores deriva en la oclusión de los capilares y subsiguiente isquemia y extravasación en la retina, siendo los típicos cambios morfológicos la pérdida de pericitos y células endoteliales y el engrosamiento de la membrana basal (Kollias y Ulbig, 2010). Sin embargo, la RD es una enfermedad multifactorial y su patogenia es extremadamente compleja, involucrando múltiples células de la retina, como las células de Müller, las ganglionares, las endoteliales y las células del epitelio pigmentado. Los principales mecanismos que contribuyen a la fisiopatología de la RD son la hiperglicemia, la inflamación y la disfunción neuronal (Bhagat *et al.*, 2009), sumado a otros factores sistémicos como la hipertensión y la hiperlipidemia, e incluso factores genéticos.

12.2.1. Progresión y principales acontecimientos patológicos de la RD

La patogénesis del desarrollo de la RD es muy compleja, involucrando muchos mecanismos interconectados, que acaban derivando en daño celular y cambios adaptativos en la retina (Robinson *et al.*, 2012). Los mecanismos exactos por los cuales la hiperglicemia inicia las alteraciones vasculares o neuronales no se ha definido completamente, aunque se conoce que las principales vías metabólicas alteradas, cruciales en el desarrollo de la RD, son las vías del poliol y la hexosamina, la síntesis *de novo* de proteína kinasa C (PKC) y la producción de radicales libres y productos finales de glicación avanzada (AGEs), junto con la activación de procesos inflamatorios. La activación de todas estas vías desemboca en la aparición de anomalías en la retina neural (neurodegeneración retiniana) y en el lecho capilar localizado en la retina interna (daño microangiopático). No se sabe con certeza qué ocurre primero, si los defectos vasculares o los daños neuronales. En este sentido, la hipótesis más probable es que estos dos acontecimientos sean interdependientes, existiendo una retroalimentación de la disfunción neuronal-vascular, que empieza poco después de la aparición de la diabetes y aumenta con el tiempo (Antonetti *et al.*, 2006).

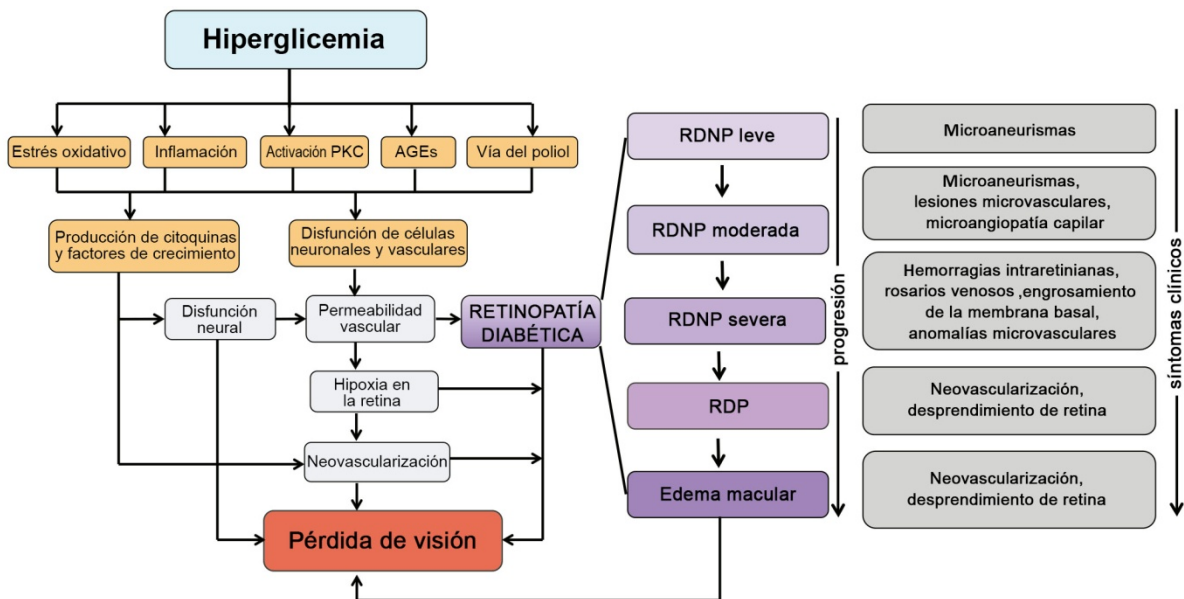


Figura I-06: Diagrama de los factores clave involucrados en la patogénesis de la RD y los síntomas clínicos evidentes en los distintos estadios de la patología. RDNP: retinopatía diabética no proliferativa, RDP: retinopatía diabética proliferativa. (Imagen adaptada de Robinson *et al.*, 2012).

Durante el desarrollo de la retinopatía diabética, las alteraciones metabólicas iniciales desencadenan varias alteraciones: la retina sufre una clara disfunción microvascular, con cambios en el flujo sanguíneo, disfunción de la barrera hemato-retiniana, engrosamiento de la membrana basal, pérdida de pericitos y pérdida de células endoteliales. También aparecen cambios en el EPR y la coroides (el EPR se vuelve disfuncional y provoca una extravasación desde la coriocapilaris). Hay una clara neurodegeneración, caracterizada por una apoptosis de células de la retina, principalmente de células

ganglionares, y aparición de gliosis reactiva con sobreexpresión de proteína ácida glial fibrilar (GFAP) en las células de Müller. También se da inflamación y activación de células inmunitarias ya desde etapas muy tempranas de la RD, caracterizada por una leucostasis en los vasos sanguíneos que acaba provocando oclusión y no-perfusión en los capilares, y una desregulación en la expresión de factores inflamatorios como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1 y TNF- α , principalmente por parte de las células de Müller y la microglía de la retina. Por último, la diabetes también produce una isquemia en la retina, debida a la disfunción progresiva del tejido neurovascular y el consecuente déficit de perfusión. A medida que aumenta la isquemia, aparecen los microaneurismas y finalmente acaban provocando la aparición de neovascularización retiniana, típica característica de la retinopatía diabética proliferativa (Stitt *et al.*, 2016). En la figura I-06 se esquematizan los diferentes acontecimientos que desencadenan la retinopatía diabética y su progresión hacia la pérdida de visión, así como los síntomas clínicos.

En la clínica, debido a la facilidad de visualización de la vasculatura retiniana, la clasificación de los distintos grados de RD se ha basado en la severidad de las lesiones vasculares, habiendo dos principales grados: la retinopatía diabética no proliferativa (RDNP) y la retinopatía diabética proliferativa (RDP) (figura I-07). La RDNP se sub-clasifica en leve, moderada y severa según la clase de anomalías y la cantidad de éstas presentes. Cuando la RD afecta la mácula, se llama “maculopatía diabética” y está caracterizada principalmente por la presencia de edema macular (EMD), que es la principal causa de pérdida de visión en los pacientes diabéticos. Aunque esta maculopatía puede aparecer en cualquier etapa de la RD, es más prevalente en las fases más avanzadas.

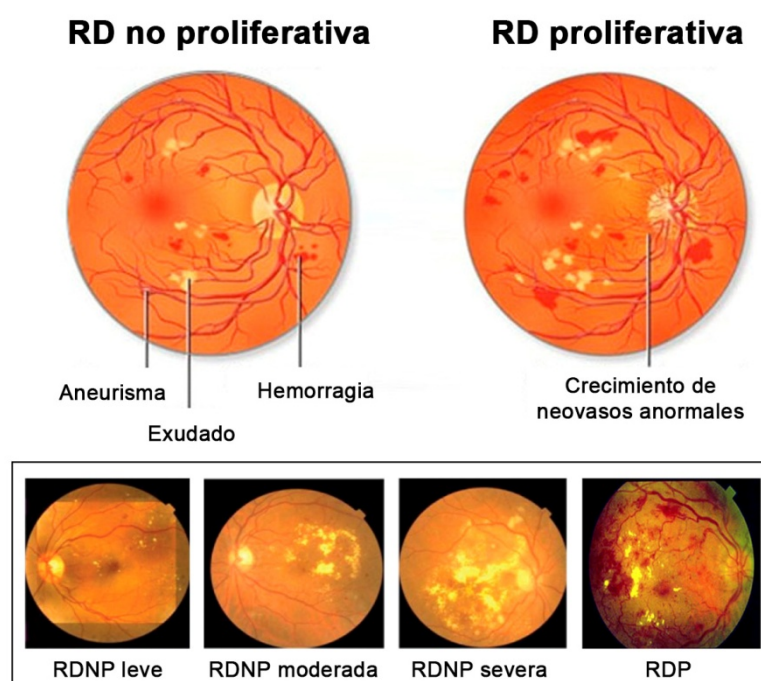


Figura I-07: Clasificación clínica de las distintas etapas de la RD. (Imagen adaptada de la *A.D.A.M Health Illustrated Encyclopedia*).

12.2.2. Principales terapias para la RD

Actualmente, los únicos tratamientos disponibles para la RD, a parte de las actuaciones preventivas como la regulación de la hiperglicemia, la prevención de la dislipidemia, el control de la hipertensión o la cesión del tabaquismo, se centran en las etapas más avanzadas de la patología (RDP y EMD). Estas etapas avanzadas son donde la vasculopatía ya ha progresado a hemorragias intraretinianas, neovascularización y desprendimiento de retina y, por tanto, donde se da una mayor pérdida de visión en los pacientes. Los tratamientos en estas fases incluyen la fotocoagulación con láser, la cirugía vítreo-retiniana y la inyección intra-vítrea de corticosteroides y fármacos anti-VEGF (Stitt *et al.*, 2016).

La fotocoagulación con láser es el principal tratamiento establecido para la RDP y el EMD. El objetivo de esta técnica es la regresión de los neovasos como consecuencia de la normalización de la presión parcial de oxígeno en las áreas avasculares de la retina periférica, que también acaba induciendo un menor riesgo de hemorragias y formación de membranas (Kollias y Ulbig, 2010). Esta intervención previene el deterioro de la visión si se aplica lo suficientemente temprano, pero normalmente no provoca una recuperación de la visión, y está asociado con efectos adversos severos, como son una reducción en la adaptación a los cambios de la luz, una cierta pérdida de agudeza visual, pérdida de visión periférica, cambios en la percepción de los colores y exacerbación del edema macular (Simó y Hernández, 2015). La técnica de cirugía vítreoretiniana o vitrectomía de la *pars plana* se suele aplicar cuando existe hemorragia en el vítreo, glaucoma, desprendimiento de retina traccional o edema macular traccional. Permite la eliminación del cuerpo vítreo y de las membranas y cuerdas cicatriciales, así como el posicionamiento correcto de la retina para un óptimo tratamiento con láser (Gandorfer y Kampik, 2000). Aunque ésta es una técnica de demostrada eficacia en el restablecimiento de la visión, también tiene sus efectos adversos típicos derivados de una cirugía.

En cuanto a la farmacoterapia, los glucocorticoides intravítreos, usados preferentemente para el tratamiento del edema macular diabético, han demostrado una gran eficacia anti-angiogénica y anti-inflamatoria, estabilizando la barrera hemato-retiniana interna (Grover *et al.*, 2008). Sus limitaciones incluyen principalmente el limitado tiempo de vida que tienen, de sólo 3 meses, cosa que requiere de una administración repetida. También se ha visto que aproximadamente un tercio de los pacientes desarrolla glaucoma secundario al tratamiento con estos fármacos. Por esta razón, la dexametasona se usa sólo como un tratamiento alternativo. El tratamiento con agentes anti-VEGF administrados por vía intravítrea, usado ampliamente en el tratamiento de la degeneración macular proliferativa (comentados posteriormente), ha emergido en los últimos años como un nuevo tratamiento para fases más avanzadas de RDP, y actualmente se están desarrollando los ensayos clínicos para validar su eficacia (revisado por Cheung *et al.*, 2014). Estos estudios aportan evidencias de que esta terapia

es mejor que la terapia con láser tanto en prevenir como en mejorar la visión de pacientes con EMD (Virgili *et al.*, 2014). Sin embargo, estos tratamientos también tienen la limitación del corto tiempo de vida, requiriendo de múltiples inyecciones intravítreas, cosa que comporta ciertos efectos adversos como el incremento de riesgo de endoftalmitis y desprendimiento de retina. Además, se piensa que un tratamiento prolongado con inyecciones intravítreas de anti-VEGF podría derivar en neurodegeneración del resto de retina sana y un incremento en el riesgo de trastornos circulatorios en la coriocapilaris (Simó *et al.*, 2015).

Otra de las principales estrategias en estudio actualmente es la administración sistémica de inhibidores de PKC. Esta proteína juega un papel importante en la progresión de la angiogénesis y es inducida por la hiperglicemia. Ya se han realizado ensayos clínicos en fases I/II con el inhibidor de kinasas *Midostaurina* (PKC412. Novartis Pharma. Campochiaro *et al.*, 2004), donde se reportaron reducciones significativas en el grosor de las retinas tratadas, así como incremento de la agudeza visual, aunque se encontraron varios efectos adversos como el incremento de transaminasas en hígado y el empeoramiento del control de la glicemia. También se realizaron estudios con el inhibidor selectivo de PKC, *Ruboxistaurin mesilate* mediante administración oral (RBX; LY333531. Eli Lilly and Company. Aiello *et al.*, 2006) que reportaron una disminución en las anomalías hemodinámicas derivadas de la diabetes sin aparición de efectos adversos, así como la disminución del flujo sanguíneo anormal en la retina y la disfunción de células endoteliales, aunque los estudios sugieren que el tratamiento con este fármaco no es capaz de prevenir la neovascularización.

Otro de los factores propuestos son los análogos de somatostatina (SST). Se han realizado varios ensayos clínicos administrando octreótido intramuscular en pacientes con RDP moderada o severa, revelando una disminución en la incidencia de la progresión a RDP (Grant, *et al.*, 2000; Boehm, *et al.*, 2001). Se postula que estos análogos de SST pueden inhibir la angiogénesis directamente a través de los receptores de SST en las células endoteliales e indirectamente a través de la inhibición de las señales post-receptor de varios factores de crecimiento como IGF-1 o VEGF.

Aunque todos estos tratamientos puedan reducir la progresión de la RD en sus fases más avanzadas, cada vez hay más necesidad de investigar nuevas opciones terapéuticas capaces de prevenir o retardar la aparición y progresión de la RD.

12.3. La Degeneración Macular Asociada a la Edad

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una enfermedad crónica progresiva que afecta el área central de la retina llamada mácula. Es una de las principales causas de pérdida de visión en adultos de países desarrollados, siendo la principal causa de ceguera en personas de más de 65 años (Lim *et al.*, 2012).

La manifestación clínica más temprana y una de las principales características de la DMAE es el desarrollo de **drusas**, unos depósitos extracelulares de glicoproteínas, lípidos y debris celulares localizados entre el EPR y la membrana de Bruch. La categorización de estos cuerpos drusenoides es la base de la clasificación de las distintas fases de la DMAE. La DMAE temprana esta caracterizada por la presencia de pocas drusas de tamaño medio y anomalías pigmentarias. La DMAE intermedia esta caracterizada por la presencia de al menos una drusa grande y varias de tamaño medio, junto con atrofia geográfica que no se extiende hacia el centro de la mácula. Finalmente, la DMAE avanzada se puede manifestar en dos fenotipos diferenciados: la **DMAE “seca” o atrófica**, caracterizada por una atrofia progresiva del EPR, la coriocapilaris y los fotorreceptores en el centro de la mácula, acompañado de drusas grandes en esta región; y la **DMAE “húmeda” o exudativa**, caracterizada por la invasión del espacio sub-retiniano por neovasos emergentes desde la coroides, llamada neovascularización coroidea (NVC). Esta última provoca exudación de fluido, lípidos y sangre, que conduce a una cicatrización fibrótica y muerte de fotorreceptores (Jager *et al.*, 2008). La figura I-07 muestra ejemplos de fondo de ojo y representaciones de las distintas fases de la DMAE.

El principal factor de riesgo de la DMAE es la edad. Se calcula que más del 10% de las personas de más de 80 años padecen DMAE. A este factor se suman factores ambientales como son el tabaquismo, la obesidad, las dietas pobres en vitamina A y E, zinc, luteína y ácidos grasos omega-3, y los estilos de vida no saludables asociados a riesgo cardiocirculatorio. También aumentan el riesgo de padecer DMAE factores oculares como la pigmentación oscura del iris, la cirugía de catarata y la hipermetropía.

En los últimos años se han presentado fuertes evidencias de factores genéticos asociados a DMAE. Hasta la fecha, se han asociado 34 loci genéticos, que abarcan 52 variantes genéticas. Uno de los genes más bien estudiados es el factor H del complemento (CFH). También se han relacionado otros genes de la vía del complemento como C2, CFB, C3 y CFI, genes de la vía del colesterol (LIPC, CETP, ABCA1), genes de la vía del colágeno (COL10A1 y COL8A1) y el gen de la vía de la matriz extracelular TIMP3. Finalmente, también se han descrito loci en genes relacionados con angiogénesis, como el VEGFA (Sergejeva *et al.*, 2016).

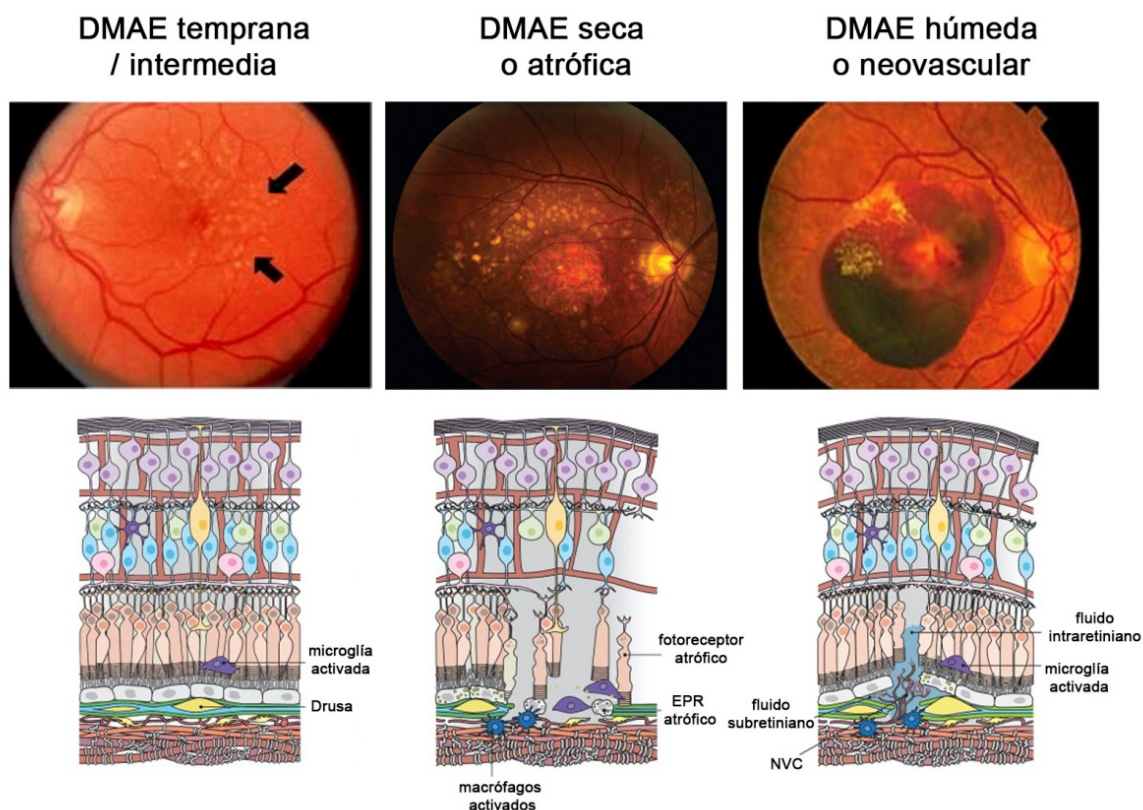


Figura I-08: Fases de la DMAE. Ejemplos de fotos de fondo de ojo de pacientes en las tres fases y representación gráfica de los principales acontecimientos (Imagen adaptada de van Lookeren Campagne *et al.*, 2014).

12.3.1. Progresión y patogenia de la DMAE

Los mecanismos de progresión de la DMAE es un tema que aún queda por dilucidar. Hay varios estudios y revisiones bibliográficas que apuntan a distintas causas implicadas en la patología, y en todas ellas se apunta al EPR como el punto de partida, estableciendo que la disfunción y la atrofia de estas células es el principal acontecimiento que precede a las etapas más avanzadas de la DMAE (atrofia geográfica o NVC) (Ambati y Fowler, 2012).

Las causas moleculares de la disfunción del EPR son muy heterogéneas.

En el caso de la NVC, se apunta a una diafonía del EPR con los sistemas inmunitario y vascular, llamado “eje inmunovascular”. La activación del complemento y el incremento de estrés oxidativo provocan la secreción de factores pro-angiogénicos por parte del EPR y otras células inmunitarias, como el VEGF-A, induciendo y exacerbando la aparición de NVC (Nozaki *et al.*, 2006). Paralelamente, se ha reportado una respuesta inmunitaria promovida por el EPR, que también induce la NVC. En este punto, la regulación del complemento por parte del EPR juega un papel muy importante, ya que los factores activos del complemento C3a y C5a son agentes quimiotácticos muy potentes que inducen el reclutamiento de leucocitos en la coroides (Nozaki *et al.*, 2006). El incremento en el

número de macrófagos en retina es una de las principales características de la NVC, así como la microglía y otras células inmunitarias que pueden modular la patogénesis de la NVC (Grossniklaus *et al.*, 2002).

En cuanto a la DMAE seca o atrófica, la principal característica molecular es la presencia de acumulaciones tóxicas, tanto dentro de las células del EPR como en la interfase entre la membrana de Bruch y el EPR (drusas). La acumulación de toxinas dentro del EPR se puede explicar por una disfunción de las mitocondrias. Estas sufren mutaciones en su ADN y alteración de la integridad estructural que deriva en una función mitocondrial defectuosa. Como consecuencia, se produce una reducción en la producción de energía y una desregulación entre los factores pro- y anti-apoptóticos, llevando a la muerte celular (Lin y Beal, 2006). Además de las mitocondrias defectuosas, también se acumulan otras toxinas como lipofucsina, que en presencia de luz forma especies reactivas del oxígeno (ROS, en inglés) tóxicas para el EPR (Winkler *et al.*, 1999). Por último, se ha relacionado la actividad de la enzima ribonucleasa DICER1 con la funcionalidad y el estado de salud de las células del EPR, debido a su influencia en la inflamación y la expresión global de ARN (codificante y no codificante). Se ha reportado que esta enzima se encuentra disminuida en pacientes con atrofia geográfica (Kaneko *et al.*, 2011), acompañado de un aumento aberrante del ARN no codificante *Alu*, que es tóxico para las células del EPR. Trabajos publicados recientemente han identificado un complejo de inmunidad innata llamado inflammasoma NLRP3 que se activa en respuesta al aumento del ARN *Alu*, llevando a la secreción de IL-18 y la muerte del EPR (Tarallo *et al.*, 2012).

12.3.2. Principales terapias para la DMAE

Todos los tratamientos que se han desarrollado en las últimas décadas para el tratamiento de la DMAE han estado enfocados únicamente a frenar los procesos de neovascularización y exudación que se dan en las fases más avanzadas de la DMAE húmeda. A fecha de hoy, no existe aún ningún tratamiento eficaz en la prevención de la DMAE en sus fases más tempranas, así como tampoco en el tratamiento de la atrofia en las fases más avanzadas de DMAE seca.

Uno de los primeros tratamientos establecidos fue la fotocoagulación con láser en el área de NVC para inducir el cierre de la estructura neovascular. Aunque este tratamiento dio buenos resultados reduciendo la pérdida de visión severa a largo término, se vio limitado por la falta de recuperación de visión, los elevados índices de recurrencia y el riesgo de pérdida visual moderada inmediata. Este tratamiento actualmente a penas se usa, sólo en casos concretos de lesiones clásicas bien delimitadas de localización extrafoveal.

Otro tratamiento que se desarrolló en los años XX fue la terapia fotodinámica, consistente en la inyección, en primer lugar, de un colorante fotosensible por vía intravenosa que, en una segunda

fase, es activado en el tejido neovascular por la acción de un láser de longitud de onda determinada que activa el fármaco e induce un daño selectivo en dicho tejido, ocasionando la oclusión de la estructura neovascular. Este tratamiento demostró una eficacia en la reducción del riesgo de pérdida visual moderada y severa en casos de CNV clásica, aunque también produjo una ligera pérdida de visión en varios pacientes y el porcentaje de pacientes que experimentó una mejora de agudeza visual fue escaso (Verteporfin In Photodynamic Therapy Study Group, 2001), hechos que han desplazado esta terapia de la primera línea de actuación.

El tratamiento más representativo y prometedor que se ha desarrollado hasta la fecha para el tratamiento de la DMAE húmeda es el tratamiento farmacológico con **agentes antiangiogénicos**. Cuando, a mediados de los años 90, el VEGF se reveló como uno de los principales factores implicados en los procesos de neovascularización, Ferrera *et al.*, al desarrollaron del primer tratamiento anti-VEGF para el tratamiento de cáncer, basado en un anticuerpo monoclonal llamado Bevacizumab (Avastin; Genentech). Subsiguientemente, la importancia del VEGF fue validada en la neovascularización ocular y esto llevó al desarrollo de fármacos anti-VEGF específicos para el tratamiento de la DMAE. Entre ellos encontramos el Pegaptanib sódico (Eyeteq, Pfizer), un oligonucleótido que se une específicamente a la isoforma 165 del VEGF, bloqueándolo e impidiendo su unión al receptor VEGFR; el Ranibizumab (Lucentis, Genentech), un fragmento del anticuerpo monoclonal recombinante humanizado anti-VEGF, que bloquea todas las isoformas del VEGF y permite una mayor penetración retiniana; y el Aflibercept (VEGF-TRAP-Eye, Eylea), una proteína de fusión de las porciones de los dominios extracelulares de los receptores 1 y 2 del VEGF humano fusionados con la porción Fc de la IgG humana, que funciona bloqueando los receptores 1 y 2 de VEGF. Todos estos fármacos se administran de forma intravítrea y suelen tener un tiempo de vida medio de entre 15 días y 2 meses, dependiendo de la molécula. Se ha demostrado en todos los casos que el tratamiento con estos fármacos no sólo frena el proceso de neovascularización y reduce la presencia de líquido sub-retiniano, también provoca una mejora en la agudeza visual de los pacientes y una estabilización de la pérdida de visión, hechos que los han convertido en los tratamientos de referencia para la DMAE exudativa (Lim *et al.*, 2012). En contraste con los buenos resultados obtenidos con estas terapias, existen dos importantes controversias: en primer lugar, la necesidad estricta de una administración mensual de los fármacos, hecho que puede conllevar ciertos efectos secundarios como son la endoftalmitis o el desprendimiento de retina, a parte del elevado coste que supone para los servicios de sanidad pública; y en segundo lugar, una cuestión referente a la seguridad -en particular a la seguridad sistémica- ya que los anticuerpos inyectados intraocularmente también pasan a la circulación y por tanto pueden inhibir el VEGF sistémico, pudiendo incrementar los riesgos de enfermedad cardiovascular y apoplejía hemorrágica.

A parte de los tratamientos para la DMAE húmeda, en los últimos años se han puesto muchos esfuerzos en investigar terapias para la prevención de la progresión de la DMAE en etapas más tempranas. Por ejemplo, se han realizado estudios con suplementación oral con antioxidantes, que han demostrado una cierta eficacia en el frenar la progresión de DMAE intermedia a DMAE avanzada (Age-Related Eye Disease Study Research Group. 2001), aunque este tratamiento puede no ser adecuado para todos los pacientes.

Otras aproximaciones que se están investigando para el tratamiento de la DMAE son la inhibición del complemento, que en fases pre-clínicas ha demostrado que puede mejorar la DMAE seca y también reducir la NVC (Bora *et al.*, 2007); el uso de esteroides para inhibir el sistema inmunitario en el tratamiento de la NVC, usados en tándem con otros tratamientos como los anti-VEGF (Becerra *et al.*, 2011); o el uso de la terapia génica para la sobre-expresión de agentes anti-proliferativos, como el PEDF (Deering *et al.*, 2003). En todos estos casos ya se están realizando ensayos clínicos, aunque es necesario la realización de más investigación en modelos animales (Ambati y Fowler, 2012).

13. MODELOS ANIMALES DE RD Y DMAE

Durante las últimas décadas se han invertido muchos esfuerzos en la investigación de modelos animales que mimeticen las principales patologías oculares, como son la RD y la DMAE. Estos modelos son de vital importancia para el estudio de la biología y el desarrollo de estas enfermedades, así como para el desarrollo y testado de nuevas terapias.

Las especies más utilizadas en investigación pre-clínica son la rata y el ratón, debido a su fácil manipulación, corto ciclo reproductivo, bajo costo de mantenimiento y su fondo genético parecido al de los humanos, cosa que permite extrapolar los resultados experimentales.

13.1. Principales modelos de RD

Normalmente los modelos de diabetes se obtienen por inducción química, pancreatectomía quirúrgica o mediante manipulación genética. Las especies más utilizadas para el estudio de los mecanismos moleculares de la patogénesis de la RD son la rata y el ratón. En la tabla I-01 se describen los principales modelos murinos, tanto inducidos como espontáneos, y sus principales características. La principal limitación de estos modelos es que, aunque reproducen la mayoría de las características de las etapas tempranas de la RD, no se ha encontrado que desarrollen de una forma reproducible las etapas neovasculares más tardías de la patología. Esto probablemente es debido al

corto tiempo de vida de estas especies y, por tanto, a la corta duración de la diabetes (Robinson *et al.*, 2012).

Tabla I-01: Principales características de los modelos murinos de RD. (Adaptado de Robinson, *et al.* 2012).

Modelo animal	Tipo de diabetes	Edad de desarrollo de la diabetes	Lesiones retinianas	Referencias
Rata				
STZ	Tipo 1	3 días después de la inyección de STZ	Pérdida de pericitos, extravasación vascular, disrupción de la barrera hemato-retiniana, pérdida de células ganglionares, daño en las células endoteliales, oclusión vascular de capilares de la retina, engrosamiento de la membrana basal	Robison <i>et al.</i> , 1991; Anderson <i>et al.</i> , 1995; Miyamoto <i>et al.</i> , 1999; Xu <i>et al.</i> , 2004; Gastinger <i>et al.</i> , 2006; Zheng and Kern, 2010
Galactosemia	-	-	Pérdida de pericitos, capilares acelulares, anomalías microvasculares intra-retinianas, engrosamiento de la membrana basal	Kern and Engerman, 1995
BB	Tipo 1	2-5 meses	Pérdida de pericitos, capilares acelulares, disrupción de la barrera hemato-retiniana, engrosamiento de la membrana basal	Blair <i>et al.</i> , 1984 Sima <i>et al.</i> , 1985
WBN/Kob	Tipo 1	9-21 meses	Capilares acelulares, engrosamiento de la membrana basal	Miyamura <i>et al.</i> , 1998 Bhutto <i>et al.</i> , 1999 Tsuji <i>et al.</i> , 2009
SDT	Tipo 1	5-6 meses	Pérdida de pericitos, capilares acelulares, extravasación vascular, desprendimiento de retina con proliferación fibrosa	Yamada <i>et al.</i> , 2005; Kakehashi <i>et al.</i> , 2006; Sasase <i>et al.</i> , 2010
ZDF	Tipo 2	1-2 meses	Pérdida de pericitos, capilares acelulares, engrosamiento de la membrana basal	Danis <i>et al.</i> , 1993 Yang <i>et al.</i> , 2000 Behl <i>et al.</i> , 2008
GK	Tipo 2	1-2 meses	Incremento de los ratios células endoteliales:pericitos	Agardh <i>et al.</i> , 1997
Ratón				
STZ	Tipo 1	3 días después de la inyección con STZ	Pérdida de pericitos, capilares acelulares, apoptosis de células vasculares, pérdida de células ganglionares, adelgazamiento de la retina	Martin <i>et al.</i> , 2004; Leichman <i>et al.</i> , 2005
Galactosemia	-	-	Pérdida de pericitos, capilares acelulares, microaneurismas, engrosamiento de la membrana basal	Kern and Engerman, 1996a
NOD	Tipo 1	8 meses	Pérdida de microvasos de la retina, proliferación focal de nuevos vasos desordenados	Makino <i>et al.</i> , 1980 Shaw <i>et al.</i> , 2006 Lee <i>et al.</i> , 2008
db/db	Tipo 2	1-2 meses	Pérdida de pericitos, capilares acelulares, disrupción de la barrera hemato-retiniana, engrosamiento de la membrana basal	Midena <i>et al.</i> , 1989; Clements <i>et al.</i> , 1998; Cheung <i>et al.</i> , 2005
Ins2-Akita	Tipo 1	1 mes	Incremento de la permeabilidad vascular, capilares acelulares, adelgazamiento de la retina, pérdida de células ganglionares	Barber <i>et al.</i> , 2005; Gastinger <i>et al.</i> , 2008
Akimba	Tipo 1	1 mes	Microaneurismas, extravasación vascular, exudados venosos, tortuosidad, pérdida capilar, hemorragias, posible neovascularización, edema retiniano	Rakoczy <i>et al.</i> , 2010

A parte de los modelos murinos, también se han desarrollado modelos de RD en otras especies superiores como gatos, perros, cerdos y primates no humanos. La mayor parte de estos modelos son de diabetes tipo I, inducida químicamente o quirúrgicamente (Gardiner *et al.*, 1994; Hatchell *et al.*, 1995; Tso *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 2004). Sin embargo, existen diversas limitaciones en el uso de estos modelos animales: un elevado coste y dificultad de mantenimiento, junto con el lento desarrollo de la patología, la falta de disponibilidad de anticuerpos y reactivos moleculares específicos para estas especies y los problemas éticos que comportan su uso en experimentación. Estas limitaciones hacen que los modelos en animales pequeños (rata y ratón) sean mucho más adecuados para el estudio de la RD en la mayoría de casos.

13.1.1. Modelo de RD en rata inducido con estreptozotocina (STZ).

La estreptozotocina (STZ) es un compuesto que, administrado sistémicamente, es citotóxico para las células beta-pancreáticas, induciendo su apoptosis (Schnedl *et al.*, 1994). Por tanto, el tratamiento con STZ es comúnmente utilizado para crear modelos de diabetes tipo I en animales, donde hay una desaparición total de las células beta-pancreáticas.

El modelo de diabetes tipo I inducido por STZ, tanto en rata como en ratón, ha sido ampliamente usado en multitud de trabajos para estudiar la RD, debido a su rápida progresión y facilidad de creación, no dependiendo de manipulaciones genéticas ni de mantenimiento de colonias. La rata es el modelo más usado debido a su mayor tamaño y, por tanto, mayor índice de supervivencia bajo este tratamiento.

Los animales tratados con STZ se vuelven rápidamente incapaces de controlar la glicemia, detectándose niveles de glucosa en sangre por encima de los 250 mg/dl a 2-3 días post-tratamiento, aunque los cambios fisiológicos y bioquímicos en la retina no se han reportado hasta 1-2 meses después de la inducción (Robinson *et al.*, 2012).

Los diversos estudios publicados usando el modelo de rata inducido con STZ han demostrado la aparición de alteraciones vasculares propias de la RD no proliferativa, similares a las observadas en humanos, como son la dilatación de los vasos sanguíneos, pérdida de células endoteliales y de pericitos, aparición de microaneurismas (Alder *et al.*, 1998), degeneración de los capilares (Kern *et al.*, 2007), incremento de la leucostasis (Jousen *et al.*, 2001), y incremento de la permeabilidad vascular resultando en la disrupción de la barrera hemato-retiniana (Zhang *et al.*, 2005).

En fases más tempranas, antes de la aparición de los cambios vasculares, también se han reportado cambios en la retina como pérdida de células ganglionares y amacrinas, que se ha visto reflejado en alteraciones electroretinográficas, a nivel de los potenciales oscilatorios (Aung *et al.*, 2013), así como cambios en el grosor de las capas nuclear interna y plexiforme interna (Kusari, *et al.*, 2007; Barber *et*

al., 1998). Otros estudios han demostrado activación de la glía de la retina (células de Müller) y aparición de una cierta respuesta inflamatoria.

Este modelo, por tanto, representa un muy buen candidato para ser usado en estudios tanto de las vías moleculares de progresión de la DR como de la aplicación de posibles terapias neuroprotectoras. Sin embargo, se ha visto que existe mucha variabilidad en la aparición de las alteraciones en la retina dependiendo de la cepa de rata (Kirwin *et al.*, 2009), por lo que creímos necesario estudiarlo en curso de esta tesis.

13.2. Principales modelos de DMAE

	RPE Hyperplasia/Pigmentary Changes	Increased Autofluorescence	Immune Cell Accumulation	Choroidal Neovascularization	Retinal Neovascularization	Retinal Fibrosis	Reference	
Complement Factor Pathway			X	X	X	X	Coffey et al., 2007	
Cfh -/- mice							Ufret-Vincenty et al., 2010	
Transgenic Cfh Y402H mice	X			X	X		Cashman et al., 2011	
Transgenic C3 Overexpression mice		X	X	X	X		Nozaki et al., 2006	
C3a and C5a receptor -/- mice								
Chemokines								
Ccl2 -/- and Cor2 -/- mice	X	X	X	X	X	X	Ambati et al. 2003	
Ccl2 -/- mice*	-	X	-	X	-	-	Luhmann et al. 2009	
Cx3cr1 -/- mice	X			X	X	X*	Combadiere et al. 2007	
Ccl2/Cx3cr1 -/- mice	X	X	X	X	X	X	Tuo et al. 2007	
Oxidative Damage models								
Immunization with-CEP adducted MSA	X	X	X	X	X	X	Hollyfield et al., 2008	
Ceruloplasmin/hephaestin -/- mice		X	X	X	X	X	Hahn et al. 2004	
SOD1 knockout mice	X	X			X	X	Imamura et al. 2006	
SOD2 knockdown mice	X	X	X	X	X	X	Justilien et al. 2007	
NRF2 -/- mice	X	X	X	X	X	X	Zhao et al. 2007	
Cigarette smoke +/- high fat +/- blue light	X	X					Espinosa-Heidmann et al. 2006	
Hydroquinone in Ccl2 -/- mice							Pons et al. 2011	
OXYS Rat	X	X	X		X	X	Markovets et al. 2011	
Glucose/Lipid Metabolism								
Aging mice + high fat diet	X	X					Cousins et al. 2002	
High glycemic index diet	X	X			X		Uchiki et al. 2011, Weikel et al. 2011	
APOE -/- mice	X	X*					Dithmar et al. 2000	
APOE2/e4 transgenic mice +/- high fat	X*	X*	X*		X**	X**	Malek et al. 2005	
ApoE 3-Leiden transgenic mice +/- high fat		X	X				Kliffen et al. 2000	
Apo B100 transgenic mice + high fat	X	X					Fujihara et al 2009	
LDL receptor -/- mice + high fat	X	X*					Rudolf et al. 2005	
Vldlr -/- mice						X	Heckenlively 2003, Chen 2007	
CD36 -/- mice	X						Picard et al. 2010	
mcd/mcd mice (transgenic mutant cathepsin D)		X	X	X	X	X	Rakoczy et al. 2002	
Other								
Senescence accelerated mouse	X	X				X*	Takada et al. 1994	
Induced CNV								
Matrigel induced CNV		(X)	X		X	X	X*	Shen et al. 2006; 2. Cao et al. 2010
PEG-8 injection				X	X	X		Lyzogubov et al. 2011
PEC-injected MCP mice				X	X	X	X*	Jo et al. 2011
Rat Subretinal lipid hydroperoxide injection		(X)			X	X	X	Baba et al. 2010
VEGF Transgenic mice						X*	X**	Multiple - see text
Naturally-occurring nonhuman primate models								
Rhesus monkey age-related drusen	X	X	X		X			Multiple - see text
Cynomolgus monkey age-related drusen	X	X	X		X			Umeda et al., 2005 a
Cynomolgus monkey early-onset drusen	X			X				Multiple - see text
Japanese macaque early-onset drusen	X							Neuringer et al., 2010

Figura I-09: Principales modelos animales de DMAE. (Pennesi *et al.*, 2012).

Aunque en la actualidad existen numerosos modelos que mimetizan varios de los acontecimientos patológicos de la DMAE, aún no se dispone de ningún modelo que posea todas las características de la patología, con las propiedades descritas.

Los modelos animales de DMAE se han creado en distintas especies: ratón, rata, conejo, cerdo y primates. Los modelos en roedor ofrecen la ventaja del bajo coste, la progresión de la patología en un tiempo relativamente corto y la capacidad de realizar manipulación genética, aunque una de las principales desventajas es que tanto ratas como ratones no poseen mácula. Por el otro lado, los primates son el modelo que ofrece una similitud anatómica más cercana a los humanos, con presencia de mácula, pero son animales muy difíciles de manipular, con un elevado coste de mantenimiento y fuertes implicaciones éticas, y tienen una progresión de la patología muy lenta.

La figura I-09 resume los principales modelos disponibles de DMAE y sus características fenotípicas, tanto de DMAE seca, clasificados según la vía alterada (alteración del complemento, modelos genéticos deficientes de quimiocinas, modelos de estrés oxidativo, modelos de metabolismo de lípidos/glucosa), como de DMAE húmeda, de inducción de NVC (Pennesi *et al.*, 2012).

13.2.1. Modelo de DMAE húmeda: neovascularización coroidea inducida con láser en ratón

Aunque la DMAE es una enfermedad extremadamente compleja que se compone de varias fases, con muchos factores influenciando su progresión y diversos tipos celulares afectados, la aparición de neovascularización coroidea (NVC) en las fases más avanzadas de DMAE húmeda es uno de los eventos más relevantes, ya que es la principal causa de pérdida severa de visión en los pacientes.

Por tanto, no es de extrañar que en las últimas décadas se hayan invertido grandes esfuerzos en elucidar los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis de la NVC así como en desarrollar nuevas terapias para su tratamiento, desarrollando entre tanto modelos animales reproducibles y de rápida progresión para estos fines.

El modelo de NVC inducida por lesión con láser es uno de los más populares y más extendidos en el estudio de la NVC y de posibles tratamientos. El desarrollo de este modelo se basa simplemente en el uso de un láser para realizar lesiones o quemaduras en la retina, focalizando la energía en las capas más externas para inducir una ruptura en la membrana de Bruch. La ruptura de esta membrana permite, entonces, la invasión del espacio sub-retiniano por neovasos emergentes desde la coroides.

Este modelo traumático fue inicialmente desarrollado en primates y en ratas, donde se determinó que es necesaria la rotura de la membrana de Bruch con una determinada potencia de láser para la inducción de la NVC (Dobi *et al.*, 1989). En los años posteriores, el ratón se ha convertido en la especie de elección en la mayoría de estudios debido a su bajo coste, la posibilidad de generar

eficientemente un alto número de lesiones y el corto tiempo de desarrollo de la NVC (Tobe *et al.*, 1998).

De manera similar a la NVC que se da en la DMAE en humanos, la NVC inducida por láser sigue unas fases de desarrollo predecibles: una formación temprana de membrana, el establecimiento de una red fibrovascular madura, y la involución (Miller *et al.*, 1990). El curso temporal de desarrollo de la NVC después de la aplicación del láser es similar en rata y ratón, con la fase temprana desarrollándose en la primera semana, y el desarrollo de membranas maduras dándose entre los días 10 y 14 en la mayoría de estudios (Edelman y Castro, 2000; Tobe *et al.*, 1998). No está claro en qué momento empieza la involución, algunos investigadores han reportado un ligero aumento en las áreas neovasculares durante los primeros 30 días, mientras que otros han reportado cambios involutivos a partir del quinto día (Edelman y Castro, 2000; Giani *et al.*, 2011).

El principal inconveniente de este modelo es su incapacidad de recapitular la compleja secuencia de eventos que preceden a la aparición de NVC en la DMAE. Este es un modelo de lesión aguda e inflamación, no es resultado de una degeneración senescente prolongada. También encontramos discrepancias anatómicas, ya que la coagulación con láser provoca un daño significativo en la retina neural adyacente, en un grado mucho mayor que en la DMAE, y no se sabe a qué nivel puede este daño alterar al ambiente alrededor de la NVC.

A pesar de esto, el modelo de NVC inducida con láser ha contribuido en gran medida a nuestra actual comprensión de la patogénesis de la NVC, permitiendo el estudio de numerosos componentes de la cascada de la angiogénesis y de la vía de señalización intracelular de los factores de crecimiento, así como es estudio de varios tipos celulares involucrados como los macrófagos, las células endoteliales o el EPR, o la evaluación del rol del complemento en la NVC experimental. Además, este modelo ha respaldado multitud de estudios en fases tempranas de tratamientos para la NVC y ha ayudado a establecer la prueba de concepto para farmacoterapias de NVC (Pennesi *et al.*, 2012).

14. FACTORES IMPLICADOS EN EL CONTROL DE LA NEOVASCULARIZACIÓN OCULAR

La RD y la DMAE tienen en común la aparición de neovasos patológicos en sus fases más avanzadas, causando neovascularización retiniana o coroidea respectivamente y provocando una severa pérdida de visión. En estos acontecimientos los procesos subyacentes al crecimiento del vaso sano se desregulan y las redes vasculares se forman de una manera descontrolada y anárquica. En el caso de la DMAE, los vasos de la coroides rompen las capas celulares comprometidas de la retina externa y se

infiltran en la mácula; en cambio, en la RD se da una proliferación descontrolada de vasos en los bordes avasculares hipóxicos de la retina interna y el crecimiento mal dirigido de éstos en la cámara vítrea (Sapieha *et al.*, 2010).

La angiogénesis es el resultado de una compleja interacción entre factores de crecimiento, células endoteliales vasculares, moléculas de matriz extracelular, quimiocinas y moléculas de señalización celular. Durante los procesos patológicos se produce una pérdida del equilibrio entre los factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos en el ojo. Por un lado, se da una sobreexpresión de factores de crecimiento y citoquinas. Estos factores incluyen el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), la angiopoetina 1 y la angiopoetina 2 (Ang-1 / -2), el factor 1 derivado del estroma, el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2) Y el factor de necrosis tumoral (TNF). Por otro lado, se da una reducción de los niveles de los principales factores anti-angiogénicos como son el factor derivado del epitelio pigmentado (PEDF), la trombospondina (TSP), el TGF-B y la somatostatina (SST) (Qazi *et al.*, 2009).

14.1. El Factor Derivado de Epitelio Pigmentado

El factor derivado de epitelio pigmentado (PEDF), también conocido como SERPINF1, es una glicoproteína de 50 kDa de la familia de las serpinas que fue inicialmente identificada en el medio condicionado de células de EPR humano fetal en cultivo (Tombran-Tink y Johnson, 1989).

Hasta la actualidad sólo se ha identificado un único gen para el PEDF en todas las especies de las que se disponen datos. En humanos, el gen del PEDF tiene aproximadamente 16 kb y contiene ocho exones relativamente pequeños y siete intrones, siendo el más grande el intron 1, con 4 kb. La organización intrón-exón se encuentra altamente conservada entre especies, aunque existe cierta variabilidad en el tamaño de los intrones, incluso entre mamíferos (Barnstable y Tombran-Tink, 2004) (figura I-10A). El gen humano SERPINF1 codifica por un polipéptido de 418 aminoácidos con un péptido señal de secreción en el extremo amino-terminal, un sitio de N-glicosilación en el residuo Asn285 y una secuencia firma de serpinas YHLNQPFIFVL389 (Becerra, 1997). El producto génico maduro es secretado como una glicoproteína monomérica, con un peso molecular de 50.000 Da, de conformación globular con un péptido loop expuesto hacia el extremo carboxílico de la estructura primaria. Este loop se llama “loop del centro reactivo de serpina homólogo” (RCL, del inglés) debido a la actividad inhibitoria serin-rpteasa que confiere a las serpinas (Becerra, 2005) (Figura I-10B).

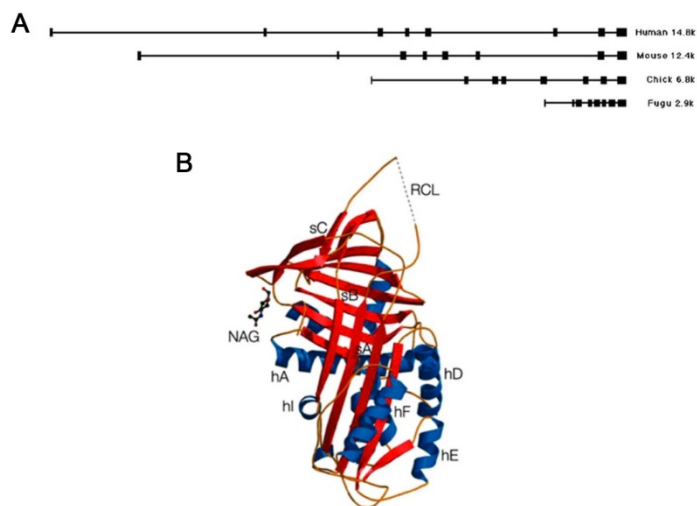


Figura I-10: Estructura genética y proteica del PEDF. (A) Organización exón-intrón del gen del PEDF en humanos, ratón, pollo y *fugu*. Cada especie tiene 8 exones de tamaño muy similar y 7 intrones de tamaño distinto (imagen tomada de Barnstable y Tombran-Tink, 2004). (B) Diagrama de cintas el PEDF glicosilado en su forma nativa, en la típica orientación serpina. El *loop* central reactivo esta marcado como RCL y la N-acetilglucosamina esta marcada como NAG (imagen tomada de Simonovic *et al.*, 2001).

En la retina, el PEDF es principalmente secretado por las células del EPR, liberándola al espacio de la matriz interfotorreceptores desde donde fluye por las distintas capas de la retina hasta alcanzar el humor vítreo. También se ha identificado otras dos fuentes de PEDF en el ojo: la córnea y el epitelio ciliar, que lo secretan, en menor cantidad, al compartimento acuoso. Fuera del ojo, la expresión de PEDF es menor pero el mRNA de este factor puede encontrarse en adipocitos, hígado y testículos (Barnstable y Tombran-Tink, 2004).

Se ha demostrado que las actividades biológicas del PEDF dependen de su unión a receptores en la superficie de las células diana. Varios estudios han demostrado la existencia receptores de alta afinidad a PEDF en la retina, neuronas, endotelio y células tumorales, aunque la definición de estos receptores es aún un tema de debate (Subramanian *et al.*, 2013).

Las principales actividades del PEDF pueden dividirse en dos grandes categorías: actividad neurotrófica/neuroprotectora y actividad anti-angiogénica. El hecho de poseer ambas características es lo que hace al PEDF un factor único en el ojo.

14.1.1. Propiedades tróficas del PEDF

Varios estudios han demostrado que el PEDF es capaz de convertir células de retinoblastoma en división a neuronas diferenciadas (Tombran-Tink y Johnson, 1989; Crawford *et al.*, 2001). Esta actividad también se ha reportado en cultivos primarios de neuronas (Houenou *et al.*, 1999). Estos hallazgos han llevado a la teoría de que una de las principales funciones del PEDF es la inhibición de

la proliferación celular. Esto, a su vez, crearía un ambiente permisivo en las células que las conduciría a su diferenciación. PEDF interrumpe la proliferación celular y promueve el inicio de la diferenciación reduciendo el número de células que entran en la fase S del ciclo celular y aumentando las que entran en fase G₀, por tanto inhibiendo la mitosis. Esta acción del PEDF se ha demostrado reportando una expresión de la proteína unida positivamente a la entrada de la fase G₀ (Hjelmeland *et al.*, 1999). Todas estas evidencias, unidas a las múltiples publicaciones que estudian el efecto del PEDF en la diferenciación de células inmaduras de la retina y el EPR, respaldan la teoría de que el PEDF juega un rol importante en el desarrollo de la retina.

14.1.2. Propiedades neuroprotectoras del PEDF

Las características neuroprotectoras del PEDF se han demostrado en varios procesos que, en su punto final, causan neurodegeneración y muerte celular: la isquemia, la excitotoxicidad del glutamato, el estrés oxidativo y la degeneración de fotorreceptores.

La isquemia es el principal factor causante de muerte en un amplio rango de neuronas. En el ojo, los eventos isquémicos están ligados a la progresión de varias enfermedades que causan ceguera como la RD y la DMAE. Se ha demostrado que el tratamiento de la retina isquémica con PEDF promueve la supervivencia de neuronas (Ogata *et al.*, 2001). En cuanto a la excitotoxicidad del glutamato, se sabe que un exceso de glutamato induce daño excitotóxico, provocando daño en la retina. El tratamiento con PEDF de neuronas en cultivo ha demostrado ser capaz de protegerlas de la muerte inducida por glutamato (De Coster *et al.*, 1999). En tercer lugar, el estrés oxidativo es un evento ampliamente estudiado como causa de muerte neuronal en retinas, también presente en varias patologías como la RD y la DMAE. Varios estudios han demostrado el efecto neuroprotector del PEDF en estas condiciones (Cao *et al.*, 1999). Finalmente, se obtuvieron resultados similares de supervivencia celular en estudios del tratamiento con PEDF en modelos *in vivo* de degeneración de fotorreceptores, demostrando un enlentecimiento de la degeneración después de una administración de PEDF intravítreo (Cayouette *et al.*, 1999). En este caso, no está claro del todo si el PEDF ejerce su función protectora directamente en los fotorreceptores o si este factor actúa primero en el EPR o las células de Müller, y son éstas las que proveen de factores tróficos para la promoción de la supervivencia de los fotorreceptores.

14.1.3. Propiedades anti-angiogénicas del PEDF

El PEDF se ha postulado como uno de los principales factores anti-angiogénicos en el ojo. Varios estudios han reportado una reducción en la expresión de PEDF en condiciones hipóxicas en células en cultivo (Dawson *et al.*, 1999), así como niveles más bajos de PEDF en humor vítreo de pacientes

con retinopatía diabética y degeneración macular (Ogata *et al.*, 2002; Holekamp *et al.*, 2002), y esta desregulación del PEDF suele ir acompañada de un incremento en el VEGF.

En este sentido, varios estudios han demostrado un efecto retro-inhibitorio entre el PEDF y el VEGF. Se ha visto que el PEDF es capaz de inhibir directamente la expresión del VEGF, así como inhibir la unión de éste a sus receptores (Zhang *et al.*, 2006), por tanto inhibiendo la acción del VEGF en la promoción de la angiogénesis retiniana o coroidea (Mori *et al.*, 2001).

14.1.4. El PEDF como factor terapéutico en RD y DMAE

Teniendo en cuenta las múltiples propiedades del PEDF tanto neurotróficas/neuroprotectoras como anti-angiogénicas, junto con el hecho de que se ha encontrado polimorfismos tanto en el gen como en su promotor asociados a DMAE y RD (Iizuka *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2015), no es de extrañar que el PEDF se haya postulado como un fuerte candidato a agente terapéutico para estas patologías, en las cuales se juntan la neurodegeneración debida a procesos de estrés oxidativo, inflamación y apoptosis, con la aparición de neovascularización patológica.

Se han realizado multitud de estudios investigando el uso del PEDF como agente terapéutico en varios modelos animales de angiogénesis ocular y de neurodegeneración, ya sea mediante directa administración intravítrea del péptido (Duh *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006), administración tópica de una fracción activa de la proteína (Liu *et al.*, 2012; Longeras *et al.*, 2012), o mediante terapia génica para la sobre-expresión de este factor en el ojo (Haurigot *et al.*, 2012; Mori *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2002). Actualmente ya existen resultados de un ensayo clínico fase I de administración intravítrea de un vector vírico de expresión de PEDF (AdPEDF.11) en pacientes con DMAE neovascular avanzada (Campochiaro, *et al.*, 2006), que han reportado ausencia de efectos adversos de la terapia, así como ausencia de toxicidades debidas a la dosis, y ya se están llevando a cabo ensayos en fase II para determinar eficacia de la terapia.

14.2. La Somatostatina

La somatostatina (SST) es un péptido que fue originalmente identificado como el factor hipotalámico responsable de la inhibición de la liberación de hormona de crecimiento por la pituitaria anterior (Brazeau *et al.*, 1973). Estudios posteriores han demostrado que la SST tiene un espectro mucho más amplio de acciones inhibitorias y que se encuentra mucho más distribuida en el cuerpo, dándose no sólo en muchas regiones del sistema nervioso central, sino también en el tracto digestivo y en la retina (Cervia *et al.*, 2008).

La SST es sintetizada como una proteína precursora larga llamada preprosomatostatina (preproSST) que es procesada enzimáticamente durante su transporte hacia el exterior celular, dando lugar finalmente a dos péptidos maduros bioactivos, derivados del extremo C-terminal de la preproSST: la somatostatina-14 (SST-14), de 14 aminoácidos, y la somatostatina-28 (SST-28), de 28 aminoácidos (figura I-11). Estos péptidos secretados realizan sus múltiples funciones biológicas a través de la interacción con receptores específicos de membrana que pertenecen a la familia de receptores unidos a proteína-G, con siete dominios transmembranales. Hasta la fecha se han identificado cinco receptores de SST (SSTRs 1-5), cada uno de los cuales gobierna distintas funciones del péptido (Patel, 1999).

En la retina, las células amacrinas han sido primeramente identificadas como la fuente principal de SST, aunque estudios recientes en ojos de donante humano han descubierto que la expresión de SST es mayor en el EPR que en la neuroretina (Carrasco *et al.*, 2007). En la retina también se encuentran expresados mayoritariamente los SSTRs 1 y 2. Esta producción simultánea de SST y sus receptores sugiere una función autocrina en este tejido (Cervia *et al.*, 2008).

La SST tiene varias funciones que contribuyen a la homeostasis de la retina, siendo las más relevantes la neuromodulación y la inhibición de la angiogénesis.

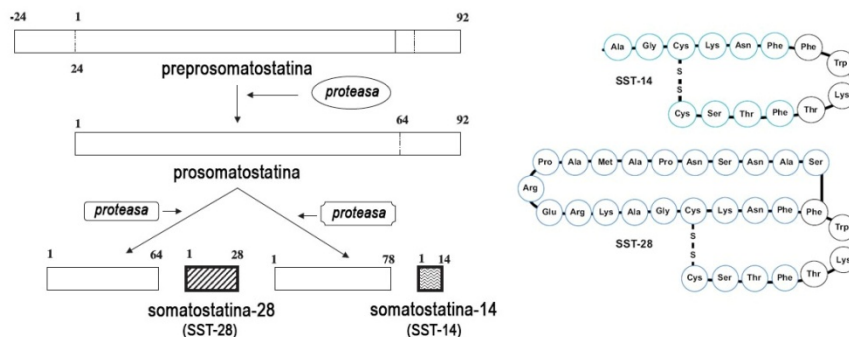


Figura I-11: Producción de las formas activas de SST. Esquema del proceso de proteólisis post-traduccional que deriva en la obtención de las dos formas bioactivas de somatostatina: SST-14 y SST-28. Secuencia aminoacídica de los dos péptidos. (Imagen adaptada de Dasgupta *et al.*, 2004 y Cuevas-Ramos *et al.*, 2016).

14.2.1. Propiedades neuromoduladoras de la SST

La SST actúa como neuromodulador a través de múltiples vías. Por un lado, la SST es capaz de regular su propia liberación a través de la activación del SSTR1 (Thermos *et al.*, 2006). También controla la liberación de dopamina a través de la unión a SSTR1 o 2 en las células amacrinas. Se ha visto que la activación de estos receptores induce la liberación de dopamina (Kouvidi *et al.*, 2006), por tanto la SST podría estar relacionada con la regulación de la adaptación a la luz. Por otra parte, la SST también está involucrada en el control de la liberación de glutamato en las células bipolares, donde se expresa

el SSTR2 (Dal Monte *et al.*, 2003). La activación de este receptor provoca la inhibición en la liberación de glutamato al espacio extracelular, representando una contribución importante a la regulación de la transmisión glutaminérgica a través de la vía visual retiniana vertical y también ejerciendo una importante función neuroprotectora contra la neurotoxicidad del glutamato, típico evento de varias enfermedades neurodegenerativas.

14.2.2. Propiedades anti-angiogénicas de la SST

La SST es un potente factor angiostático. Se ha demostrado que la SST reduce la proliferación endotelial y la neovascularización a través del SSTR2 mediante varios mecanismos incluyendo la inhibición de la señalización post-receptor de factores de crecimiento como el IGF-1, el VEGF, y el PDGF (Davis, *et al.* 2001), así como la propia regulación de la expresión de estos factores (Cervia *et al.*, 2012). Esta actividad anti-angiogénica, que ha sido ampliamente descrita en tejidos tumorales, también ha sido estudiada en retina, donde se ha visto que la SST es capaz de inhibir la secreción de VEGF y la acción angiogénica de éste en condiciones de hipoxia (Dal Monte *et al.*, 2009).

14.2.3. La SST como agente terapéutico en RD y el DMAE

Varios estudios han reportado una disminución de los niveles de SST en humor vítreo de pacientes con RDP y edema macular diabético (Hernández *et al.*, 2005; Simó *et al.*, 2007). En RD, la disminución en la expresión de SST se ha asociado con la neurodegeneración de la retina (Carrasco *et al.*, 2007).

Tomando en conjunto estos datos, con las múltiples evidencias de las funciones neuroprotectoras y anti-angiogénicas de la SST, hacen de este factor un fuerte candidato para el tratamiento de la RD y la DMAE.

El uso de análogos de la somatostatina ha sido testado ampliamente en varios ensayos clínicos para el tratamiento de la RD (Boehm *et al.*, 2007; Palii *et al.*, 2007). Un claro ejemplo es el Octreótido, uno de los análogos de la somatostatina más usados que ha demostrado que tiene un tiempo de vida más largo que la SST. Se han realizado diversos ensayos clínicos con este análogo, usando distintas vías de administración, que han reportado resultados diversos, como reducción de las complicaciones vasculares, reducción en las hemorragías intravítreas o enlentecimiento o no de la progresión de la RD (revisado por Palii *et al.*, 2007).

En los últimos años también se ha estudiado el uso de la SST en el tratamiento de las etapas más tempranas de la RD. El ensayo clínico EUROCONDOR, iniciado en 2012, es el primer ensayo controlado randomizado para evaluar la seguridad y la eficacia de un tratamiento tópico con SST en colirio en pacientes con RD temprana, en un esfuerzo para determinar la eficacia de este péptido en el tratamiento de la neurodegeneración retiniana (Stitt *et al.*, 2016; Frydkjaer-Olsen *et al.*, 2016).

En contraste, la SST aún no se ha estudiado para el tratamiento de la DMAE, aunque esta patología también está caracterizada por un proceso de neurodegeneración y angiogénesis.

15. NANOMEDICINA Y TERAPIA GÉNICA OCULAR

La nanomedicina (aplicación de la nanotecnología en el campo de la medicina para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de enfermedades) es una ciencia en auge que en los últimos años ha permitido el desarrollo de multitud de sistemas nanoparticulados de diversa composición (lipídicos, poliméricos, metálicos, nanomateriales basados en el carbono, surfactantes no iónicos, emulsiones, etc.) específicamente diseñados para el tratamiento de una gran variedad de patologías, con una finalidad concreta, ya sea la liberación de fármacos, el transporte de ácidos nucleicos al interior de las células u otras aplicaciones como el diagnóstico de enfermedades.

En el caso del transporte de ácidos nucleicos, la nanotecnología ofrece en el desarrollo de nanopartículas una alternativa importante a tener en cuenta frente a los sistemas virales clásicamente desarrollados para terapia génica.

15.1. Terapia génica ocular

La terapia génica es una alternativa terapéutica que lleva desarrollándose ampliamente desde hace años, consistente en la introducción de un gen exógeno en las células del tejido diana para expresar o silenciar un determinado gen que, a su vez, provoca un efecto terapéutico. Esta estrategia ofrece unas ventajas importantes frente a las terapias farmacológicas, sobre todo en el tratamiento de enfermedades degenerativas crónicas, ya que están específicamente dirigidas a la fuente del problema en vez de centrarse solamente en la paliación de los síntomas, y provocan un efecto terapéutico mucho más prolongado (incluso permanente en el caso de genes integrativos), reduciendo así la necesidad de una administración continuada del fármaco.

El ojo es un excelente órgano diana para la aplicación y el estudio de terapias génicas. El ojo ofrece la posibilidad de una administración local, hecho que puede mejorar la efectividad de la terapia y reducir la toxicidad debido a la baja biodisponibilidad sistémica. Además, las mismas barreras que hacen del ojo un órgano de difícil acceso por la vía sistémica, debido principalmente a la presencia de la barrera hemato-retiniana, también hacen que éste goce de un cierto inmunoprivilegio. Por tanto, una administración intraocular es difícil que provoque una respuesta inmunológica severa. Sumado a estas características, otras ventajas del trabajo en terapia ocular es la gran disponibilidad de modelos animales para el estudio de las principales patologías degenerativas de la retina, la presencia de un

control interno (ojo contralateral) y la posibilidad de realizar estudios no invasivos de la retina y la función visual mediante técnicas como la electroretinografía, fotografía de fondo de ojo, tomografía de coherencia óptica o los tests de comportamiento optomotor, que permiten un seguimiento de los síntomas de la patología sin la necesidad de eutanasiar a los animales de estudio (Conely y Naash, 2010).

Como contrapunto, también existen algunas limitaciones para la aplicación de terapia génica. La retina es un tejido altamente especializado, compuesto por células neuronales completamente diferenciadas en un estado post-mitótico desde el nacimiento. Esto puede hacer que algunas estrategias de terapia génica no sean capaces de aplicarse en estas células, debido a su incapacidad de transfectar células post-mitóticas. Además, muchas degeneraciones retinianas heredadas, aunque están bien caracterizadas a nivel genético, no presentan un fenotipo detectable hasta edades tardías, cuando ya se ha dado una significativa muerte celular, por tanto en estos casos no sería suficiente con reemplazar el gen mutado.

Las patologías degenerativas de la retina se pueden clasificar en tres grupos: (1) las que son claramente genéticas, con el gen causante aislado, (2) las que tienen un componente genético y una contribución significativa de factores ambientales y (3) las que no tienen componente genético o muy poco significativo. La terapia génica puede ofrecer soluciones para los tres casos, ya sea, en el caso de un claro componente genético, aportando una copia sana del gen mutado (sustitución génica), o en un caso donde no haya componente genético o éste no sea claramente identificable, la aportación de un gen curativo, que suele codificar por un factor neuroprotector o anti-angiogénico, específicamente diseñado para mejorar la salud de la retina y/o frenar la progresión de la patología. Este tipo de genes curativos tienen la ventaja que pueden aplicarse a multitud de patologías diversas, al contrario que los genes sustitutivos específicos de mutaciones concretas.

Cuando se plantea el diseño de una terapia génica ocular, hay que tener en cuenta varias consideraciones.

En primer lugar, la vía de administración. Las formas más fáciles y no invasivas de administrar un fármaco son la instilación tópica en la superficie del ojo, o la administración sistémica. Estas vías, sin embargo, tienen sus limitaciones. La administración tópica de terapia génica sólo es efectiva si se pretende transfectar el tejido corneal o conjuntival, pero es inefectivo si se pretende llegar al polo posterior. La administración sistémica, por su parte, también resulta bastante inefectiva debido a la presencia de la barrera hemato-retiniana, junto con el hecho de que se pueden transfectar otros órganos no deseados. En este sentido, para la aplicación de terapia génica en retina, las vías de administración más adecuadas son la inyección intra-vítrea y la sub-retiniana. La primera va a ser más conveniente si se pretende transfectar las células de la retina interna, como son las

ganglionares. Si, en cambio, las células diana son los fotorreceptores o el EPR, es preferible la administración sub-retiniana.

Otra consideración a tener en cuenta es la dosificación y la persistencia de la expresión del transgén. Esto es de especial importancia ya que las inyecciones intra-vítreas y sub-retinianas son procedimientos ciertamente agresivos que pueden provocar endoftalmitis y desprendimiento de retina, por tanto la minimización del número de administraciones es de vital importancia. En este sentido, cuanto más dure la expresión del transgén una vez administrado, más se reducirá la necesidad de una administración continuada. Los factores que influyen en la estabilidad de la expresión son, por una parte, la integración o no del material genético en el genoma de la célula huésped, y por otro lado, la presencia de secuencias susceptibles a silenciamiento.

Por último, otro punto a considerar son las barreras para una transfección efectiva (figura I-12). En este sentido, hay varios factores que pueden influir en la eficacia de transfección. El primero de todos es la vía de administración, si escogemos la vía sub-retiniana ésta suele ser bastante efectiva para llegar a los fotorreceptores y EPR, pero sólo va a permitir el acceso en la zona de desprendimiento de la retina y la difusión al resto de la retina va a ser muy limitada, consiguiendo por tanto solamente una transfección localizada. En segundo lugar, dependiendo del vector escogido para la transfección, se va a conseguir una mejor o peor penetrabilidad al interior de las células. Muchos de los sistemas no virales permiten una entrada eficiente a las células a través de la membrana celular, ya sea por vías de endocitosis/fagocitosis, o guiado por receptores de membrana. Los problemas suelen aparecer en el interior celular, cuando el vector tiene que escapar del endosoma para evitar entrar en la vía endolisosomal, donde sería degradado. Este escape endosomal es un punto clave que se ha de tener en consideración para el diseño del vector. Si consigue superar este paso, el material genético finalmente ha de ser transportado hasta el núcleo para permitir su expresión, y este paso se puede solventar incluyendo péptidos de direccionamiento nuclear. Finalmente, una vez dentro del núcleo, la capacidad de expresión del material genético viene determinada por el diseño del plásmido, dependiendo del promotor usado, las secuencias reguladoras, u otras características de su secuencia (Conely y Naash, 2010).

Tomando todas estas consideraciones, un sistema ideal de terapia génica vendría definido por: (1) una capacidad de captación extensiva y eficiente en el tejido diana con mínima liberación ectópica, (2) unos niveles de expresión suficientemente altos para provocar una mejora en el fenotipo, pero no tanto como para inducir toxicidad, (3) un inicio de la expresión rápido a partir del momento de la administración y una persistencia de la expresión a lo largo de toda la vida del organismo, (4) una administración segura y no invasiva y (5) una buena tolerabilidad sin provocar respuesta inmunitaria, inflamación, toxicidad debido a integración u otros efectos adversos.

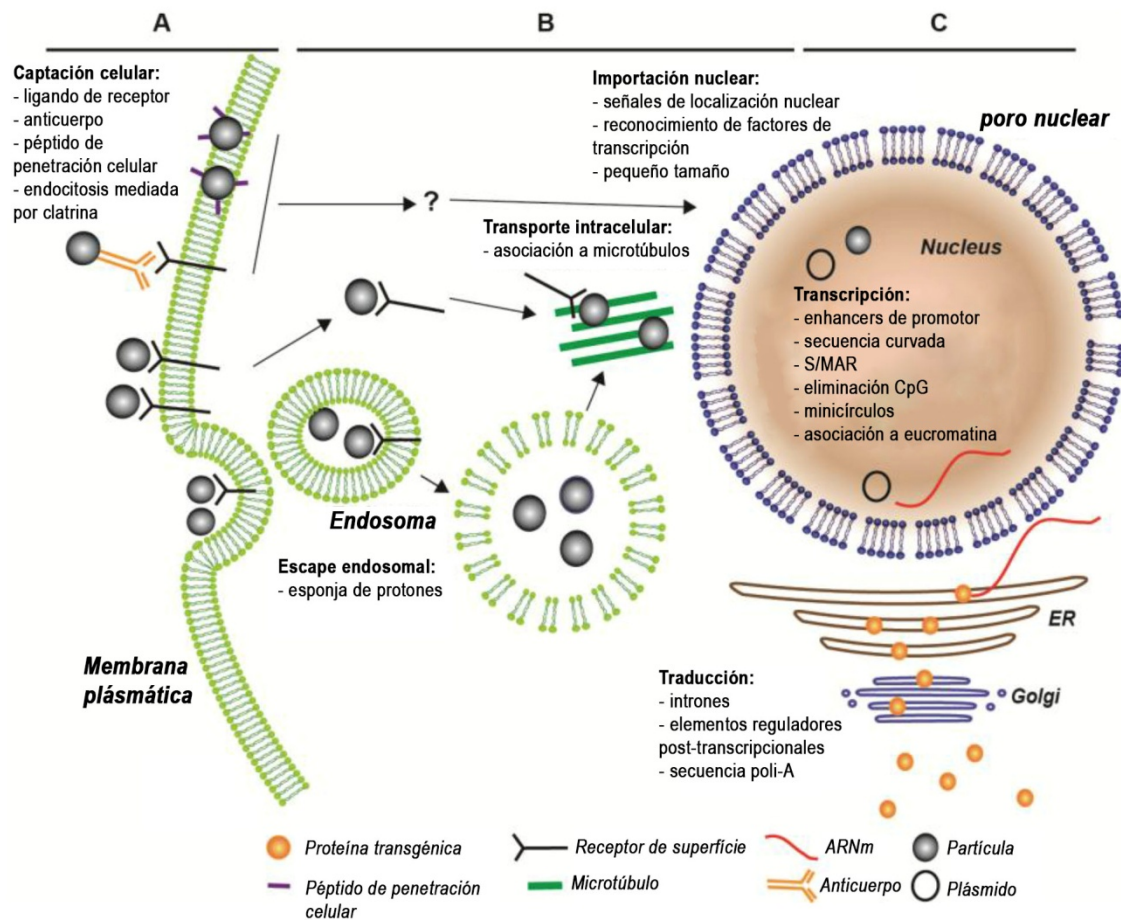


Figura I-12: Diagrama de algunas de las vías de entrada y expresión de los sistemas de terapia génica no viral, con las distintas etapas que ha de superar: A) Entrada a la célula, B) Escape endosomal y viaje hasta el núcleo y C) expresión del material genético. Se indican las modificaciones a la partícula o el vector que se pueden usar para mejorar la eficiencia de expresión. (Imagen adaptada de Zulliger *et al.*, 2016).

Hasta la fecha, los sistemas de terapia génica más estudiados han sido clásicamente los vectores virales. Estos reúnen varias de las características de un sistema ideal, como son los elevados ratios de transfección en los tejidos diana, el tropismo por un tipo celular y el mantenimiento estable de la expresión a lo largo del tiempo, pero tienen varios puntos en su contra, como son la limitada capacidad de empaquetamiento, la activación del sistema inmunitario, la toxicidad derivada de la integración en el genoma de la célula huésped y los elevados costes de producción (Kumar-Singh, 2008). Aunque en los últimos tiempos se ha trabajado extensivamente en la mejora y perfeccionamiento de estos vectores virales, el desarrollo de sistemas no virales de terapia génica se presenta como una alternativa muy prometedora.

15.2. Terapia génica no viral

Los sistemas de transferencia génica no virales han sido un tema de extensivo estudio en los últimos años, debido a las ventajas que pueden ofrecer frente a los sistemas virales. Estos sistemas tienen como característica común el ilimitado cargo de material genético que pueden transportar, la incapacidad de generar una respuesta inmunitaria, la seguridad debido a la no integración en el genoma de la célula huésped y los bajos costes de producción. Sin embargo, una de las principales limitaciones de estos sistemas son los bajos ratios de transfección debido a su limitada capacidad de escape endosomal y transporte del material genético hasta el núcleo de las células, así como una persistencia menor de la expresión del transgén en el tiempo debido a su mantenimiento episomal (Adijanto y Naash. 2015).

Existen tres estrategias generales de transferencia génica no viral: (1) administración de ADN desnudo, (2) métodos físicos de transfección y (3) métodos químicos mediante sistemas nanoparticulados.

15.2.1. ADN desnudo

La directa aplicación de ADN sobre el tejido diana es una estrategia que se ha probado en terapia génica ocular por distintos autores a través de distintas vías: tópica, subconjuntival, intracameral, intra-vítrea, sub-retiniana y axonal (revisado en Bloquel *et al.*, 2006). Aunque en algunos casos ha dado ciertos resultados transfectando el tejido directamente expuesto al ADN, es de conocimiento común que el ADN sin ningún sistema de transporte posee una capacidad muy limitada de transfectar las células de mamífero.

15.2.2. Métodos físicos

Se han desarrollado diferentes metodologías de transferencia génica mediante sistemas físicos. Entre ellos encontramos la biolística o “*gene gun*”, consistente en el “bombardeo” de las células diana con el material genético. Esta técnica ha sido probada en superficie ocular, en particular para enfermedades de la córnea, donde se ha reportado una transfección el 100% de las células epiteliales sin ningún daño detectable (Tanelian *et al.*, 1997), pero no es factible para la transfección del polo posterior del ojo.

Otra técnica es la electrotransferencia o electroporación, consistente en la aplicación de pulsos eléctricos en el tejido diana para incrementar la capacidad de transfección de ADN desnudo. Esta técnica ofrece las ventajas de un bajo coste, la facilidad de manipulación y los elevados ratios de transfección, ya ha sido probada con éxito en ojo, aunque requiere de una administración previa del material genético en el sitio de transfección (Matsuda *et al.*, 2004).

La iontoforesis es otra forma de inducir la penetración de ADN en las células a través de vías preexistentes mediante la aplicación de una corriente eléctrica de baja densidad. Esta técnica incrementa los ratios de transfección y ha sido probada por vía trans-corneal, trans-corneoescleral y trans-palpebral para la transfección del polo anterior del ojo, aunque no ha sido probada nunca en el polo posterior (Bloquel *et al.*, 2006).

Finalmente, los ultrasonidos también se han utilizado como método físico de transferencia génica, alterando la permeabilidad de la membrana de las células para facilitar el paso de las moléculas de ADN, aunque se ha visto que esta técnica puede inducir daño celular y sólo se ha probado en córnea (Sonoda *et al.*, 2006).

15.2.3. Métodos químicos

Un método químico de liberación de material genético comporta la conjugación del ADN con una nanopartícula (NP) o un polímero catiónico para provocar su compactación y facilitar su transporte a través de la membrana celular. Hasta la fecha un gran abanico de NPs de diferente composición, carga y efectividad se han diseñado y testado su habilidad en el transporte de fármacos y material genético a varios tipos celulares.

En cuanto a terapia génica celular, las más relevantes testadas hasta el momento son las NPs metálicas (NPs de oro), las NPs basadas en lípidos (liposomas y NPs lipídicas sólidas) y las NPs basadas en polímeros (compuestas de distintos monómeros que pueden ser desde proteínas, como la albúmina o la gelatina, carbohidratos (polisacáridos), pequeños compuestos químicos como el ácido poli-láctico (PLA) o el ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA), o polipéptidos). En la tabla I-02 se presenta un resumen de las principales nanopartículas testadas en retina.

Las **NP metálicas** han sido desarrolladas en las últimas décadas como fármacos no tóxicos o nanocarriers para ADN con varias aplicaciones terapéuticas. Las más populares en su uso en clínica son la NP de oro, debido a su biocompatibilidad y a la facilidad de síntesis. Se ha demostrado en varios estudios en animales que la administración intra-vítrea o sub-retiniana de este tipo de NPs no provoca ninguna toxicidad en retina o EPR (Bakri *et al.*, 2008; Hayashi *et al.*, 2009). Cuando son usadas como sistema de terapia génica, las NPs de oro se suelen funcionalizar con polímeros catiónicos como la polietiliminina (PEI) para mejorar la unión y condensación de ADN, y así protegerlo de las DNAsas. También se pueden conjugar con varios ligandos, anticuerpos y péptidos de penetración celular para facilitar la entrada a las células y el escape endosomal. Aunque estas NPs son una herramienta prometedora como sistema de terapia génica, a fecha de hoy aún no han sido probadas en la transfección de la retina.

Tabla I-03: Resumen de NPs utilizadas para terapia génica (Adaptada de Adijanto y Naash, 2015).

Nanopartícula	Características	Células de la retina transfectadas con éxito
NP de oro	<ul style="list-style-type: none"> Fácil síntesis Propiedades ópticas para imagen Baja citotoxicidad 	N/P
Liposomas	<ul style="list-style-type: none"> Fácil preparación Disponibles comercialmente Elevada citotoxicidad 	EPR (Neuroporter®) (Kachi <i>et al.</i> , 2005)
NP lipídicas sólidas	<ul style="list-style-type: none"> Estables bajo esterilización por calor Muchas opciones de customización Capacidad de liberar simultáneamente fármacos y ADN 	EPR <i>in vitro</i> (del Pozo-Rodríguez <i>et al.</i> , 2008)
Albúmina	<ul style="list-style-type: none"> Elevada biocompatibilidad Aprobado por la FDA Fácil de modificar químicamente Opciones de hacer NP híbridas 	Retina (Mo <i>et al.</i> , 2007)
Gelatina	<ul style="list-style-type: none"> Elevada biocompatibilidad Aprobado por la FDA Bajo coste del material Fácil de modificar químicamente Opciones de hacer NP híbridas 	N/P
Polisacáridos	<ul style="list-style-type: none"> Elevada biocompatibilidad Tendencia a formar hidrogeles viscosos Fáciles de modificar químicamente Opciones de hacer NP híbridas 	EPR (NP de glicol-quitosanos) (Mitra <i>et al.</i> , 2014) Retina interna (NP de PLGA-quitosanos) (Park <i>et al.</i> , 2009)
PLA/PLGA	<ul style="list-style-type: none"> Elevada biocompatibilidad Formulaciones bien establecidas Aprobado por la FDA y la EMA Baja citotoxicidad Opciones de hacer NP híbridas Capacidad de liberar simultáneamente fármacos y ADN 	EPR y fotorreceptores (NP de PLGA) (Zhang <i>et al.</i> , 2010)
Dendrímeros	<ul style="list-style-type: none"> Difíciles de sintetizar Disponibles comercialmente (elevado coste) Elevada citotoxicidad 	EPR (dendrímeros de PLL-LAA) (Marano <i>et al.</i> , 2005) Células ganglionares (dendrímeros de PEI) (Liao <i>et al.</i> , 2007)
NP polipeptídicas	<ul style="list-style-type: none"> Fácil de sintetizar Baja citotoxicidad Opciones de hacer NP híbridas Gran capacidad de customización Posibilidad de direccionamiento directo al núcleo celular 	EPR, fotorreceptores y ganglionares (CK30-PEG) (Farjo <i>et al.</i> , 2006)

N/P: no publicado

Las **NP basadas en lípidos** se pueden clasificar en liposomas o NP lipídicas sólidas. Los liposomas son de los sistemas más populares estudiados para transfección génica debido a su facilidad de uso, la disponibilidad comercial y la eficiencia de los mecanismos de liberación. Suelen componerse de dos lípidos básicos, uno catiónico y uno neutral, que en contacto con el ADN forman nanoestructuras multilamelares que pueden ir de los 100 a los 200 nm de diámetro. Estos liposomas se adhieren a las membranas de las células a través de interacciones electroestáticas y son endocitados. En los endosomas, gracias a su carga positiva, se fusionan con la membrana cargada negativamente y

liberan el ADN al citosol. Se han publicado varios estudios reportando elevadas eficiencias de transfección con liposomas en EPR y células ganglionares, aunque no en fotorreceptores (Masuda *et al.*, 1996) y otros estudios han reportado una elevada toxicidad de este tipo de NPs en retina (Kachi *et al.*, 2005). Por otro lado, las NPs lipídicas sólidas, basadas en un núcleo compuesto por lípidos catiónicos en combinación con lípidos neutrales, encapsulado por un surfactante biocompatible, son nanoestructuras muy estables que han sido estudiadas en los últimos años como sistemas de terapia génica. Pueden ser funcionalizadas con varias moléculas como péptidos de penetración celular, o ligandos de receptores de superficie celular para facilitar la captación celular. Existen publicaciones que reportan buenas eficiencias de transfección en cultivos *in vitro* de células de EPR (del Pozo-Rodríguez *et al.*, 2008), pero se necesitan más estudios *in vivo* para confirmar su eficiencia de transfección así como la posible toxicidad en retina.

Finalmente, el tercer grupo de NPs, las **NPs poliméricas**, incluyen una gran variedad de tipos de nanoestructuras formadas por monómeros de distinto origen (proteínas, polisacáridos, dendrímeros, etc.). Para terapia génica, el ADN puede unirse a la superficie o ser encapsulado, dependiendo del tipo de NP. Todas las NPs basadas en polímeros, en su aplicación como agentes terapéuticos, son diseñadas para ser biodegradables y biocompatibles, habiendo varias que ya han sido aprobadas por la FDA (*Food Drug Administration*) para su uso en humanos como sistemas de liberación de fármacos (Duncan y Gaspar, 2011). Las NPs poliméricas también pueden ser modificadas de diferentes maneras para incrementar su eficiencia de transfección. Por ejemplo, el ratio de liberación del ADN de la partícula puede ser controlado modificando el peso molecular del polímero (a más peso molecular, liberación más lenta). También se pueden formar NPs co-poliméricas con distintos tipos de polímero (PLGA + PEI; quitosano + PEI,...), mejorando así la capacidad de encapsulación de ADN y el escape endosomal. Además, se puede modificar la superficie de las NPs poliméricas para alterar su carga y su tamaño (por ejemplo, uniendo polietilenglicol), o funcionalizarlas con anticuerpos o ligandos para unirse a receptores de superficie.

15.3. NPs poliméricas polipeptídicas: R9-GFP-H6

Las proteínas y los péptidos pueden ser usados para la compactación de ADN. Proteínas ya conocidas como la albúmina o la gelatina han sido testadas para terapia génica, mostrando su capacidad para interactuar con el material genético debido a la presencia de aminoácidos catiónicos, y se ha demostrado que son capaces de transfectar células de distintos tejidos oculares (Mo *et al.*, 2007; Konat Zorzi *et al.*, 2011).

A parte de proteínas, la compactación de ADN en NPs también se puede conseguir con péptidos más pequeños. El péptido poli-lisina es uno de los primeros que demostraron una elevada eficiencia de transfección (Vitiello *et al.*, 1996). Desde entonces, el procedimiento de compactación y dirección del ADN al interior de las células se ha ido refinando, mediante la adición de polímeros como la PEI o la fusión de distintos péptidos funcionales, para mejorar así la captación de las NPs por la célula diana, el escape endosomal y el direccionamiento del ADN al núcleo celular.

Las NPs basadas sólo en proteína son totalmente biocompatibles y permiten un diseño racional a través de el ajuste fino de sus propiedades biofísicas y biológicas, como la regulación de sus características arquitectónicas (por ejemplo, capacidad de auto-ensamblaje y permeabilidad de fármacos) o su interacción biológica con el ambiente (reconocimiento de receptores, traspaso de la membrana celular o direccionamiento al núcleo, entre otros).

Un claro ejemplo de este refinamiento son las NPs proteicas R9-GFP-H6 desarrolladas por Vazquez *et al.* (2010). Estas están compuestas por la fusión de dos péptidos a la proteína verde fluorescente GFP. Por un lado, el péptido R9, compuesto por nueve argininas, esta fusionado al extremo N-terminal de la GFP. Los péptidos de poli-arginina se ha reportado que son altamente bioactivos por su elevado grado catiónico, pudiendo unir ADN y compactarlo, y son capaces de translocar eficientemente la membrana celular, promoviendo la captación celular de las moléculas asociadas (Futaki *et al.*, 2001). Por el otro lado, se ha incorporado el péptido de marcaje H6, consistente en 6 histidinas.

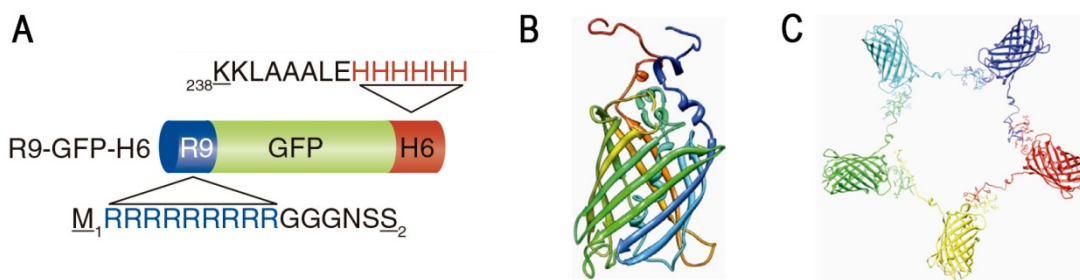


Figura I-13: La nanopartícula R9-GFP-H6. (A) secuencias aminoacídicas de las secuencias poli-asarginina (en azul) y poli-lisina (en rojo) fusionadas a ambos extremos de la proteína GFP. (B) Modelado molecular 3D de la proteína de fusión R9-GFP-H6, en forma de barril, con las dos colas poli-peptídicas en el extremo superior. (C) Modelado molecular del ensamblaje de cinco proteínas R9-GFP-H6, formando un nanodisco. (Figura extraída de Vazquez *et al.*, 2010).

Los autores observaron como, disueltas en tampón, las proteínas R9-GFP-H6 sufrían un proceso de auto-ensamblaje formando nanopartículas con un elevado grado de organización interna, en forma de nanodiscos aplanados con dimensiones alrededor de los 20 x 3 nm (figura I-13). Además también observaron como las NPs eran capaces de penetrar las membranas celulares de células en cultivo, con

una acumulación progresiva en el núcleo de éstas. También corroboraron la capacidad de las NPs de unir ADN plasmídico sin provocar cambios significativos en la capa proteica y éstas fueron capaces de provocar una expresión significativa del transgén en las células transfectadas (Vazquez, *et al.* 2010a y 2010b).

Estos hallazgos confirman las NPs R9-GFP-H6 proteicas como potentes candidatos para futuros experimentos de terapia génica *in vivo*.

15.4. NPs polisacáridas: Quitosanos

Los quitosanos son polisacáridos solubles en agua derivados de la deacetilación parcial (para generar grupos amino) de la quitina, el principal componente estructural del exoesqueleto de los crustáceos y la pared celular de los hongos. Son polímeros lineales formados por monómeros de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina distribuidos aleatoriamente.

Los quitosanos, de disponibilidad comercial, tienen un gran número de aplicaciones en varios campos. Pueden ser usados en agricultura como tratamiento de sembrado y biopesticida, en campo de la enología pueden ser utilizados como agente de afinado, en la industria pueden ser usados como revestimiento de sellado de pinturas de poliuretano, y más importante, debido a su elevada biocompatibilidad y ausencia de toxicidad en humanos, los quitosanos también son usados en medicina como agentes coagulantes en vendajes o como agentes anti-bacterianos.

En cuanto a su posible uso en terapia génica, en los últimos años los quitosanos han sido fuente de numerosos estudios. Se sabe que estos polímeros tienen la capacidad de condensar ADN cargado negativamente formando estructuras compactas vía interacciones electrostáticas (Morille *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2007). Se ha visto que los quitosanos pueden proteger el ADN de la degradación por nucleasas y transfectar distintos tipos celulares (Huang *et al.*, 2005), aunque las eficiencias de transfección de las NPs quitosano-ADN son relativamente bajas (Koping-Hoggard *et al.*, 2004).

La efectividad en la capacidad de transfección *in vivo* de las NPs de quitosano se puede mejorar de distintas maneras. Varios autores han probado de formular NPs multipoliméricas, por ejemplo mezclando quitosanos con ácido poli- γ -glutámico (Peng *et al.*, 2009). Los complejos resultantes mostraron un incremento en la captación celular y una mejora en la liberación intracelular del ADN, resultando en unos índices de transfección significativamente mejores.

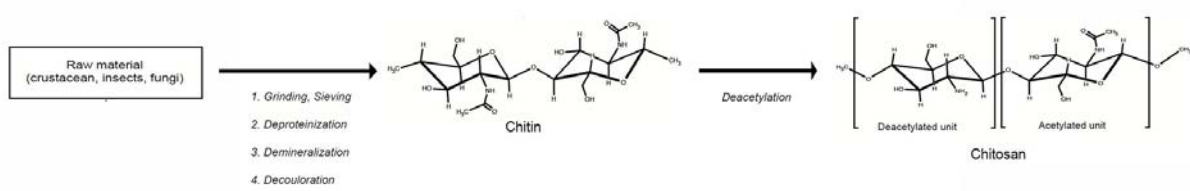


Figura I-14: Quitosanos. Representación esquemática del proceso de fabricación de los quitosanos de bajo peso molecular. (Imagen extraída de Agirre *et al.* 2014).

Otra forma de mejorar la eficacia de transfección es usando quitosanos oligoméricos, es decir, de bajo peso molecular. Estudios en cultivos celulares han reportado niveles de transfección sustancialmente mejores de oligoquitosanos comparado con quitosanos poliméricos, y estos ya han sido probados *in vivo* en transfección ocular con prometedores resultados preliminares, tanto en córnea como en retina (Klausner *et al.*, 2010; Klausner *et al.*, 2012; Puras *et al.*, 2013).

OBJETIVOS

La retinopatía diabética (RD) y la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) son dos patologías de la retina que se caracterizan por la aparición de neovasos invasivos en sus fases más avanzadas. Estos procesos de neovascularización se caracterizan principalmente por una pérdida del equilibrio entre los factores pro-angiogénicos, como el VEGF, y los factores anti-angiogénicos, como el PEDF y la SST. Los tratamientos disponibles actualmente para estas retinopatías vasoproliferativas, basados en la administración de anticuerpos contra el VEGF, son muy invasivos y sólo son eficaces parcialmente, por tanto el desarrollo de nuevas terapias más efectivas es primordial. En este sentido, la terapia génica no viral se presenta como una alternativa muy interesante debido a su capacidad de inducir de forma segura la expresión del agente terapéutico en el tejido diana durante períodos de tiempo muy prolongados, reduciendo la necesidad de administraciones periódicas de fármacos. El estudio de estas terapias novedosas requiere de la obtención de modelos celulares y animales adecuados y bien caracterizados para poder determinar el efecto terapéutico y obtener resultados concluyentes.

Bajo estas premisas, el objetivo principal de este trabajo es el **desarrollo de modelos celulares y animales y el estudio de nuevos sistemas de terapia génica no viral para la sobre-expresión en retina de dos agentes anti-angiogénicos, el PEDF y la SST, como tratamientos para la RD y la DMAE.**

Este objetivo general se desglosó en los siguientes objetivos específicos:

- 1) Desarrollar modelos *in vitro* de angiogénesis con cultivos de células endoteliales y determinar el efecto anti-angiogénico de los péptidos PEDF y SST.
- 2) Desarrollar y caracterizar dos modelos animales de RD y DMAE: el modelo de diabetes inducida con estreptozotocina en rata y el modelo de neovascularización coroidea inducida con láser en ratón.
- 3) Generar los vectores plasmídicos para su uso en terapia génica retiniana: vectores para la expresión de SST y PEDF, así como de genes reporteros.
- 4) Estudiar dos sistemas no virales de transferencia genética: las nanopartículas proteicas R9-GFP-H6 y los quitosanos O15. Evaluar su eficiencia en modelos *in vitro* e *in vivo*.

MATERIAL Y MÉTODOS

MM1. CULTIVOS CELULARES

MM1.1. Líneas celulares, medios de cultivo y reactivos

Para la realización de los distintos ensayos *in vitro* se usaron las siguientes líneas celulares:

- ARPE-19: línea celular inmortalizada de epitelio pigmentado de retina de origen humano. Esta línea se obtuvo por cesión del grupo del Dr. Pedraz de la Universidad del País Vasco. El medio de cultivo de crecimiento es DMEM-F12 (Thermo Fisher Scientific. Waltham, MA. USA. Ref. 11320033) suplementado con 10% de suero bovino fetal, FBS (Thermo Fisher. Ref. 10270106) y antibióticos penicilina-streptomina (100 U/ml – 100 ug/ml) (Thermo Fisher. Ref. 15140122). El sub-cultivo de esta línea celular se realizaba 2 veces por semana en frascos de cultivo celular de 75 cm² de superficie (Corning. Nueva York, USA. Ref. 430641).
- HUVEC: línea primaria humana de endotelio vascular de cordón umbilical. Presenta crecimiento por adherencia en monocapa. La línea se obtuvo a pasaje 1 de la *American Type Culture Collection* (LGC Standards. Teddington, UK. Ref. PCS-100-010). El medio de cultivo usado para su crecimiento es el medio completo de crecimiento endotelial EGM-2 (Lonza. Basel, Suiza. Ref. CC-3162). Las células fueron mantenidas en crecimiento mediante el protocolo de sub-cultivo, y se creó un stock a distintos pasajes para su posterior uso en los ensayos de proliferación, migración y formación tubular, donde se usaban células entre los pasajes 3 y 6.
- BJ: línea celular de fibroblastos provenientes de piel de origen humano, obtenida de la *American Type Culture Collection* (LGC Standards. Ref. CRL-2522). El medio de cultivo usado para su crecimiento es EMEM (LGC Standards. Ref. 30-2003) suplementado con 10% de FBS y 1% de antibióticos.

MM1.1.1. Protocolo de sub-cultivo

Se retiraba el medio de cultivo y las células eran lavadas una vez con tampón fosfato salino (PBS) 1X (Thermo Fisher. Ref. 70011-036). Seguidamente se añadía 3 ml de solución tripsina-EDTA 1X (Thermo Fisher. Ref. 15400-054) y se incubaba 5 min a 37°C o hasta que todas las células estaban despegadas de la placa. Una vez despegadas, se añadía 6 ml de medio de cultivo completo para inactivar la tripsina y la suspensión celular era pasada a un tubo falcon de 15 ml. Seguidamente, la suspensión se centrifugaba 5 min a 1200 r.p.m. para precipitar todas las células, se eliminaba el sobrenadante y éstas eran resuspendidas en medio de cultivo completo. Se realizaba recuento celular mediante cámara de Neubauer y se sembraba 0,5 – 1 millón de células (dilución 1:5 – 1:10) en un frasco de cultivo nuevo de 75 cm².

MM1.2. Ensayo de proliferación endotelial

Células HUVEC sub-confluentes (80%) fueron tripsinizadas y sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 5.000 células por pocillo en medio de crecimiento EGM-2. Las células se dejaron incubando a 37°C durante 24 h. Seguidamente, el medio de cultivo fue retirado de los pocillos y cambiado por 50 µl de EBM-2 (medio sin factores de crecimiento) suplementado con 2% FBS y se dejaron incubando a 37°C durante 24 h más. Al día siguiente, se añadieron 50 µl de medio con los correspondientes tratamientos a concentración 2X, de tal forma que su concentración final en el pocillo fue de 25 ng/ml VEGF (Vitro SA. Madrid, España. Ref. 293-ve-010) con o sin las concentraciones de PEDF (GenScript. Piscataway, NJ, USA. Ref. Z02722-20) o SST (Bachem. Bubendorf, Suiza. Ref. H-4955.0500) especificadas en las gráficas correspondientes. Las células fueron incubadas con los tratamientos durante 72 h y finalmente la proliferación fue medida mediante ensayo MTT.

MM1.2.1. Ensayo MTT

Ensayo basado en la reducción metabólica del sustrato bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa dando lugar a un compuesto coloreado de color azul (formazán). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Sobre las células HUVEC previamente incubadas con los compuestos en estudio se añadieron 10 µl de solución MTT (Sigma-Aldrich Quimica. Madrid, España. Ref. M5655) a 5 mg/ml a cada pocillo y se incubó durante 4 h a 37°C, permitiendo la formación de los cristales de formazán. Seguidamente, el medio fue aspirado y se añadió 200 µl de DMSO (Sigma-Aldrich. Ref. 41640) a cada pocillo para la disolución de los cristales, dando un color liláceo. Se midió la absorbancia de las placas a 570 nm usando un lector de microplacas. Se usaron células HUVEC sin ningún tratamiento como control relativo de crecimiento y células HUVEC tratadas con 20% DMSO como control negativo, de muerte celular. El efecto de los tratamientos con VEGF ± PEDF o SST en la proliferación de las HUVEC fue calculado dividiendo la absorbancia corregida de las muestras ($OD_{570}(\text{muestra}) - OD_{570}(\text{control negativo})$) por la absorbancia del control relativo de crecimiento ($OD_{570}(\text{control crec.})$):

$$\text{Incremento de la prolif. celular (\%)} = \frac{OD_{570}(\text{muestra}) - OD_{570}(\text{control negativo})}{OD_{570}(\text{control crec.})} \times 100$$

MM1.3. Ensayo de migración endotelial

La migración de células endoteliales bajo el efecto de distintos tratamientos fue determinada mediante el ensayo *in vitro* de cierre de herida, descrito anteriormente por Su *et al.*, 2003. Células HUVEC de pase 3-6 fueron sembradas en placas de cultivo celular de 12 pocillos con medio de crecimiento EGM-2 y se incubaron durante 24-48 h a 37°C, hasta que los cultivos llegaron al 90-100% de confluencia. Seguidamente, el medio fue reemplazado por EBM-2 (medio sin factores de crecimiento) suplementado con 0,5% FBS y se incubó durante 6 h. Posteriormente, las células se trataron con 1 mM de 5-fluorouracil (Sigma-Aldrich. Ref. F6627) durante 15 min para detener la proliferación celular y se procedió a realizar una “herida” en el centro de los pocillos mediante el paso de una punta de pipeta de 200 µl estéril por la superficie de los cultivos, levantando las células en un área rectilínea, creando un carril acelular. Los pocillos fueron lavados con PBS para eliminar las células flotantes y a continuación se añadió medio de cultivo EBM-2 con 0,5% FBS sólo o suplementado con 25 mg/ml VEGF a \pm 10 nM PEDF o 100 µM SST. Los cultivos bajo los distintos tratamientos fueron incubados durante 16 h, tomando imágenes a tiempo inicial (0 h) y final (16 h) bajo microscopio de contraste de fases (Leica Biosystems. Newcastle, UK) para su posterior análisis.

Se tomaron 4 fotografías de cada pocillo en las zonas de herida. El cierre de la herida debido a la migración celular fue cuantificado midiendo el área acelular a tiempo 0 h y 16 h y calculando el porcentaje de área cubierta durante el tiempo de tratamientos. Las cuantificaciones de las áreas se realizaron usando el software *ImageJ* (<https://imagej.nih.gov>).

MM1.4. Ensayo de formación tubular

MM1.4.1. Establecimiento del co-cultivo de fibroblastos y células endoteliales

Se siguió la metodología de Sarkanen *et al.* (2011). Para ello, se descongelaron fibroblastos BJ y se cultivaron en medio EMEM suplementado con 10% FBS y 1% penicilina-streptomycin durante 3 días. En el tercer día, se levantaron las células de la placa de crecimiento y se sembraron en placa de 48 pocillos a una densidad de 20.000 células por pocillo, dejándolas crecer durante 3 días más. Al tercer día, se descongelaron las células HUVEC a pase entre 3 y 6 y se cultivaron según su protocolo, en medio EGM-2, separadas de los fibroblastos BJ, durante 3 días. Al sexto día, las células HUVEC se levantaron cuidadosamente con tripsina y se sembraron encima de los a una densidad de 4.000 células por pocillo sobre los fibroblastos que crecían en la placa de 48 pocillos. El co-cultivo se mantuvo en medio EGM-2 para su subsiguiente uso en el ensayo de angiogénesis.

MM1.4.2. Ensayo de angiogénesis con PEDF y SST

Una vez establecido el co-cultivo de HUVEC y fibroblastos, se realizó el ensayo de formación tubular. Un día después del establecimiento del co-cultivo, los medios de los pocillos fueron substituidos por EBM-2 suplementado con distintos tratamientos: control negativo (medio sin ningún factor de crecimiento), control positivo (medio con cóctel de factores de crecimiento VEGF:FGF-2, consistente en 10 mg/mL VEGF y 1 mg/mL FGF-2), tratamiento con PEDF (medio con cóctel VEGF:FGF-2 + 10 nM PEDF) y tratamiento con SST (medio con cóctel VEGF:FGF-2 + 100 μ M SST), realizando cuatro réplicas de cada uno de ellos. Las células se mantuvieron a 37°C durante 6 días antes de realizar la inmunotinción anti-vWf. Los medios conteniendo los distintos tratamientos fueron renovados una vez en el tercer día del ensayo.

MM1.4.3. Immunocitoquímica anti-vWf

Al sexto día desde la iniciación de los tratamientos, las células endoteliales fueron inmunoteñidas con anti-factor de Von Willebrand (vWF), con tal de identificar las células endoteliales y las estructuras generadas más fácilmente. Para ello, se eliminaron los medios de cultivo y las células fueron lavadas tres veces con PBS, fijadas con etanol 70% frío durante 20 min, permeabilizadas con 0,5% Tritón-X100 (Sigma-Aldrich. Ref. X100) durante 15 min y bloqueadas para evitar tinción inespecífica con 10% BSA (Sigma-Aldrich. Ref. A7906) en PBS durante 30 min. Después del bloqueo, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-vWF (tabla MM-01) a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario, y se procedió a realizar la incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado (tabla MM-03) durante 30 min. Finalizada la incubación, el revelado de la inmunocitoquímica se realizó mediante el kit *Novolink Polymer Detection System* (Leica Biosystems. Ref. RE7140CE) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó seguimiento de la aparición de color bajo el microscopio, durante 5-10 min y cuando se consideró que la tinción era la adecuada se paró la reacción con buffer Tris 0,5 M.

Los resultados de la inmunotinción fueron visualizados bajo microscopio de campo claro y se tomaron 4 fotografías representativas por pocillo (en los 4 cuadrantes) a 4 aumentos. Las imágenes se analizaron usando el software *ImageJ*, mediante el cual se cuantificaron el número y la longitud de los túbulos, la cantidad de conexiones entre túbulos y la cantidad de agregados (Fig MM-01).

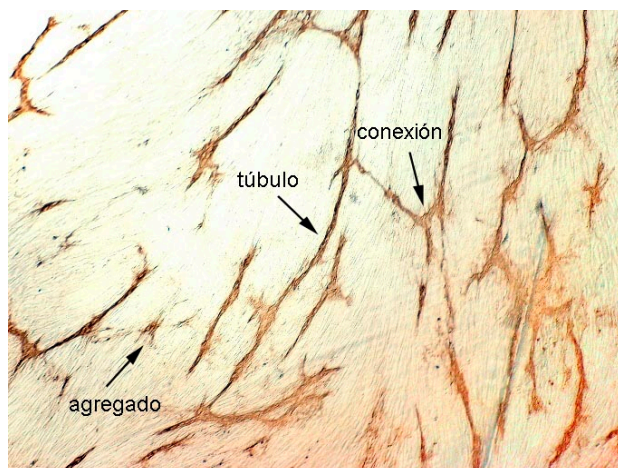


Figura MM-01: ICQ anti-vWF en co-cultivo de HUVEC y fibroblastos. Inmunotinción marrón de las células endoteliales (HUVEC). Se aprecia la disposición ordenada de estas en forma de estructuras tubulares. Con flechas se marcan la identificación de los túbulos, las conexiones entre túbulos y los agregados.

MM1.5. Ensayos de transfección

MM1.5.1. Transfección con X-Treme

Para los ensayos de transfección se usaron células de la línea de epitelio pigmentado de retina ARPE-19. Según fuera para inmunofluorescencia o para otras aplicaciones (citometría, extracción de RNA), las células fueron sembradas en placas de 12 pocillos con o sin cubreobjetos respectivamente. Se sembraron 100.000 células por pocillo en medio DMEM-F12 suplementados con 10% FBS y 1% penicilina-estreptomina, y se dejaron creciendo durante 24 h. Al día siguiente se prepararon las mezclas de transfección usando el reactivo X-treme (X-tremeGENE HP ADN Transfection Reagent. Roche Life Science. Sant Cugat del Vallès, España. Ref. 06366244001), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se mezclaron 2 μ l de X-treme con 1 μ g de plásmido en un volumen de 100 μ l de medio OptiMEM (Thermo Fisher. Ref. 11058021) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos. Pasado el tiempo de incubación, las distintas mezclas de transfección se añadieron a las células en el medio de cultivo de crecimiento, y se dejaron incubando a 37°C durante 24-48 h hasta el momento del análisis.

Las células transfectadas con el plásmido expresando el gen tdTomato fueron observadas bajo microscopio de fluorescencia para detectar la presencia de células fluorescentes rojas.

MM1.5.2. Inmunocitoquímica

Todos los anticuerpos usados se especifican en la tabla MM-01. Después de 48 h tras la transfección, las células sembradas sobre cubreobjetos fueron lavadas 2 veces con PBS y fijadas con 3% PFA y 2% sucrosa en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados con PBS y un lavado con 20 mM glicina en PBS (PBS-glicina) seguido de la permeabilización con 0,1% Tritón-X100 y 20 mM

glicina en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente se realizaron 2 lavados con PBS-Glicina y se realizó bloqueo con 0,5% BSA en PBS-Glicina durante 60 min a temperatura ambiente. A continuación se realizó la incubación con los anticuerpos primarios diluidos en 0,5% BSA en PBS-Glicina: se usó el anticuerpo H-125 para detectar PEDF en las células transfectadas con mc.PEDF, mc.VMD2-PEDF-SMAR o células control y el anticuerpo H11 para detectar SST en las células transfectadas con mc.SST, mc.VMD2-SST-SMAR o células control (Tabla MM-01). Se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente, seguido de tres lavados de 5 min con PBS-glicina y incubación con los anticuerpos secundarios A21069 y A11004 respectivamente durante 30 min a temperatura ambiente, en oscuridad. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS-glicina y los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos con medio de montaje + DAPI (Fluoroshield™, Sigma-Aldrich. Ref. F6182-20ML) para teñir los núcleos celulares. Las preparaciones fueron observadas y fotografiadas bajo microscopio de fluorescencia (OlympusBX61, Olympus Life and Material Science Europa, Hamburg, Germany).

Tabla MM-01: Listado de anticuerpos usados en todos los protocolos.

Anticuerpo	Diana	Huésped	Naturaleza	Aplicación	Dilución	Referencia
Primarios						
vWf	células endoteliales	conejo	policlonal	ICQ	1/1000	Sigma-Aldrich. F3520
PEDF (H-125)	PEDF	conejo	policlonal	IF	1/500	Santa Cruz. sc-25594
SST (H11)	SST	ratón	monoclonal	IF	1/500	Santa Cruz. sc-74556
GFAP	células ganglionares activadas	conejo	policlonal	IF	1/1000	Abcam. ab7260
ZO-1	uniones estrechas en EPR	conejo	policlonal	IF	1/1000	Abcam. ab59720
RPE-65 (3D9)	EPR	ratón	monoclonal	IF	1/1000	Santa Cruz. sc-73616
VEGF	VEGF	conejo	policlonal	IF	1/500	Millipore. 07-1376
Col.IV	colágeno IV en células endoteliales	conejo	policlonal	IF	1/500	Abcam. ab6586
GFP	GFP	conejo	policlonal	IF	1/500	Abcam. ab290
Secundarios						
anti-IgG de conejo-HRP		cerdo		ICQ	1/5000	Dako. P0217
anti-IgG de ratón-Alexa Fluor 568		cabra		IF	1/1000	Life Technol. A11004
anti-IgG de conejo-Alexa Fluor 568		cabra		IF	1/1000	Life Technol. A21069
anti-IgG de ratón-Alexa Fluor 488		cabra		IF	1/1000	Life Technol. A11029
anti-IgG de conejo-Alexa Fluor 488		cabra		IF	1/1000	Life Technol. A11008

MM1.5.3. Citometría de Flujo

A las 48 h post-transfección, los cultivos transfectados con mc.tdTomato, mc.VMD2-tdTomato-SMAR o controles fueron lavados una vez con PBS y las células fueron levantadas con tripsina, recogidas, centrifugadas durante 5 min a 1.200 r.p.m. y resuspendidas en 500 µl de PBS. Seguidamente, las suspensiones celulares fueron analizadas mediante citometría de flujo con el equipo BD LSRFortessa™ X-20 (BD Biosciences. San Jose, CA. USA) cuantificando el número de células positivas por tdTomato usando los parámetros E YG-A vs. FSC-A en una población de 10.000 eventos.

MM1.5.4. Extracción de RNA y qPCR

Células transfectadas con mc.PEDF, mc.VMD2-PEDF-SMAR, mc.SST, mc.VMD2-SST-SMAR o controles fueron lavadas una vez con PBS, se les añadió 200 µl de reactivo Trizol (Sigma-Aldrich, Ref. T9424) por pocillo y fueron recogidas mediante *scraper* en tubos de 1,5 ml. Seguidamente se siguieron las instrucciones del fabricante para la extracción y purificación del RNA: las células recogidas en Trizol fueron incubadas durante 5 min a temperatura ambiente, se les adicionó 40 µl de cloroformo seguido de una incubación de 3 min a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 15 min a máxima velocidad a 4°C para la separación de fases. Pasada la centrifugación se recuperó la fase acuosa de las muestras, donde se encuentra el RNA diluido, y se añadieron 40 µl de isopropanol para inducir la precipitación de éste. Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de centrifugación durante 10 min a máxima velocidad, obteniendo pellets de RNA que fueron finalmente lavados con 200 µl de etanol 70%, vueltos a centrifugar y resuspendidos en 20 µl de agua libre de RNasas. Las muestras de RNA purificado fueron cuantificados usando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo-Fisher), y la calidad de las muestras fue comprobada mediante electroforesis de 500 ng de muestra en gel de agarosa al 1%.

El RNA fue pasado a cDNA usando un kit de retrotranscripción (Applied Biosystems. Foster City, CA, USA. Ref. 4368813) con oligonucleótidos oligo-dT y se comprobó mediante PCR a tiempo final en el termociclador (T100 Thermal Cycler®, Bio Rad) usando oligonucleótidos específicos del gen *housekeeping* GAPDH (Tabla MM-02 oligonucleótidos 1-2).

Finalmente, los niveles de expresión de PEDF o SST en las distintas muestras fueron cuantificados mediante PCR a tiempo real usando un kit de SybrGreen (Roche Diagnostics. Ref. 4707516001) y oligonucleótidos específicos de los dos genes (Tabla MM-02 oligos 3-6).

MM2. GENERACIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN DE PEDF, SST Y tdTOMATO

MM2.1. Materiales y reactivos

Todos los plásmidos usados en los procesos de clonación se especifican en la tabla MM-03.

Las bacterias DH5 α competentes eran de origen comercial (Thermo Fisher. Ref. 18265017). El medio LB (Ref. L1900), el medio LB-Agar (Ref. L3027), la ampicilina (Ref. A9393), la kanamicina (Ref. B5264), el medio Terrific Broth, TB (Ref. T9179) y la L-arabinosa (Ref. 1.01492.0100) se adquirieron de Sigma-Aldrich.

MM2.2. Clonación direccionada de los genes PEDF, SST y tdTomato en el vector pMC.BESPX

Los cDNAs del PEDF y la SST fueron extraídos de los plásmidos pDNR-Dual-PEDF y pDONR-SST respectivamente mediante PCR direccional con oligonucleótidos específicos de los extremos N- y C-Terminal (Tabla MM-02 oligos 7-8 y 9-10 respectivamente), usando una polimerasa *Taq* de alta fidelidad (Roche Diagnostics. Ref. 12140314001). Los productos de PCR fueron insertados en plásmidos pcDNA3.1/V5-His-TOPO siguiendo las instrucciones del fabricante. Se mezclaron 1 μ l de producto de PCR con 1 μ l de plásmido linealizado en un volumen total de 6 μ l, en presencia de 1,2 M NaCl y 0,06 M MgCl₂. La mezcla se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente y seguidamente se procedió a la transformación en células *E. coli* DH5 α competentes mediante choque térmico. Se mezcló todo el volumen de reacción con 100 μ l de bacterias y se dejaron incubando 30 min en hielo, seguido de una incubación de 30 s a 42°C para la internalización de los plásmidos. Acto seguido se volvieron a colocar en hielo durante 2 min y finalmente se añadieron 250 μ l de medio LB y se incubó en agitación durante una h a 37°C previo a la siembra en placas de LB-Agar + Ampicilina. Al día siguiente, se seleccionaron varios clones de cada reacción, se dejaron crecer durante 24 h más en medio LB + Ampicilina y fueron purificados mediante kit *Miniprep* (Qiagen. Werfen España. L'Hospitalet de Llobregat, España. Ref. 27106). Los clones positivos fueron seleccionados por digestión con la enzima de restricción NcoI (New England Biolabs. Ipswich, MA, USA. Ref. R0193S) y análisis de patrón de bandas. Un total de 500 ng de plásmido se mezclaron con 0,5 μ l de enzima en el tampón correspondiente y se incubó durante 2 h a 37°C. Los productos de digestión fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa con SyberSafe (Life Technologies, Ref. S33102). Finalmente, las secuencias se comprobaron mediante secuenciación automática (Macrogen Europe, Amsterdam, Holanda).

Una vez obtenidos los plásmidos pcDNA3.1-PEDF y pcDNA3.1-SST, se procedió al paso del casete de expresión al plásmido pMC.BESPX. Para esto, primero se requirió de incluir las dianas de restricción EcoRI y Sall, a N- y C-terminal respectivamente. Para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos de

los extremos de las secuencias [CMV-PEDF-BGHpA], [CMV-SST-BGHpA] y [CMV-tdTomato-BGHpA] (Tabla MM-02, oligos 11 y 12) y se amplificaron los tres fragmentos por PCR con polimerasa *Taq* de alta fidelidad a partir de los plásmidos pcDNA3.1-PEDF, pcDNA3.1-SST y pcDNA3.1-tdTomato (este último cedido del grupo de la Dra. Abasolo del VHIR), clonándolos seguidamente en plásmidos pCR2.1-TOPO (tabla MM-03) por ligación directa, siguiendo el mismo protocolo que para el plásmido pcDNA3.1. Los clones fueron igualmente purificados con kit *Miniprep* y analizados mediante digestión con enzima de restricción y análisis de patrón de bandas, obteniendo finalmente los vectores pCRII-[CMV-PEDF-BGHpA], pCRII-[CMV-SST-BGHpA] y pCRII-[CMV-tdTomato-BGHpA].

A continuación, se pasaron los casetes de expresión al plásmido pMC.BESPX usando un protocolo de clonación por digestión-ligación. Tanto los plásmidos pCRII de origen, como el plásmido de destino pMC.BESPX fueron mezclados con 1 μ l de las enzimas de restricción EcoRI y Sall y se incubaron durante 8 h a 37°C. Seguidamente, los productos de las digestiones fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa para separar los distintos fragmentos y se aislaron las bandas correspondientes a los insertos [CMV-PEDF-BGHpA], [CMV-SST-BGHpA] y [CMV-tdTomato-BGHpA], así como la banda correspondiente a el vector pMC.BESPX linealizado. Los fragmentos de ADN fueron purificados mediante kit de purificación (Promega Biotech Ibérica. Madrid, Spain. Ref. A9282) siguiendo el protocolo comercial. Una vez purificados, se procedió a realizar las ligaciones del inserto [CMV-PEDF-BGHpA] con el vector pMC.BESPX, el inserto [CMV-SST-BGHpA] con el vector pMC.BESPX y el inserto [CMV-tdTomato-BGHpA] con el vector pMC.BESPX. se mezclaron 90 femtomoles de inserto con 30 femtomoles de plásmido, junto con la ligasa (Life Technologies. Ref. 15224-041) en un volumen final de 10 μ l y en el tampón correspondiente y se dejó incubando durante 16 h a temperatura ambiente. Finalmente, el resultado de las ligaciones fue transformado en células de *E. coli* DH5 α competentes mediante el mismo protocolo de choque térmico y se sembraron en placas de LB-Agar con Kanamicina. Los clones obtenidos fueron igualmente analizados mediante cultivo, purificación por *Miniprep* y análisis de patrón de bandas, obteniendo así finalmente los plásmidos pMC.PEDF, pMC.SST y pMC.tdTomato.

MM2.3. Introducción del promotor VMD-2 y la secuencia S/MAR en los plásmidos pMC.PEDF, pMC.SST y pMC.tdTomato

MM2.3.1. Extracción de ADN genómico de ARPE-19

Las células en cultivo fueron lavadas y se añadió 0,75 – 1 ml de DNAzol (Thermo Fisher. Ref. 10503-027) por cada 10 cm² de superficie de cultivo. El homogenizado obtenido fue pasado a tubo eppendorf limpio y se centrifugó durante 10 min a 10.000 g y 4°C. Se recuperó el sobrenadante viscoso y fue traspasado a un tubo limpio, donde se añadieron 0,5 µl de etanol absoluto por ml de DNAzol, provocando la precipitación del ADN en forma de flóculos blanquecinos. El ADN precipitado fue recuperado, traspasado a un tubo limpio con la ayuda de una pipeta y se lavó dos veces con 1 ml de etanol 75%. Finalmente, el ADN fue sedimentado mediante centrifugación a 1.000 g durante 1-2 min a 4°C, se eliminó los restos de etanol y se solubilizó en 8 mM NaOH, pipeteando despacio, y ajustando el pH con 0,1 M HEPES para facilitar la solubilización. El producto obtenido fue cuantificado mediante el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Fisher).

MM2.3.2. Clonación direccionada de las secuencias VMD-2 y SMAR

La secuencia del promotor VMD-2 humano (figura MM-02) fue amplificada por PCR con polimerasa *Taq* de alta fidelidad usando oligonucleótidos específicos de la secuencia -585+38 (tabla MM-02, oligos 13 y 14) y como molde el ADN genómico extraído de células ARPE-19. La secuencia S/MAR fue amplificada igualmente por PCR (tabla MM-02, oligos 15 y 16) a partir del plásmido pEPI.eGFP (tabla MM-03). Los productos de PCR fueron clonados en plásmidos pCR2.1-TOPO (tabla MM-03) mediante el mismo protocolo comercial explicado anteriormente, obteniendo los vectores pCR2.1-VMD2 y pCR2.1-SMAR. Finalmente, estas dos secuencias fueron introducidas en los plásmidos pMC.PEDF, pMC.SST y pMC.tdTomato mediante dos pasos de digestión/ligación.

En un primer paso, el vector pCR2.1-VMD2 y los plásmidos de destino fueron digeridos con las enzimas HindIII y EcoRV en el caso del PEDF, BamHI en el caso de la SST y BglII con BamHI en el caso de tdTomato, obteniendo por un lado el fragmento VMD-2 aislado con los correspondientes extremos cohesivos en cada caso, y por otro lado los vectores de destino linearizados, sin el promotor CMV, también con los extremos cohesivos correspondientes. Los distintos productos de digestión fueron aislados mediante electroforesis en gel de agarosa y purificados con un kit específico (Promega) a partir de gel de agarosa. Finalmente, se procedió a realizar las ligaciones pMC.PEDF + VMD2, pMC.SST + VMD2 y pMC.tdTomato + VMD2, introduciendo los fragmentos del promotor en N-terminal de las secuencias de los genes PEDF, SST y tdTomato. Los productos de ligación fueron transformados en *E. coli* DH5a competentes por choque térmico y los clones

obtenidos se analizaron por digestión y secuenciación automática, obteniendo finalmente los vectores pMC.VMD2-PEDF, pMC-VMD2-SST y pMC.VMD2-tdTomato.

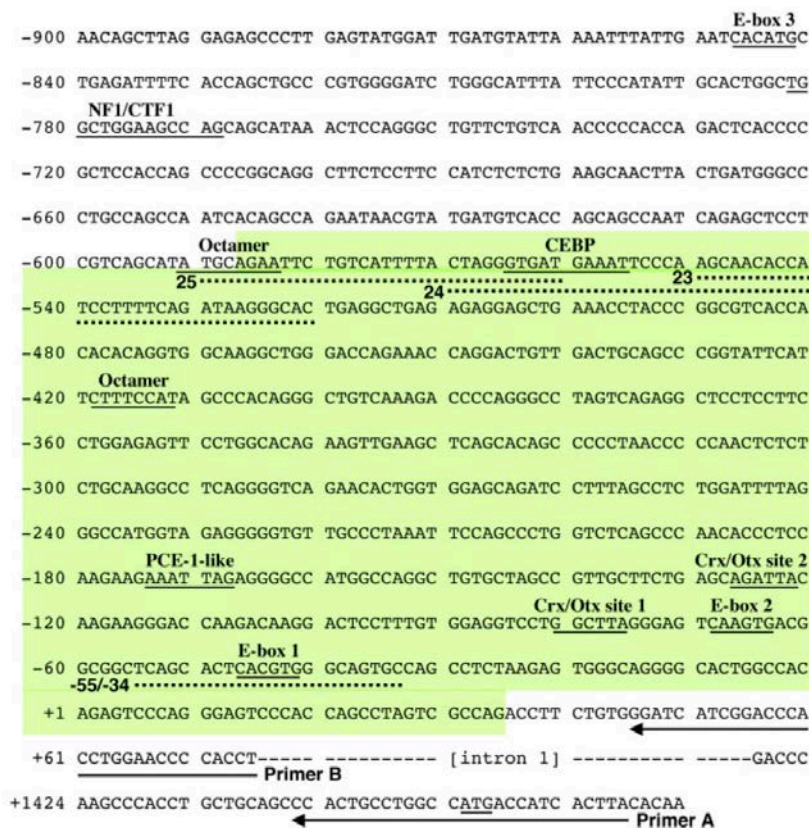


Figura MM-2: región 5'-upstream del promotor VMD-2 humano. En verde esta marcada la secuencia amplificada para su clonación en los vectores de expresión. El inicio de transcripción se marca como +1. Imagen tomada de Esumi, *et al.*, 2004.

En un segundo paso de clonación se procedió a introducir la secuencia S/MAR en los vectores obtenidos, concretamente entre la secuencia del gen y la secuencia de poli-adenilación. El proceso de digestión-ligación fue idéntico al anterior, usando en este caso la enzima de restricción BstBI para la extracción de la secuencia S/MAR del plásmido pCR2.1-SMAR y la linearización de los vectores de destino en el sitio deseado. Finalmente se ligaron los fragmentos SMAR + pMC.VMD2-PEDF, SMAR + pMC.VMD2-SST y SMAR + pMC.VMD2-tdTomato, se transformaron en *E. coli* y se analizaron los clones resultantes, obteniendo así los vectores definitivos pMC.VMD2-PEDF-SMAR, pMC-VMD2-SST-SMAR y pMC-VMD2-tdTomato-SMAR. Estos plásmidos fueron comprobados por secuenciación y se generó un stock a alta concentración mediante cultivos de 400 ml de bacterias transformadas y extracción mediante kit *Maxiprep* (Qiagen. Ref. 12163).

Tabla MM-02: Oligonucleótidos usados en los distintos protocolos.

#	Nombre del oligo	Secuencia (5'→3')	Descripción
1	HS-GAPDH-RTPCR-Fw	TGGTATCGTGAAGGACTCATGAC	Análisis expresión gen GAPDH humano mediante qPCR
2	HS-GAPDH-RTPCR-Rev	ATGCCAGTGAGCTTCCCCTTCAGC	
3	HS-PEDF-RTPCR-Fw	AACGTGCTCCTGTCTCCTCT	Análisis expresión gen PEDF humano mediante qPCR
4	HS-PEDF-RTPCR-Rev	GGGCTGCTGATCAAGTCATA	
5	HS-SST-RTPCR-Fw	AGCAGGATGAAATGAGGCTT	Análisis expresión gen SST humano mediante qPCR
6	HS-SST-RTPCR-Rev	ATTCTTGCAGCCAGCTTTG	
7	PEDF-Cloning-Fw	CATGCAGGCCCTGGTGCTACT	Amplificación cDNA PEDF humano
8	PEDF-Cloning-Rev	GTCGACCTAGGGGCCCTGGGGTC	
9	SST-Cloning-Fw	ATGCTGCTCCTGCCGCCT	Amplificación cDNA SST humano
10	SST-Cloning-Rev	CTAACAGGATGTGAAAGTCTTCC	
11	pcDNA-tO-pMC cloning-Fw	ATGTCATGAATCCGATGTACGGGCCAGATATAC	Amplificación secuencias [CMV-gen-BGHpA] introduciendo dianas EcoRI y Sall en los extremos
12	pcDNA-tO-pMC cloning-Rev	TACAAGTGTGCACATCCCCAGCATGCCTG	
13	VMD2-Fw	AATTCTGTCATTTACTAGGGTGATG	Amplificación secuencia promotor VMD-2 (-585+38)
14	VMD2-Rev	GGATCCGGTCTGGCGACTAGGCTGGT	
15	SMAR-Fw	AGTTCGAACCTAGGTCTAGATCTAAATAAACTTATAAATTGTGAGAG	Amplificación secuencia S/MAR
16	SMAR-Rev	ATCAAATTCGAATCTAGATCCGGTGGATCCCGGGCCC	
17	Rat_TNFa_Fw	ACACCATGAGCACGAAAGC	Análisis expresión gen TNFa de rata mediante qPCR
18	Rat_TNFa_Rev	CCGCCACGAGCAGGAA	
19	Rat/Mouse_GFAP_Fw	CGCTGGAGGAGGAGATCCA	Análisis expresión gen GFAP de rata y ratón mediante qPCR
20	Rat/Mouse_GFAP_Rev	ACATCCATCTCCACGTGGACC	
21	Rat_VCAM1_Fw	ATCTTCGAGCCTCAACGG	Análisis expresión gen VCAM-1 de rata mediante qPCR
22	Rat_VCAM1_Rev	CCAATCTGAGCGAGCGTTT	
23	Rat_ICAM1_Fw	CGGGTTTGGGCTTCTCC	Análisis expresión gen ICAM-1 de rata mediante qPCR
24	Rat_ICAM1_Rev	GCCACTGCTCGTCCACATAG	
25	Rat_VEGF_Fw	GCGGGCTGCTGCAATG	Análisis expresión gen VEGF de rata mediante qPCR
26	Rat_VEGF_Rev	TGCAACGCGAGTCTGTGTTT	
27	Rat_PEDF_RTPCR_Fw	AACATTCTGCTGTCTCCTCT	Análisis expresión gen PEDF de rata mediante qPCR
28	Rat_PEDF_RTPCR_Rev	GATTGTTGATCAAGTCGTAG	
29	Rat_SST_RTPCR_Fw	AGCAGGACGAGATGAGGCTG	Análisis expresión gen SST de rata mediante qPCR
30	Rat_SST_RTPCR_Rev	GTTCTTGCAGCCAGCTTTG	
31	Mouse_B2M_Fw	GTCTTTCTGGTGCTTGTCTCAC	Análisis expresión gen B2M de ratón mediante qPCR
32	Mouse_B2M_Rev	CGTAGCAGTTCAGTATGTTCCG	
33	Mouse_MCP1_Fw	AATGGGTCCAGAAGTACATTAGAAA	Análisis expresión gen MCP-1 de ratón mediante qPCR
34	Mouse_MCP1_Rev	GGTCTGAAGTCCTTAGGGTTG	
35	Mouse_TNFa_F	ATTCGAGTGACAAGCCTGTAG	Análisis expresión gen TNFa de ratón mediante qPCR
36	Mouse_TNFa_R	GGTTGTCTTTGAGATCCATGC	
37	Mouse_ICAM-1_Fw	CGCTACCATCACCGTGTATTC	Análisis expresión gen ICAM-1 de ratón mediante qPCR
38	Mouse_ICAM-1_Rev	GTGAGGTCCTTGCCACTTGTG	
39	Mouse_PIGF_Fw	AGCGACAAGGAACAGAACG	Análisis expresión gen PIGF de ratón mediante qPCR
40	Mouse_PIGF_Rev	AACTAATCTCCACACCAGCAC	
41	Mouse_VEGF165_Fw	ACAGAACAAAGCCAGAAAATCAC	Análisis expresión gen VEGF-165 de ratón mediante qPCR
42	Mouse_VEGF165_Rev	TCGCCTTGAACCGGAGTC	
43	Mouse_VEGF120_Fw	ACTGGACCCTGGCTTTACTG	Análisis expresión gen VEGF-120 de ratón mediante qPCR
44	Mouse_VEGF120_Rev	TCTGCTCTCCTTCTGTCTGTG	

MM2.4. Generación de los minicírculos

MM2.4.1. Generación de bacterias ZYCY10P3S2T electrocompetentes

Las bacterias ZYCY10P3S2T se obtuvieron por cesión del laboratorio del Dr. Chen (Department of Pediatrics and Department of Genetics, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA). Se realizó una estría en una placa de LB-Agar sin antibiótico partiendo de un glicerinado de bacterias y se dejó crecer durante una noche para la obtención de colonias. Se seleccionó una colonia, se inocularon 80 ml de medio 2LB y se dejó incubando en agitación durante 24 h a 37°C. Al día siguiente, se usó el cultivo para inocular 800 ml de LB y se incubó a 37°C en agitación, midiendo la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) cada h hasta que ésta estuvo a 0,8. En este punto, el cultivo se pasó a hielo para parar el crecimiento y se procedió a precipitar las bacterias por centrifugación a 4000 r.p.m. durante 5 min. Se eliminó el medio de cultivo y se resuspendió en 40 ml de agua estéril fría. Se repitió el proceso de centrifugación y resuspensión dos veces más y finalmente se resuspendió en 4 ml de solución al 10% de glicerol estéril. Esta suspensión altamente concentrada de bacterias fue alicuotada en criotubos con 100 μ l cada uno y se congelaron a -80°C, creando un banco de bacterias ZYCY10P3S2T electrocompetentes.

MM2.4.2. Generación de los minicírculos

Los plásmidos precursores de minicírculos (pMC.PEDF, pMC.SST, pMC.tdTomato, pMC.VMD2-PEDF-SMAR, pMC.VMD2-SST-SMAR y pMC-VMD2-tdTomato-SMAR) fueron transformados en bacterias *E. coli* de la cepa ZYCY10P3S2T electrocompetentes mediante electroporación. Se mezclaron 1 μ l de plásmido, obtenido por *Maxiprep*, con 100 μ l de suspensión de bacterias, se introdujeron en una cubeta de electroporación (Bio-Rad. Ref. 1652083) y se sometieron a un pulso eléctrico de 25 μ DF, 200 Ω y 1,8 kV. Inmediatamente después se añadió 1 ml de medio LB a temperatura ambiente y se recuperaron las células electroporadas en un tubo eppendorf limpio, dejándolas 1 h en agitación a 37°C. Finalmente, se sembraron en placas de LB-Agar con kanamicina para seleccionar aquellas que hubieran incorporado los plásmidos.

Una vez seleccionadas las colonias de *E. coli* ZYCY10P3S2T con los distintos plásmidos incorporados, se inocularon con éstas tubos con 5 ml de LB con kanamicina y se dejaron crecer durante una noche a 37°C en agitación. Al día siguiente, los cultivos fueron utilizados para inocular frascos con 200 ml de medio TB con kanamicina y se dejaron incubando durante una noche más a 37°C en agitación. Los cultivos y se mantuvieron en crecimiento hasta que la DO_{600} ésta estuvo entre 4 y 5. Una vez obtenida la densidad deseada, se comprobó que el pH estuviera alrededor de 6,5, corrigiéndolo en los casos en que fuera necesario. Los cultivos a DO_{600} 4-5 y pH 6,5 se mezclaron con 200 ml de

mezcla de inducción, compuesta por 190 ml de LB, 8 ml de NaOH 1N y 1 ml de L-arabinosa 20%. Las mezclas, de un volumen total de 400 ml, fueron incubadas durante un mínimo de 5 h a 32°C en agitación y finalmente se procedió a la purificación de los plásmidos resultantes mediante kit *Maxiprep*. Los plásmidos, productos de la inducción de la generación de minicírculos, fueron analizados mediante digestión con EcoRV (New England Biolabs. Ref. R0195S) y electroforesis en gel de agarosa para visualizar las bandas correspondientes a los distintos vectores linearizados.

Tabla MM-03: Lista de plásmidos usados en los experimentos de clonación.

Nombre del plásmido	Características	Origen
pDONR201-SST	cDNA de la SST humana proveniente de tejido de placenta y cerebro, insertado entre 2 att's.	Harvard Medical School
pDNR-Dual-PEDF	cDNA del PEDF humano clonado en MCS	Harvard Medical School
pCR™2.1-TOPO®	Plásmido para sub-clonación por inserción directa de productos de PCR amplificados por polimerasa <i>Taq</i>	Life Technologies, ref. K4500-01
pcDNA3.1/V5-His-TOPO®	Plásmido para sub-clonación por inserción directa de productos de PCR amplificados por polimerasa <i>Taq</i> , en medio del cassette de expresión en eucariotas (promotor CMV y secuencia de ploi-adenimación de BGH)	Life Technologies, ref. K4800-01
pcDNA3.1-tdTomato	Gen tdTomato intertado en el MCS del plásmido pcDNA3.1 (+/-) (Life Technologies, ref. V790-20), de expresión en eucariotas bajo promotor CMV	Cesión del grupo de la Dra. Ibane Abasolo (CIBBIM-Nnanomedicina, VHIR, Barcelona)
pMC.BESPX	Plásmido diseñado para la generación de minicírculos, con MCS flanqueado por secuencias de recombinación <i>att</i> y 32 dianas por iScel.	Cesión del grupo del Dr. Chen (Stanford University school of Medicine).
pEPI-eGFP	Plásmido de expresión en eucariotas de gen eGFP bajo promotor CMV y seguido de secuencia S/MAR	Cesión del grupo del Dr. Lipps (Centre for Biomedical Education and Research, University of Witten/Herdecke, Germany)

MM3. EXPERIMENTOS CON ANIMALES: TÉCNICAS IN VIVO

MM3.1. Animales usados en los procesos experimentales

Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) del Hospital Valle de Hebrón de Barcelona. Para la generación del modelo de retinopatía diabética no proliferativa se usaron ratas *wild-type* de la cepa Long Evans, procedentes de Janvier Labs. (Le Genest-Saint-Isle, Francia). Para la generación del modelo de neovascularización coroidea se usaron ratones *wild-type* de la cepa C57BL/6N, procedentes de Charles River (Charles River Laboratories International, Inc.). Para los experimentos de inyección sub-retiniana y transfección *in vivo* se usaron ratas *wild-type* Long Evans y ratones *wild-type* C57BL/6J. Todos los animales en todos los procesos experimentales se mantuvieron en ciclos de 12 h de luz / 12 h de oscuridad, con suministro de comida y agua *ad libitum*.

MM3.2. Generación del modelo de diabetes inducido con estreptozotocina (STZ) en rata

Para el modelo de diabetes inducida se usaron ratas de la cepa Long Evans machos de entre 200 y 250 g de peso corporal. La hiperglicemia fue inducida mediante una única inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ, 65 mg/kg; Sigma-Aldrich. Ref. S0130) disuelto en tampón citrato 0,1 M (pH 4.0); las ratas control fueron inyectadas con vehículo (PBS) solo. La diabetes fue definida como dos lecturas sucesivas de niveles de glucosa en sangre más altos que 250 mg/dL, que ocurrió a los 2-3 días después de la administración de STZ. El peso corporal y los niveles de glucosa en sangre se monitorizaron una vez a la semana.

El diseño experimental se detalla en la figura MM-03. Se realizó un primer experimento con 10 animales por grupo, que fueron utilizados para las pruebas de función visual *in vivo* (electroretinografía y angiografía fluoresceínica), realizando análisis pre-inducción y mensualmente hasta los 3 meses post-inducción.

En un segundo experimento se usaron 18 ratas control y 18 ratas diabéticas, que fueron eutanasiadas para las pruebas post-mortem a 1, 2 y 3 meses post-inducción, asignando 6 animales por grupo. En cada punto temporal, los ojos de los animales eutanasiados fueron usados para histología (ojo derecho) y para extracción de RNA (ojo izquierdo).

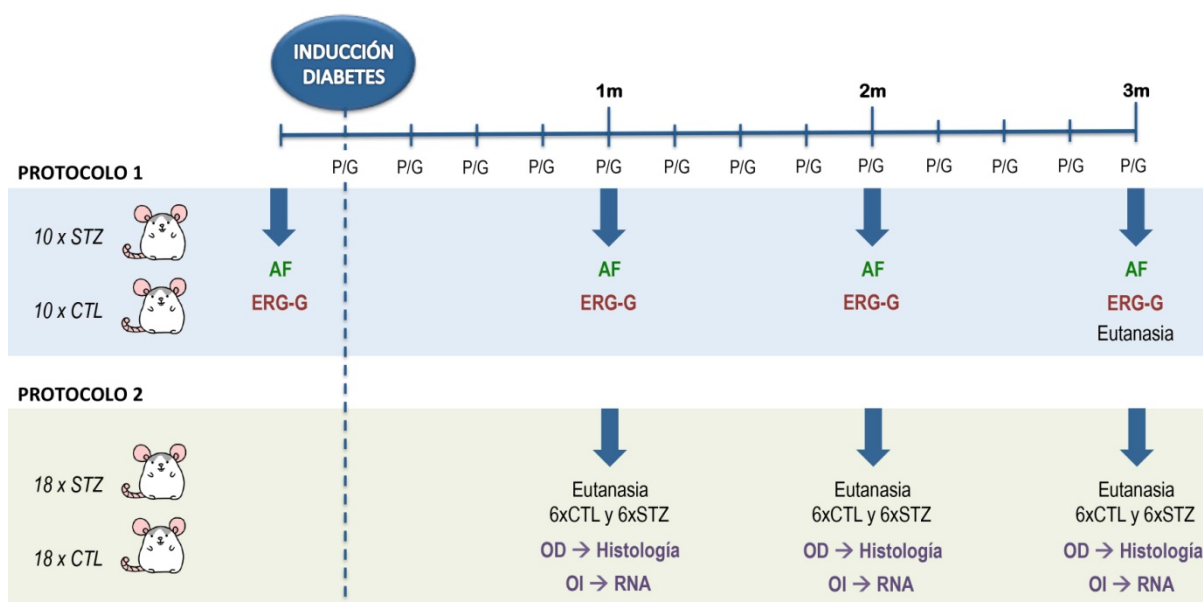


Figura MM-03: Diseño experimental de los procedimientos de generación y caracterización del modelo de RD en rata inducido con STZ. CTL, control, OD, ojo derecho; OI, ojo izquierdo.

MM3.3. Generación del modelo de neovascularización coroidea en ratón mediante fotocoagulación con láser

Para la generación del modelo de neovascularización coroidea (NVC) se usaron ratones de la cepa C57BL/6N machos de entre 9 y 10 semanas de edad. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de 2% isofluorano (Aerrane®. Laboratorios Baxter, Victoria, Australia)/1% O₂, primero en caja de inducción y posteriormente se mantuvieron con una mascarilla (World Precision Instruments, ref. OC-ALLFM-KIT) acoplada al equipo de suministro de anestesia inhalatoria. Las pupilas fueron dilatadas con una gota de tropicamida (Colorcusi Tropicamida® 10 mg/ml. Laboratorios Alcon Cusí. El Masnou, España) administrada en la superficie ocular. Una vez dilatadas las pupilas, los animales fueron colocados en la plataforma del equipo MicronIII (Laboratorios Phoenix Research. Pleasanton, USA), encima de una almohadilla térmica para mantener su temperatura corporal durante el procedimiento.

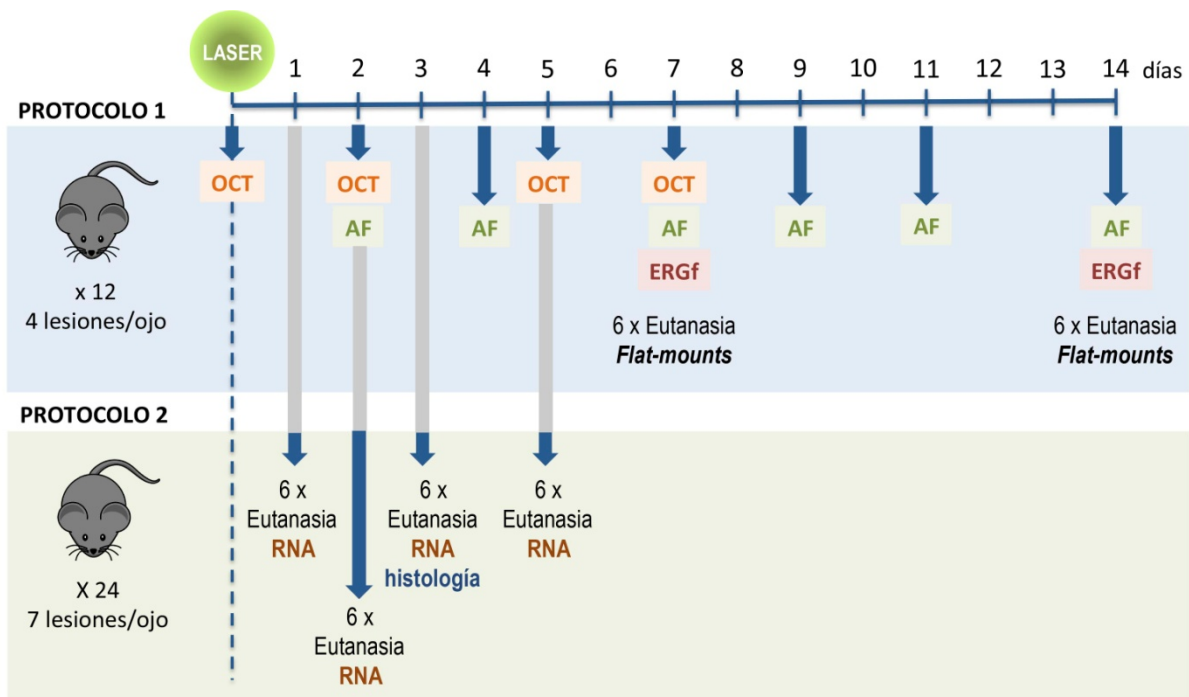


Figura MM-04: Diseño experimental de los procedimientos de generación y caracterización del modelo de NVC inducida con láser en ratón. OCT, tomografía de coherencia óptica; AF, angiografía fluoresceínica; ERGf, electroretinograma focal.

La fotocoagulación con láser fue realizada usando el sistema de láser guiado por imagen, acoplado a la cámara del equipo MicronIII. El ojo del animal fue hidratado con metilcelulosa (Methocel® 2%. OmniVision, Neuhausen, Alemania) y puesto en contacto con la lente del equipo para la visualización del fondo del ojo y la colocación del spot del láser en el lugar deseado. Se realizaron 4 o 7 lesiones (dependiendo del experimento) a la misma distancia del nervio óptico en retina central, con láser de Argón de 532 nm de longitud de onda y un diámetro fijo de 50 micras, realizando pulsos de 100 ms

de duración a una potencia de 250 mW. Una vez realizadas las lesiones con láser se tomaron fotografías de fondo de ojo y los animales fueron retirados de la anestesia y colocados sobre alfombra térmica hasta su recuperación.

El diseño experimental se detalla en la figura MM-04. Se realizaron dos experimentos independientes, uno para el análisis angiográfico, funcional y histológico de las lesiones y otro para el análisis de la expresión génica.

En el primer caso se realizaron 4 lesiones por ojo en 12 ratones y se mantuvieron durante 7 o 14 días, durante los cuales se analizó la función visual por electroretinografía focal y se determinó la progresión de las lesiones mediante angiografía fluoresceínica. A punto final (6 animales a 7 días post-láser y 6 animales a 14 días), los ojos fueron usados para detección de NVC por inmunofluorescencia en *flat-mounts*.

En un segundo experimento, se realizaron 7 lesiones por ojo en 24 ratones y se mantuvieron 6 ratones sin lesionar (controles). Los animales sometidos a láser fueron repartidos en 4 grupos para la evaluación post-mortem de los niveles de expresión génica en ojo de distintos factores inflamatorios y angiogénicos, a 1, 2, 3 y 5 días post-láser.

MM3.4. Electroretinograma

El electroretinograma (ERG) es una técnica diagnóstica que consiste en la estimulación de la retina mediante flashes de luz a distintas intensidades y la lectura de la respuesta retiniana recogida a través de un electrodo colocado en la córnea del animal, que capta los potenciales eléctricos emitidos por los distintos tipos celulares en la retina. Las condiciones de estímulo (patrón de estímulo o intensidad de flash, presencia o no de luz ambiental y adaptación o no a la oscuridad) pueden provocar señales más o menos fuertes provenientes de ciertos componentes de la retina, permitiendo así aislar la respuesta de los distintos tipos celulares.

MM3.4.1. Electroretinograma Ganzfeld en el modelo de diabetes inducida en rata

El electroretinograma Ganzfeld (ERG-G) mide la actividad eléctrica de toda la retina en respuesta a un estímulo luminoso proveniente de una fuente de luz. Para realizar esta técnica se usó el sistema ERG Ganzfeld del equipo MicronIV (Phoenix Research Labs), optimizado para el registro de respuestas de retina de roedor.

Las ratas diabéticas o control fueron adaptadas a oscuridad absoluta durante 16 h antes de la realización del ERG-G y todo el procedimiento experimental se realizó en condiciones de oscuridad, iluminando sólo con luz roja de baja intensidad que no estimula la retina de roedores. Los animales fueron anestesiados con 2% isoflurano/1% O₂, primero en caja de inducción y seguidamente colocándolos en la plataforma del equipo MicronIII con mascarilla, encima de una almohadilla térmica. Las pupilas fueron dilatadas con un gota de tropicamida y una gota de fenilefrina (Colircusí Fenilefrina® 100 mg/ml. Laboratorios Alcon Cusí) y se administró también una gota de prescaína 0,4% (Laboratorios Llorens, S.L. Barcelona, España) como anestésico tópico ocular para minimizar la rotación de los ojos. El electrodo de referencia se colocó por vía subcutánea en el cuero cabelludo anterior entre los ojos, y se insertó el electrodo de tierra en la cola. La lente, conteniendo el electrodo corneal, se colocó alineada con el eje visual, en contacto con la córnea, enfocando a la retina central. Una vez colocado el animal se procedió a la realización del electroretinograma, estimulando el ojo con flashes de luz a distintas intensidades, empezando por 0 cd·s·m⁻² (señal basal) y aumentando progresivamente en un orden de 10 veces, pasando por 0.01, 0.078, 1,25 y finalmente 10 cd·s·m⁻². Se realizaron 10 flashes por cada intensidad, recogiendo las señales en gráficos que fueron posteriormente analizados mediante el software Labscribe® (Phoenix Research Labs). Se realizaron lecturas de los dos ojos por separado de cada animal. Al finalizar el protocolo, los animales fueron retirados de la anestesia y colocados sobre manta térmica hasta su recuperación.

MM3.4.2. Electroretinograma focal en el modelo de NVC en ratón

El electroretinograma focal (ERGf) permite medir la respuesta de un área concreta de la retina. Esta técnica se realizó con el equipo ERG focal guiado por imagen acoplado al retinógrafo MicronIII (Phoenix Research Labs), que permite la colocación del spot de lectura con luz roja de baja intensidad, en el área deseada de la retina por imagen a tiempo real.

Los ratones control o lesionados con láser fueron adaptados a oscuridad absoluta durante 16 h antes de la realización del ERGf. Para la realización del procedimiento, fueron anestesiados con 2% isoflurano/1% O₂, primero en caja de inducción y después se mantuvieron con mascarilla. Se colocaron en la plataforma del equipo MicronIII encima de la almohadilla térmica y se les aplicó tropicamida para dilatar las pupilas. El electrodo de referencia se colocó por vía subcutánea en el cuero cabelludo anterior entre los ojos y se insertó el electrodo de tierra en la cola. La lente del ERGf, conteniendo el electrodo corneal, se puso en contacto con la córnea del ojo a analizar, alineada con el eje visual y se procedió a visualizar el fondo de ojo con luz roja de baja intensidad. Se determinó la zona a analizar (zona control o zona lesionada) y se colocó encima el spot de luz, de 0,75 mm de diámetro. Seguidamente se procedió a la realización de las medidas electroretinográficas en la zona seleccionada mediante estimulación con flashes de luz a distinta intensidad, empezando por 0

cd·s·m⁻² (señal basal) y después a 200, 800 y 12.800 cd·s·m⁻², realizando 10 flashes por cada intensidad. Los datos recogidos fueron posteriormente analizados mediante el software Labscribe®. Al finalizar el protocolo, los animales fueron retirados de la anestesia y colocados sobre manta térmica hasta su recuperación.

MM3.5. Angiografía fluoresceínica

La angiografía fluoresceínica (AF) es una técnica no invasiva *in vivo* que, mediante la administración de un compuesto fluorescente, permite la visualización de la red vascular de la retina bajo un filtro de fluorescencia. Para la visualización de la red vascular retiniana se usó el microscopio de imagen de la retina especializado para rata y ratón, MicronIII, que dispone de un filtro azul para visualización de fluorescencia verde.

MM3.5.1. AF en modelo de diabetes en rata

Las ratas STZ o control fueron sometidas a AF en 4 momentos: pre-inducción de la diabetes, y 1 mes, 2 meses y 3 meses post-inducción. Los animales fueron anestesiados con 2% isoflurano/1% O₂ y mantenidos con mascarilla durante todo el procedimiento. Las pupilas se dilataron con una gota de tropicamida y una gota de fenilefrina, y se administró una gota de prescaína como anestésico tópico para evitar la rotación de los ojos. Una vez anestesiados y las pupilas dilatadas, fueron colocados en la plataforma del retinógrafo sobre la almohadilla térmica y se les administró 1,5 µl/g de fluoresceína sódica al 1% (Fluoresceína Oculis 10%, 500 mg/5 ml. Laboratorios Thea, S.A. Barcelona, España) por vía intraperitoneal. Acto seguido, los ojos se pusieron en contacto con la lente del retinógrafo y se enfocó la retina centrando el nervio óptico. Se tomaron imágenes de fondo de ojo de ambos ojos bajo filtro de fluorescencia a 1 y 5 min post-administración de fluoresceína y finalmente los animales fueron retirados de la anestesia y colocados en manta térmica hasta su recuperación.

MM3.5.2. AF en modelo de NVC en ratón

Los ratones a los que se realizó láser en 4 spots de la retina fueron sometidos a AF en los días 2, 4, 7, 9, 11 y 14 post-láser, para la visualización y análisis de las lesiones neovasculares. El protocolo seguido fue el mismo que en el caso de las ratas, administrando en este caso 10 µl/g de fluoresceína al 0,1% por vía intraperitoneal. Se tomaron imágenes de fondo de ojo a 1 y 5 min post-administración de fluoresceína, que fueron analizadas posteriormente para la cuantificación de las áreas neovasculares mediante software *Image-J*.

MM3.6. Tomografía de coherencia Óptica

La tomografía de coherencia óptica (OCT) es una técnica de imagen tomográfica óptica, no invasiva e interferométrica, que ofrece una penetración de milímetros (aproximadamente 2-3 mm en el tejido o material de que se trate) con resolución axial y lateral de escala micrométrica, permitiendo la adquisición de imágenes transversales de la retina con resolución a nivel micrométrico. Esta técnica se realizó con el equipo de OCT guiado por imagen (Phoenix Research Labs) acoplado al retinógrafo MicronIII, específicamente diseñado para rata y ratón.

Se realizó OCT en ratones sometidos a láser en 4 spots de la retina. Las pupilas fueron dilatadas con una gota de tropicamida tópica después de la inducción de la anestesia con 2% isofluorano/1% O₂, de la misma manera que en los procedimientos anteriores. Los animales fueron colocados en la plataforma del equipo y los ojos puestos en contacto con la lente del OCT para la adquisición de imágenes tanto de fondo de ojo como de escáneres OCT, siguiendo las instrucciones del fabricante y mediante el uso del software *InEye*[®] (Phoenix Research Labs). Se realizaron escáneres de las zonas lesionadas con láser en el día de la realización de las lesiones, para comprobar la rotura de la membrana de Bruch, y a 2, 5 y 7 días post-láser, para la monitorización de la evolución de las lesiones y la aparición de líquido sub-retiniano.

MM3.7. Inyección sub-retiniana

Los animales sometidos a esta técnica fueron anestesiados con 2% isofluorano/1% O₂ y mantenidos con una mascarilla. Se usó una cinta pegada a la mascarilla para inmovilizar la cabeza en la mesa de trabajo. Las pupilas fueron dilatadas con una mezcla de tropicamida y fenilefrina. Para exponer la conjuntiva bulbar superior, bajo un microscopio quirúrgico, se realizaron suturas simples en el párpado superior y en la conjuntiva limbal superior con Prolene[™] 7/0 Ethicon (Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ). Una vez se consiguió la estabilización del globo ocular y la correcta exposición del área quirúrgica, la conjuntiva bulbar superior y la cápsula de Tenon fueron disecionadas para exponer la esclera dorsal. Se realizó una esclerotomía de 2 mm utilizando un bisturí biselado de 20 G, a 4 mm del limbo (a las 11 h), cortando esclera y coroides pero sin traspasar la retina. Se usó una aguja roma de 36 G unida a una jeringa de 10 µl (Nanofil. World Precision Instruments, Sarasota, USA) para cargar 2 µl de la solución a inyectar (PBS o mezcla de transfección). La punta de la aguja fue introducida tangencialmente en el espacio sub-retiniano a través de la esclerotomía y se procedió a administrar el contenido de ésta. Al finalizar la administración, se retiró la aguja lentamente intentando minimizar el reflujo y se retiraron las suturas, permitiendo a la conjuntiva volver a su

posición en el área de inyección. Finalmente se administró una gota de tobramicina (TobraDex® 3 mg/ml, Laboratorios Alcon Cusí) como tratamiento antibiótico. Todo el material usado en el procedimiento se muestra en la figura MM-05.

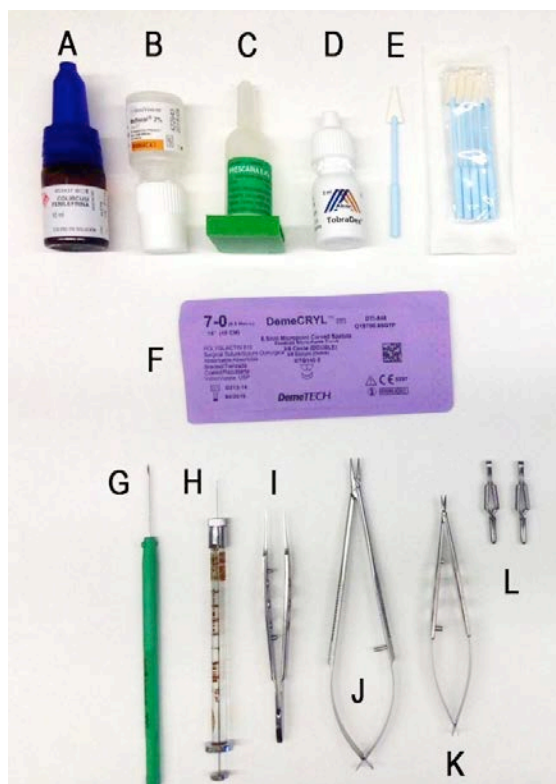


Figura MM-05: Material usado en el procedimiento de inyección sub-retiniana. A) Dilatador tópico (fenilefrina o tropicamida); B) metilcelulosa; C) anestésico tópico (prescaína); D) antibiótico tópico (Tobradex); E) Esponjas para limpiar la zona ocular; F) hilo de sutura de 7-0; G) lanceta para realizar corte en esclera; H) jeringa y aguja de inyección, con punta roma de 36G; I) pinzas; J) porta-agujas; K) microtijeras; L) moscas para sujetar los hilos de sutura.

MM4. EXPERIMENTOS CON ANIMALES: TÉCNICAS POST-MORTEM

MM4.1. Eutanasia y procesamiento de los tejidos

Los animales fueron eutanasiados mediante asfixia con CO₂ en cámara de inducción. Una vez eutanasiados, se procedió a la enucleación de los ojos con la ayuda de material de disección, pasándolos a solución salina en hielo o sumergiéndolos en una solución de estabilización del RNA (RNAlater®. Ambion. Ref. AM7020), ya fuera para histología o para extracción de RNA respectivamente.

Los ojos destinados a histología fueron directamente sumergidos en medio de congelación O.C.T. (Tissue-Tek®. Sakura Finetek. Torrance, CA, USA. Ref. 4583) dentro de moldes de plástico y se congelaron en cubetas metálicas en contacto con nitrógeno líquido, generando los bloques que posteriormente serían procesados en el criostato. Los ojos se cortaron en criosecciones de 7 micras de grosor, colocando 4 o 6 secciones por portaobjeto y almacenándolas a -80°C.

MM4.2. Técnicas de análisis genético

MM4.2.1. Extracción de RNA

Para la extracción de RNA de retina de rata se procedió a la disección de los ojos bajo lupa, separando el polo posterior del polo anterior mediante corte en la *ora serrata* y aislando la retina, que fue congelada directamente en nitrógeno líquido. Se procedió a realizar 3 ciclos de congelación-descongelación con baño a 37°C y nitrógeno líquido para ayudar a la disrupción de los tejidos y seguidamente se añadió 200 µl de Trizol por ojo. Las muestras fueron seguidamente homogeneizadas usando un homogeneizador eléctrico (VWR® pellet mixer. VWR) y se procedió a realizar la extracción del RNA siguiendo las instrucciones del fabricante del reactivo Trizol (explicado en el apartado 1.5.4). Finalmente, los pellets de RNA fueron resuspendidos en 20 µl de agua libre de RNasas y se cuantificó con el equipo Nanodrop. La calidad de las muestras fue determinada por electroforesis en gel de agarosa.

En el caso de la extracción de RNA de ojo de ratón, los ojos fueron igualmente diseccionados bajo lupa pero se recogió todo el polo posterior, incluyendo retina, EPR, coroides y esclera. Seguidamente se siguió el mismo procedimiento que con los ojos de rata.

MM4.2.2. Retrotranscripción y PCR a tiempo real

Se usó el kit de retrotranscripción siguiendo las instrucciones del fabricante para pasar el mRNA a cDNA y éste fue comprobado mediante PCR a punto final y oligonucleótidos específicos del gen constitutivo GAPDH (tabla MM-02, oligos 1 y 2). La expresión de TNF- α , GFAP, VCAM-1, ICAM-1, VEGF, PEDF, SST, y MCP-1 fue analizada mediante PCR a tiempo real usando el kit de SyberGreen, con oligonucleótidos específicos diseñados para cada especie (tabla MM-02, oligos 17-44).

MM4.3. Técnicas de análisis histológico

MM4.3.1. Hematoxilina/Eosina

Las criosecciones de ojos de rata o ratón fueron atemperadas durante 15 min y seguidamente fijadas con solución 95% metanol – 5% ácido acético sumergiéndolas durante 1 min a -20°C. Seguidamente se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS y se procedió a la tinción con hematoxilina-eosina, sumergiendo primeramente las preparaciones durante 1 min en hematoxilina (VWR Chemicals. Ref. 351945S), pasando por lavado con agua del grifo para eliminar el exceso de tinción y seguidamente sumergiéndolas en solución eosina (Alfa Aesar. Karlsruhe, Alemania. Ref. B24535) durante 1 min más. Finalmente, se realizó la deshidratación pasando por soluciones de etanol a concentraciones

crecientes (50% - 70% - 80% - 95% - 100%), 1 min en cada una, terminando con incubación de 2 min en xileno. Las preparaciones fueron fijadas con medio de montaje DPX (VWR Chemicals. Ref. 1.005.790.500) y cubiertas con cubreobjetos antes de ser visualizadas en microscopio de campo claro, donde se tomaron imágenes para ser analizadas.

MM4.3.2. Inmunofluorescencia en *flat-mounts*

A los 7 o 14 días post-láser, los ojos de ratón enucleados fueron mantenidos en PBS en hielo hasta el momento de la disección bajo lupa. La disección se realizó siguiendo el esquema de la figura MM-06, realizando un corte en la *ora serrata* para separar el polo anterior del polo posterior, eliminando la córnea y el cristalino. Se separó y descartó la retina, y el resto de polo posterior (EPR, coroides y esclera) fue sometido a cortes radiales para conseguir una preparación plana del tejido (figura mm-06). Las muestras se colocaron en placas de 48 pocillos donde se realizó todo el procedimiento. El tejido fue fijado en metanol 30 min a -20°C y posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 min con 0,1% Tween en PBS (PBS-T). El bloqueo se realizó con 3% BSA en PBS-T durante 1 h a temperatura ambiente, seguido por la incubación con Isolectina-B4 (Sigma-Aldrich. Ref. L2895) conjugada a FITC, diluida 1:50 en 3% BSA en PBS-T. Se dejó incubado durante una noche a 4°C y al día siguiente se realizaron 5 lavados de 10 min con PBS-T en oscuridad antes del montaje de las muestras en portaobjetos con medio Fluoroshield con DAPI. Las preparaciones se guardaron a 4°C hasta el momento de la visualización en microscopio de fluorescencia para la toma de fotografías de las lesiones neovasculares.

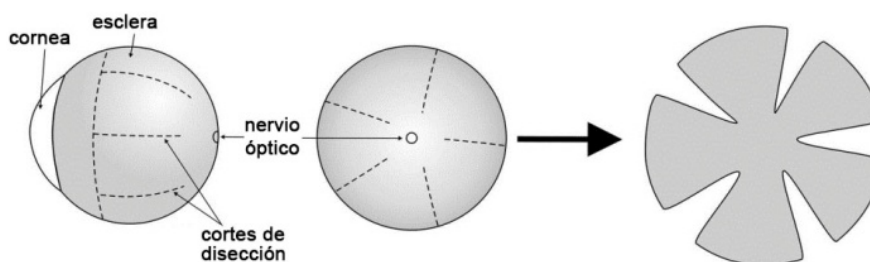


Figura MM-06: representación esquemática de la disección ocular para la preparación de los ojos en *flat-mount*.

MM4.3.3. Inmunofluorescencia en criosecciones

Las criosecciones de ojos de rata o ratón fueron atemperadas durante 15 min y seguidamente fijadas durante 1 min a -20°C con solución 95% metanol – 5% ácido acético. Se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS y las preparaciones se colocaron en una cámara húmeda para la continuación del protocolo. Primero se realizó el bloqueo con 1% BSA, 5% suero de oveja y 0,3% tritón X-100 en PBS durante 1 h a temperatura ambiente, cubriendo totalmente las muestras de tejido. Seguidamente se

procedió a la incubación con los anticuerpos primarios diluidos en 1% BSA y 1% suero de oveja PBS-T, a una dilución concreta para cada anticuerpo (tabla MM-01). Se aplicaron 50 microlitros de dilución de anticuerpos en cada preparación y se cubrieron con parafilm, para crear una capa uniforme y evitar la evaporación de líquido. Se dejó incubado durante toda una noche a 4°C en cámara húmeda y al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS antes de realizar la incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes (tabla MM-01), igualmente diluidos en 1% BSA y 1% suero de oveja en PBS-T, en oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente se volvieron a realizar 3 lavados con PBS para eliminar los restos de anticuerpo y las muestras se montaron con medio Fluoroshield con DAPI para la contra-tinción de los núcleos.

Las preparaciones fueron observadas en el microscopio confocal donde se tomaron imágenes aplicando los distintos filtros de fluorescencia según el anticuerpo usado.

MM4.3.4. TUNEL

Se realizó la técnica de marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL por sus siglas en inglés) para la detección de fragmentación de ADN y por tanto la detección de células apoptóticas, en criosecciones de ojo de rata.

Se usó el kit comercial Click-iT® (Thermo-Fisher, ref. C10245), que marca las células positivas con marcaje fluorescente AlexaFluor® 488, siguiendo las instrucciones del fabricante: se realizó un primer paso de fijación y permeabilización de las muestras congeladas, realizando una primera incubación con 4% PFA durante 15 min a 37°C, seguido de dos lavados con PBS y permeabilización con una solución de proteinasa-K 20 µg/ml durante 15 min más a 37°C. El control positivo se dispuso en una sola muestra realizando una incubación con DNasa (1U/muestra. Thermo Fisher. Ref. 18068015) durante 30 min a temperatura ambiente para provocar la fragmentación del ADN. Seguidamente todas las preparaciones fueron sometidas a la reacción TdT con una mezcla de enzima TdT y nucleótidos EdUTP para la marcación de los extremos de ADN fragmentado, incubado 60 min a 37°C, seguido de un lavado con 3% BSA en PBS-T. En un último paso, las muestras fueron sometidas al cóctel de marcaje con fluoróforo que se une a los nucleótidos dUTP durante 30 min y finalmente lavadas con PBS.

Una vez terminado el protocolo TUNEL, se realizó inmunofluorescencia siguiendo el mismo protocolo detallado anteriormente, para la co-inmunodetección de otras proteínas en las preparaciones.

Terminada la inmunofluorescencia, las muestras fueron montadas con medio Fluoroshield con DAPI y se visualizaron en el microscopio confocal para la adquisición de imágenes.

MM5. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS PROTEICAS R9-GFP-H6

Las proteínas de fusión R9-GFP-H6 fueron producidas en el laboratorio del Dr. Villaverde (Instituto de Biología Molecular y Biotecnología, UAB).

La producción de proteínas se realizó en la línea celular Rosetta BL21 (DE3) de *E. coli* mediante inducción con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), que provocó la expresión bajo el promotor inducible T7 en el plásmido derivado de pET21B+. Las bacterias fueron crecidas en medio LB (750 ml) a 37°C en agitación hasta que alcanzó una densidad óptica de 0,5. En ese momento se indujo la expresión génica con 1 mM de IPTG y pasadas 3 h las células fueron retiradas del cultivo y se procedió a la purificación de la proteína.

Se realizó una primera centrifugación del cultivo a 10.000 r.p.m. durante 10 min a 4°C y el pellet de células resultante fue lavado con PBS, vuelto a centrifugar y resuspendido en buffer A (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, 5 mM β -mercaptoetanol). Seguidamente se realizó disrupción de las células por sonicación en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche, ref. 11873580001). La fracción celular soluble obtenida fue separada por centrifugación a 20.000 r.p.m. durante 15 min a 4°C y seguidamente sometida a filtración a través de filtro de 0,22 μ m.

Las proteínas R9-GFP-H6 fueron purificadas mediante cromatografía en columnas de Ni²⁺ en un purificador ÄKTATM (GE Healthcare) de cromatografía líquida de proteína rápida. Las fracciones positivas por la proteína en el buffer de elución (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 5 mM b-mercaptoetanol) fueron recogidas, sometidas a diálisis contra distintos buffers (tabla MM-04) y finalmente cuantificadas mediante el procedimiento de Bradford.

Tabla MM-04: Composición de los buffers usados en la diálisis de las nanopartículas R9-GFP-H6

Buffer	Composición
Tris-NaCl 500 nM	20 mM Tris HCl pH 7,5 + 500 mM NaCl
Tris-NaCl 1M	20 mM Tris HCl pH 7,5 + 1 M NaCl
Tris-Dextrosa	20 mM Tris HCl pH 7,5 + 5% dextrosa
HBS	20 mM HEPES + 150 mM NaCl, pH 5.8

MM6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Salvo que se indique lo contrario, todos los análisis estadísticos se realizaron aplicando un test ANOVA con el post-test de Bonferroni, de comparación múltiple, con un nivel de significancia de 0.05 (95% de intervalo de confianza) usando el programa Graphpad Prism©. Se especifica como una diferencia significativa (*) aquella que tiene una $p < 0.05$, como una diferencia muy significativa (**) aquella que tiene una $p < 0.001$ y como una diferencia altamente significativa (***) aquella que tiene una $p < 0.0001$.

RESULTADOS

Resultados - Parte I

ESTUDIOS *IN VITRO* DE LA ACCIÓN ANTI-ANGIOGÉNICA DEL FACTOR DERIVADO DE EPITELIO PIGMENTADO Y LA SOMATOSTATINA

Uno de los objetivos principales de esta tesis es el testado de nuevos sistemas de terapia génica no viral para la sobre-expresión de los factores SST y PEDF en modelos animales de RD y DMAE. Para ello, antes de iniciar los estudios *in vivo*, se han desarrollado modelos *in vitro* de proliferación, migración y formación tubular en cultivos de células endoteliales, con el objetivo de demostrar la actividad anti-angiogénica de estos dos factores.

R1.1- El PEDF y la SST inhiben la proliferación de células endoteliales inducida por VEGF

Para investigar el efecto inhibitorio del PEDF y la SST en la proliferación endotelial, se usaron células endoteliales vasculares procedentes de cordón umbilical humano (HUVECs). Estas células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos en presencia de VEGF (25 ng/ml) y con concentraciones crecientes de PEDF (0.1, 1 y 10 nM) o de SST (1, 10 y 100 μ M). La proliferación celular bajo los distintos tratamientos fue evaluada mediante el ensayo MTT.

Tal y como se esperaba, cuando las células fueron tratadas con VEGF (25 ng/ml), éste provocó un aumento altamente significativo en su ratio de proliferación, en un 43% (figuras R-01A y R-01B, barra negra). En cambio, cuando las células fueron co-tratadas con VEGF + PEDF, a la concentración de 10 nM PEDF (figura R-01A), la proliferación endotelial volvió a niveles basales, indicando una inhibición altamente significativa del efecto inductor del VEGF por parte del PEDF a la concentración más elevada que se testó. El resto de las concentraciones de PEDF testadas no alteraron significativamente la viabilidad celular respecto a la situación con VEGF. Por otro lado, cuando se realizó co-tratamiento con VEGF + SST (figura R-01B) también se observó una regresión a niveles basales de la proliferación endotelial, siendo esta diferencia altamente significativa en el tratamiento con 100 μ M SST. Concentraciones inferiores a 100 μ M SST no mostraron efecto alguno sobre la proliferación celular de las células HUVEC estimuladas con VEGF.

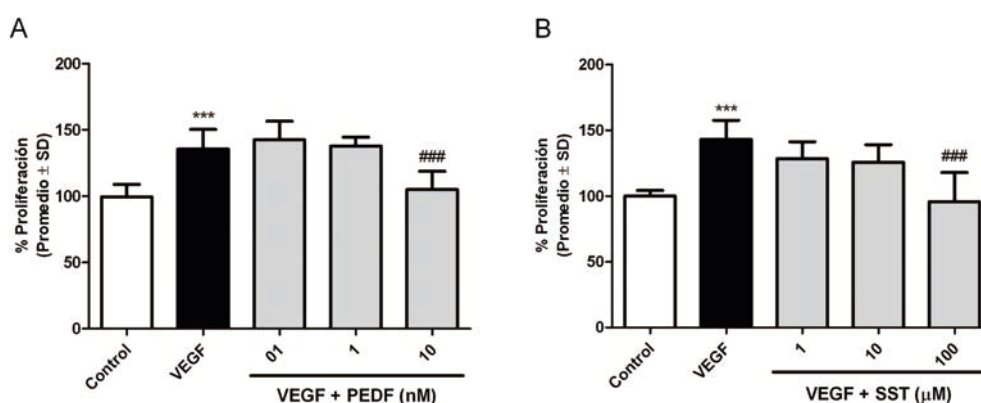


Figura R-01. El PEDF y la SST inhiben la proliferación de células HUVEC inducida por VEGF. Los cultivos de células HUVEC fueron tratados con 25ng/ml VEGF y concentraciones crecientes de PEDF o SST durante 48 h. La proliferación de las HUVEC fue medida por ensayo MTT. El tratamiento con VEGF indujo la proliferación de las células endoteliales, mientras que este efecto se vio inhibido por el PEDF (A) y la SST (B) dependiente de dosis, siendo las concentraciones más elevadas las más efectivas. Las cuantificaciones representan una media de tres experimentos independientes. *** $p < 0.001$, comparado con el control. ### $p < 0.001$, comparado con el tratamiento con VEGF.

R1.2- El PEDF y la SST inhiben la migración de células endoteliales inducida por VEGF

Tal y como se ha comentado en la introducción, uno de los principales acontecimientos durante la angiogénesis es la migración de células endoteliales para la formación de los nuevos vasos

sanguíneos. Esta migración, al igual que la proliferación de células endoteliales, está estimulada por el VEGF.

Para demostrar el efecto del PEDF y la SST sobre la migración endotelial previamente estimulada con VEGF, se realizó un ensayo de cierre de herida o “*wound healing*”, en el cual se elimina una franja de la monocapa de células en cultivo, se toman imágenes a tiempo 0 y se deja incubando con distintos tratamientos (VEGF o VEGF+PEDF/SST) durante 16 h, momento en el que se vuelven a tomar imágenes de las lesiones y se cuantifica el área cubierta por las células. Las concentraciones testadas corresponden a las que dieron diferencias significativas en el ensayo de proliferación.

Cuando los cultivos fueron tratados sólo con VEGF a 25 ng/ml, al cabo de 16 h las células habían migrado cubriendo casi por completo la zona de la herida (figura R-01A, paneles superiores). En cambio, cuando las células fueron tratadas con 10 nM PEDF o 100 μ M SST sobre los 25 ng/ml de VEGF, la herida no se cerró, manteniendo un área acelular sin cubrir (figura R-02A, paneles inferiores), y dando lugar a diferencias muy significativas tanto para PEDF, como para SST (figura R-02B).

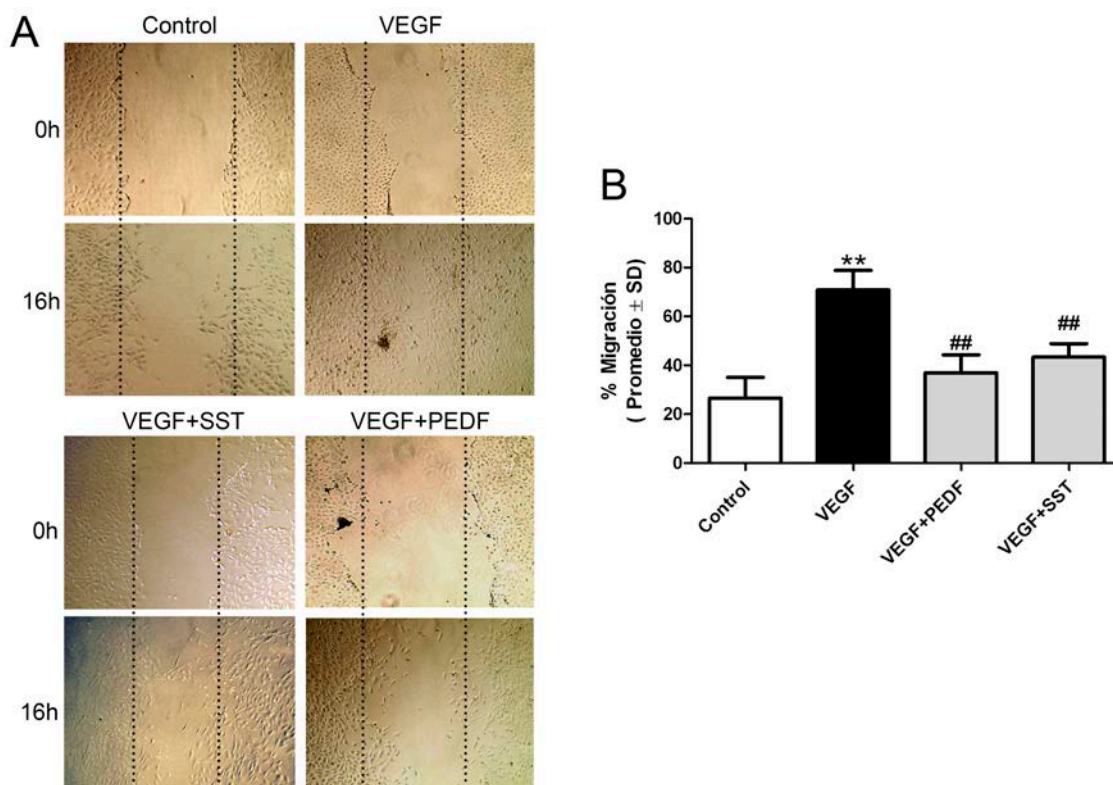


Figura R-02. El PEDF y la SST inhiben la migración de células HUVEC inducida por VEGF. (A) Se realizó una herida en una monocapa de HUVEC, y el cierre de la zona acelular fue monitorizado y fotografiado tras 16 h de incubación con varios tratamientos. Cuando se añadió VEGF al cultivo, las células HUVEC migraron más desde los márgenes de la herida comparado con el control, y la herida prácticamente se cerró a las 16 h. En cambio, un área muy significativa de la herida permaneció sin cubrir cuando las células se trataron con VEGF más 10 nM PEDF o 100 μ M SST. Se cuantificó el área ocupada a tiempo final, comparándolo con tiempo inicial (0%) de tres experimentos independientes y se representó la media de estos (B). ** $p < 0.01$ comparado con el control, ## $p < 0.01$ comparado con el tratamiento con VEGF solo.

R1.3- El PEDF y la SST inhiben la formación de estructuras tubulares *in vitro*

Para investigar el efecto inhibitorio del PEDF y la SST en la angiogénesis, se realizó un ensayo *in vitro* de formación de estructuras tubulares.

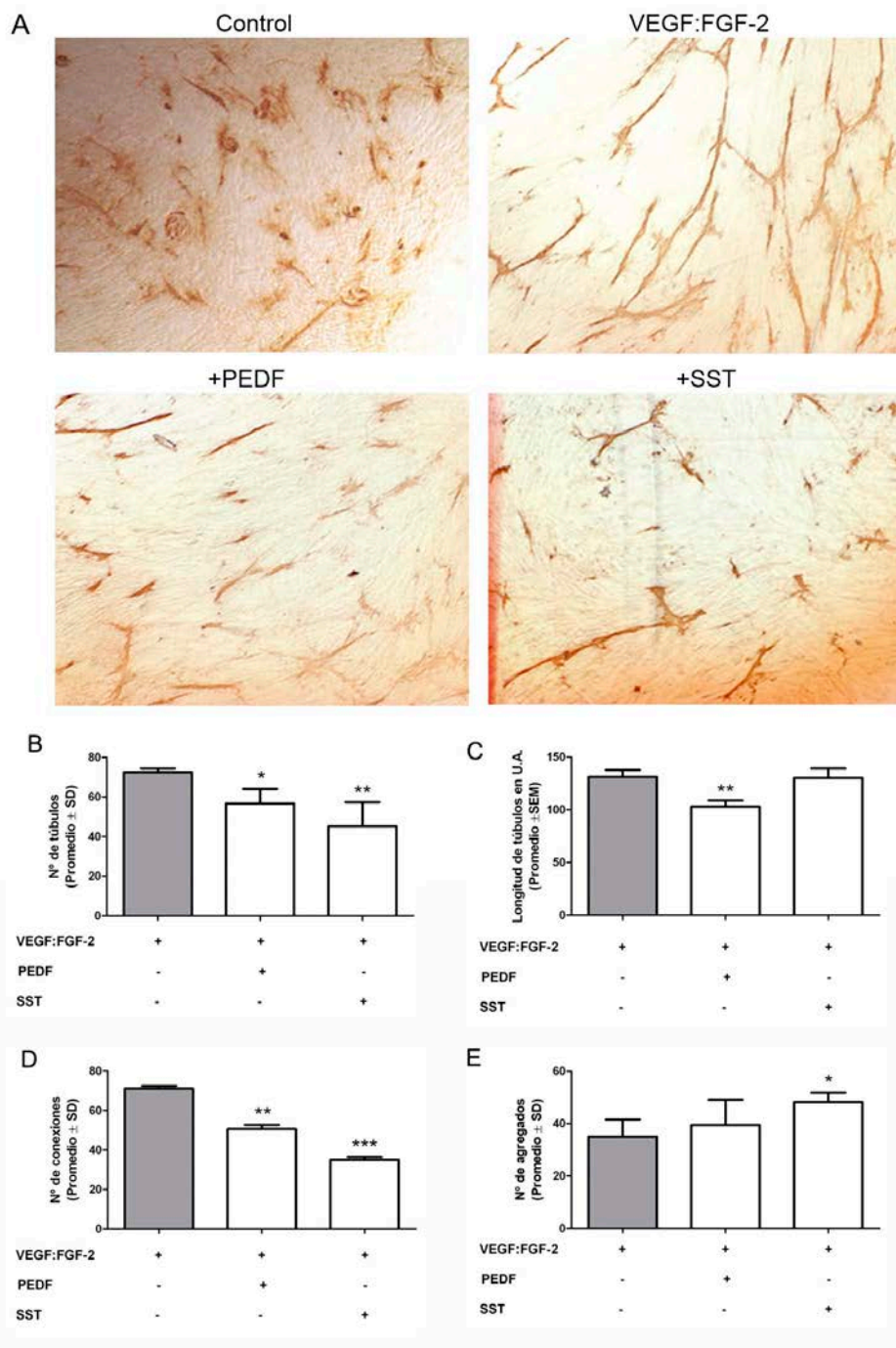


Figura R-03. El PEDF y la SST inhiben la formación de estructuras tubulares *in vitro*. Se realizó un co-cultivo de células endoteliales (HUVEC) y fibroblastos (BJ) seguido de un tratamiento con un cóctel de factores de crecimiento (10 ng/ml VEGF + 1 ng/ml FGF-2) en ausencia o presencia de 10 nM PEDF o 100 μ M SST. El cultivo fue monitorizado durante 6 días y finalmente fue sometido a inmunocitoquímica anti-vWf para teñir las células endoteliales (A). La formación de estructuras tubulares bajo los distintos tratamientos fue cuantificada mediante contabilización de número de túbulos (B), cuantificación de longitud de los túbulos (C), contabilización de número de conexiones entre túbulos (D) y contabilización de número de agregados (E), representándose una media de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al tratamiento con sólo el cóctel de factores de crecimiento.

La formación de túbulos parecidos a capilares es una característica de las células endoteliales cultivadas *in vitro* en co-cultivo con fibroblastos en presencia de factores de crecimiento. Las células endoteliales, en ausencia de factores de crecimiento (control) son incapaces de formar este tipo de estructuras, creciendo en forma de agregados, como se puede observar en la inmunocitoquímica del panel izquierdo superior (figura R-03A). En cambio, cuando se añadió el cóctel de factores de crecimiento VEGF y FGF-2 (10 y 1 ng/ml respectivamente), éstos favorecieron la organización de las células endoteliales en estructuras tubulares mimetizando los neovasos en un proceso de angiogénesis (figura R-03A, panel superior derecho). La evaluación de esta formación tubular se realizó mediante la medición de las longitudes de los túbulos así como la cuantificación de éstos, la cuantificación de las conexiones entre túbulos y la cuantificación de agregados, de tal manera que a más número de túbulos, más longitud y más inter-conexiones, sumado a un menor número de crecimiento endotelial en agregados, representó una mayor inducción de la neovascularización.

Cuando se añadió 10 nM de PEDF a los cultivos, el número de túbulos formados se redujo significativamente en un 22%, pasando de una media de 72 a una media de 56 túbulos, y en el tratamiento con SST la reducción fue muy significativa, hasta una media de 45 túbulos (figura R-03B). En cambio, cuando se analizó la longitud de las estructuras tubulares, mientras que el tratamiento con PEDF la redujo de forma muy significativa en un 25% (de una media 131 a una media de 103 U.A.), el tratamiento con SST no tuvo ningún efecto en esta variable (figura R-03C). Uno de los parámetros más afectados por el tratamiento con PEDF y SST fue el número de conexiones entre túbulos. El PEDF consiguió reducirlas en un 30% y la SST en un 50% (figura R-03D). Finalmente, en cuanto a la cuantificación de agregados presentes en los cultivos bajo los distintos tratamientos, no se vio un efecto significativo del tratamiento con PEDF y sí en el tratamiento con SST, donde se vieron aumentados en un 37% (figura R-03E).

Resultados - Parte II

GENERACIÓN DE MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE TERAPIA GÉNICA OCULAR CON PEDF Y SST

En las últimas décadas se han desarrollado varios modelos animales para el estudio de la angiogénesis ocular, ya sea fisiológica o patológica, siendo la rata y el ratón las especies más utilizadas por su bajo coste de mantenimiento y su facilidad de manipulación.

En esta parte del trabajo se pretende generar y caracterizar dos modelos animales, uno de retinopatía diabética no proliferativa en rata y otro de neovascularización coroidea en ratón, para determinar los parámetros alterados en ambos modelos que puedan ser usados *a posteriori* en la evaluación de la terapia génica no viral, así como la puesta a punto de la técnica de administración sub-retiniana.

R2.1- Modelo inducido de retinopatía diabética no proliferativa en rata

R2.1.1. Inducción de la diabetes con STZ

La diabetes fue inducida con STZ en ratas macho de la cepa Long Evans de 200 g, mediante una sola inyección intraperitoneal de 65 mg/kg. Las ratas asignadas como controles fueron inyectadas de la misma manera con el vehículo tampón citrato 0,1 M. Los animales, tanto del experimento de análisis *in vivo* como del experimento de análisis *post-mortem*, fueron monitorizados mediante control de peso y glucemia durante 3 meses, como indica la tabla R-01.

Tabla R-01. Monitorización de los animales control y STZ. Promedio de peso y niveles de glucemia de los dos grupos experimentales a lo largo de los 3 meses de seguimiento. Los valores corresponden a la media +/- SD.

Experi- mento	Grupo de tratamiento	n	Pre-tratamiento		1 mes		2 meses		3 meses	
			Peso (g)	Glucemia (mg/dl)	Peso (g)	Glucemia (mg/dl)	Peso (g)	Glucemia (mg/dl)	Peso (g)	Glucemia (mg/dl)
1	Control (vehículo)	10	282.2 ± 26.5	125.2 ± 27.2	347.7 ± 29.9	108.3 ± 13.0	385.7 ± 27.5	119.5 ± 27.1	424.8 ± 18.1	108.8 ± 15.3
	STZ (65 mg/kg)	10	303.5 ± 25.1	120.0 ± 29.4	267.9 ± 40.2	496.5 ± 38.7	254.2 ± 48.3	464.4 ± 101.5	275.1 ± 39.4	570.7 ± 60.2
2	Control (vehículo)	18	275.5 ± 21.5	121.8 ± 14.2	329.1 ± 20.0	115.3 ± 19.5	371.2 ± 29.3	121.5 ± 20.2	411.1 ± 20.0	115.8 ± 20.1
	STZ (65 mg/kg)	18	281.3 ± 22.9	118.1 ± 19.0	258.7 ± 32.2	514.0 ± 28.2	261.8 ± 38.0	524.4 ± 51.6	281.9 ± 31.2	565.5 ± 44.2

A partir del segundo día post-tratamiento y a lo largo de los tres meses de estudio, los niveles de glucosa en sangre en los animales STZ se situaron entre los 350 y los 600 mg/dL, mientras que las ratas control se mantuvieron normoglicémicas (figura R-04B).

Las ratas control fueron ganando peso de una forma normal a lo largo del estudio, mientras que las ratas STZ apenas engordaron durante el período observacional, llegando incluso a perder peso y mostrando, en algunos casos, síntomas de deshidratación debido a la poliuria (figura R-04A). Estos datos muestran que el tratamiento con STZ induce la diabetes tipo I en las ratas Long Evans de una forma similar al reportado en otros estudios publicados anteriormente (Robinson, *et al.*, 2012).

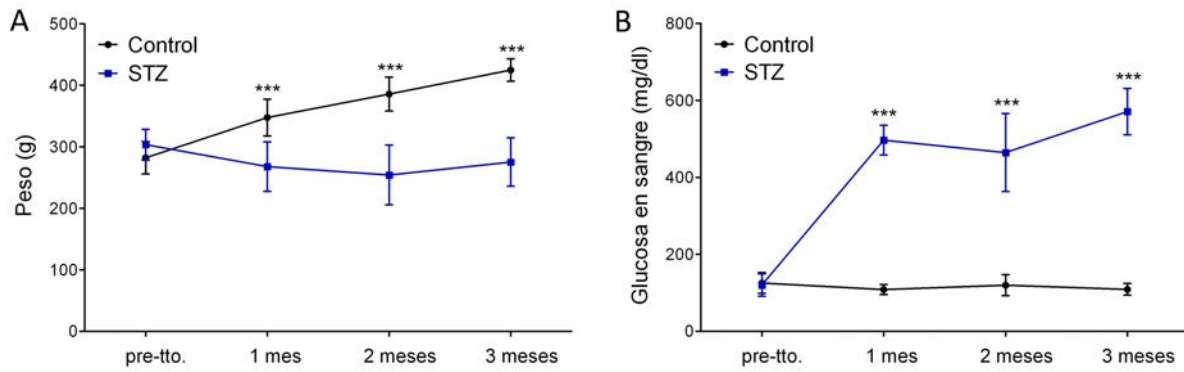


Figura R-04. Evolución del peso y la glucemia en ratas control y tratadas con STZ durante los 3 meses de estudio. Los animales de los dos grupos experimentales fueron pesados periódicamente y se analizó la glucemia mediante punción de la vena de la cola. (A) Las ratas control ganaron peso durante el experimento, con un promedio de crecimiento de aproximadamente 10 g/semana. En cambio, las ratas tratadas con STZ no mostraron un aumento de peso significativo durante los 3 meses de estudio. *** $p < 0.001$. (B) Todos los animales tenían niveles similares de glucosa en sangre antes del tratamiento con STZ o vehículo. La ratas en el grupo control mantuvieron sus niveles de glucosa en sangre estables a lo largo del estudio, mientras que en los animales tratados con STZ estos niveles aumentaron más de 4 veces hasta más de 400 mg/dl a partir del día 2 post-inducción. *** $p < 0.001$.

R2.1.2. Evaluación *in vivo* de la función visual

Para determinar la actividad neurofisiológica de la retina de ratas STZ se realizaron electroretinogramas a 1, 2 y 3 meses post-inducción de la diabetes, comparando las lecturas de ratas STZ con las de ratas control.

La técnica de electroretinografía (ERG) permite el registro de la actividad eléctrica de la retina en respuesta a un estímulo luminoso mediante la colocación de un electrodo en la córnea del animal. Cuando es estimulada con luz, la retina experimenta cambios en los potenciales como consecuencia de la actividad eléctrica de las neuronas, resultando en una respuesta compleja con dos componentes primarios: la onda *a* y la onda *b* (figura R-05A). Un análisis básico de la respuesta electroretinográfica de una retina consiste en la medida de las amplitudes de las ondas *a* y *b*, así como el tiempo que tarda en aparecer la onda *a* (tiempo implícito). La primera onda en aparecer, a bajas intensidades de estímulo luminoso, es la onda *b*, y a medida que se incrementa la intensidad de flash de luz, va apareciendo la onda *a* (figura R-05B).

En la transición entre las ondas *a* y *b* aparecen oscilaciones que corresponden a los potenciales oscilatorios (OPs, del inglés) que pueden también registrarse (figura R-05C). Las ondas *a* y *b* reflejan la actividad de los fotorreceptores y las células bipolares, mientras que las OPs simbolizan la actividad de las células amacrinas principalmente.

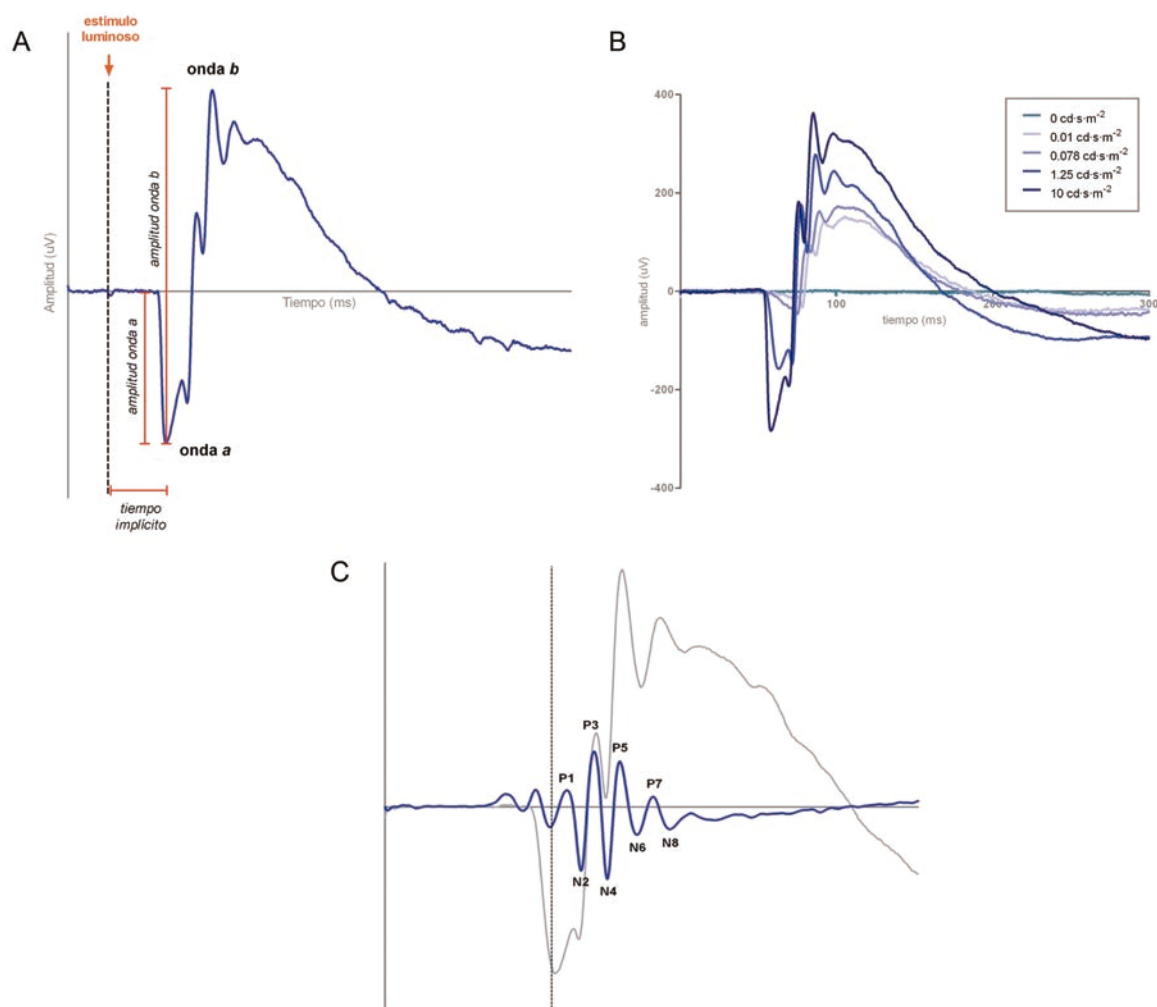


Figura R-05. Ondas electroretinográficas representativas de una rata control adaptada a la oscuridad, en condiciones escotópicas. (A) Ejemplo de análisis de una respuesta electroretinográfica, donde se aísla y cuantifica la amplitud y tiempo implícito de las ondas a y b. (B) Ejemplo de lecturas electroretinográficas obtenidas en condiciones escotópicas a distintas intensidades de flash de luz, aumentando progresivamente desde 0 hasta $10 \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$. (C) Ejemplo de análisis de los potenciales oscilatorios extraídos a partir de la gráfica de respuesta electroretinográfica mediante un filtro de paso de banda, donde también se pueden extraer datos de amplitud y tiempo implícito.

R2.1.2.1. Análisis del ERG a 1 mes post-inducción

La respuesta electroretinográfica de los animales de estudio fue registrada siguiendo el protocolo descrito por Amung, *et al.* (Amung, *et al.*, 2013), con algunas modificaciones. Se realizaron varias lecturas de ambos ojos de cada animal a 4 intensidades de flash luz crecientes (0.01 , 0.078 , 1.25 y $10 \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$) para aislar las respuesta proveniente principalmente de bastones (bajas intensidades) y respuesta mixta de conos y bastones (intensidades altas). Se midieron las amplitudes de las ondas a y b, así como los tiempos implícitos en las distintas intensidades (figura R-06). Los OPs fueron aislados digitalmente mediante un filtro de paso de banda de 75 - 500 Hz y se midieron amplitudes y tiempos implícitos de cada uno de ellos a todas las intensidades, así como el sumatorio total de amplitudes (figura R-07).

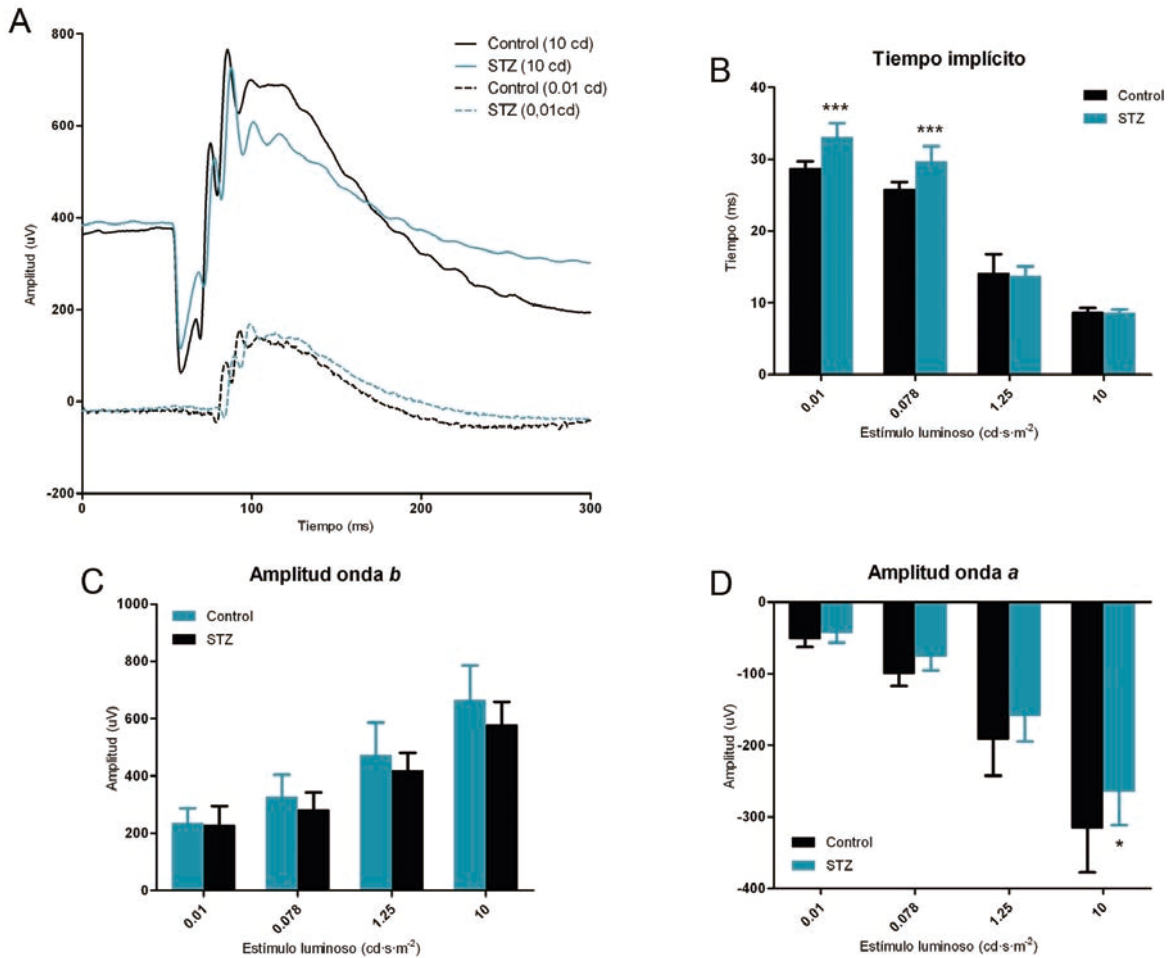
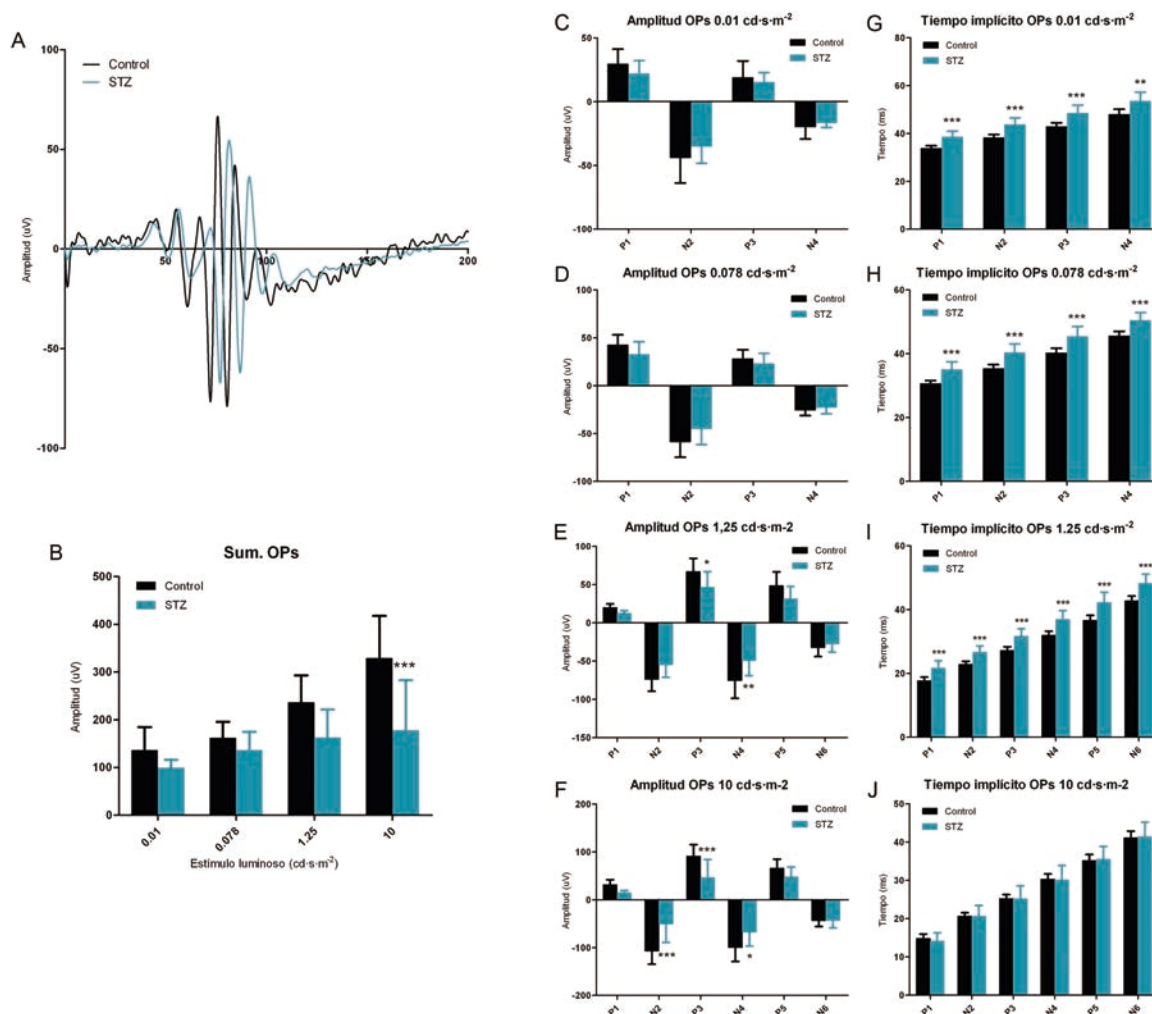


Figura R-06. Comparativa de la respuesta electroretinográfica entre animales control y STZ, 1 mes post-inducción de la diabetes. (A) Gráfica representativa de electroretinograma a 10 cd-s-m⁻² de un animal del grupo control y un animal del grupo STZ. (B) Promedio \pm SD de tiempos implícitos a distintas intensidades de los animales de grupos control y STZ. (C) Promedios \pm SD de amplitudes de onda *b* a distintas intensidades de los animales de grupos control y STZ. (D) Promedios \pm SD de amplitudes de onda *a* a distintas intensidades de controles y STZ. * $p > 0.05$ y *** $p < 0.001$, comparado con el grupo control a la misma intensidad.

Un mes post-inducción de la diabetes, aunque las lecturas electroretinográficas de los animales control y los animales STZ aparentemente parecían similares (figura R-06A) los segundos mostraron un aumento altamente significativo en el tiempo implícito a bajas intensidades de flash de luz, comparado con los animales control (figura R-06B). No se observó ninguna diferencia en cuanto a las amplitudes de la onda *b* en ninguna intensidad (figura R-06C), sólo a 10 cd-s-m⁻² apareció una leve disminución significativa en el promedio de amplitudes de la onda *a* en el grupo STZ (figura R-06D). Los potenciales oscilatorios a 1 mes post-inducción reflejaron un claro aumento altamente significativo en el tiempo implícito en animales STZ comparado con controles (figuras R-07G-J) y sólo disminución en su amplitud a la máxima intensidad de luz, altamente significativa (figuras R-07B-F) dada por una disminución en los potenciales 2, 3 y 4.



R2.1.2.2. Análisis del ERG a 2 meses post-inducción

Los registros de ERG a dos meses continuaron mostrando un altamente aumento significativo en el tiempo implícito de la respuesta en animales STZ comparado con controles a bajas intensidades de flash de luz, muy parecido a los registros a 1 mes post-inducción (figura R-08-B). En este punto también se empezó a apreciar una disminución significativa en el promedio de amplitudes de la onda *b* en animales STZ comparado con controles a altas intensidades de flash de luz (figura R-08C), aunque no se apreciaron diferencias en la amplitud de la onda *a* (figura R-08D).

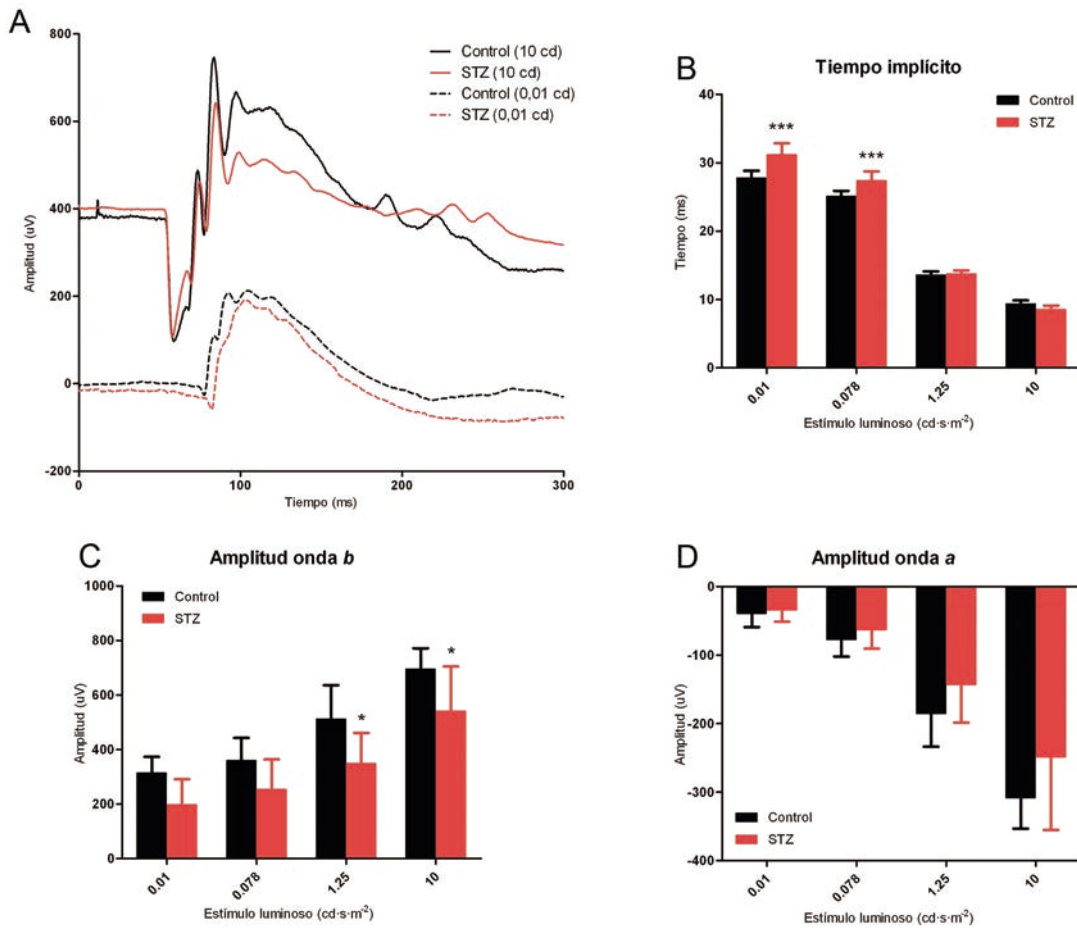


Figura R-08. Comparativa de la respuesta electroretinográfica entre animales control y STZ, 2 meses post-inducción de la diabetes. (A) Gráfica representativa de electroretinograma a 0.01 y 10 cd·s·m⁻² de un animal control y un animal diabético. (B) Promedio ± SD de tiempos implícitos a distintas intensidades de los animales de grupos control y STZ. (C) Promedios ± SD de amplitudes de onda b a distintas intensidades de los animales de grupos control y STZ. (D) Promedios ± SD de amplitudes de onda a, a distintas intensidades de controles y diabéticos. *P<0.05 y ***p<0.001, comparado con el grupo control a la misma intensidad.

El análisis de los OPs siguió mostrando un aumento en el tiempo implícito, más significativo a bajas intensidades (figuras R-09G-H). Sin embargo, en este punto se observó una disminución significativa en las amplitudes de los OPs a baja intensidad de flash de luz, que desapareció al ir aumentando ésta, al contrario de lo que se había observado a 1 mes post-inducción (figuras R-09B-F).

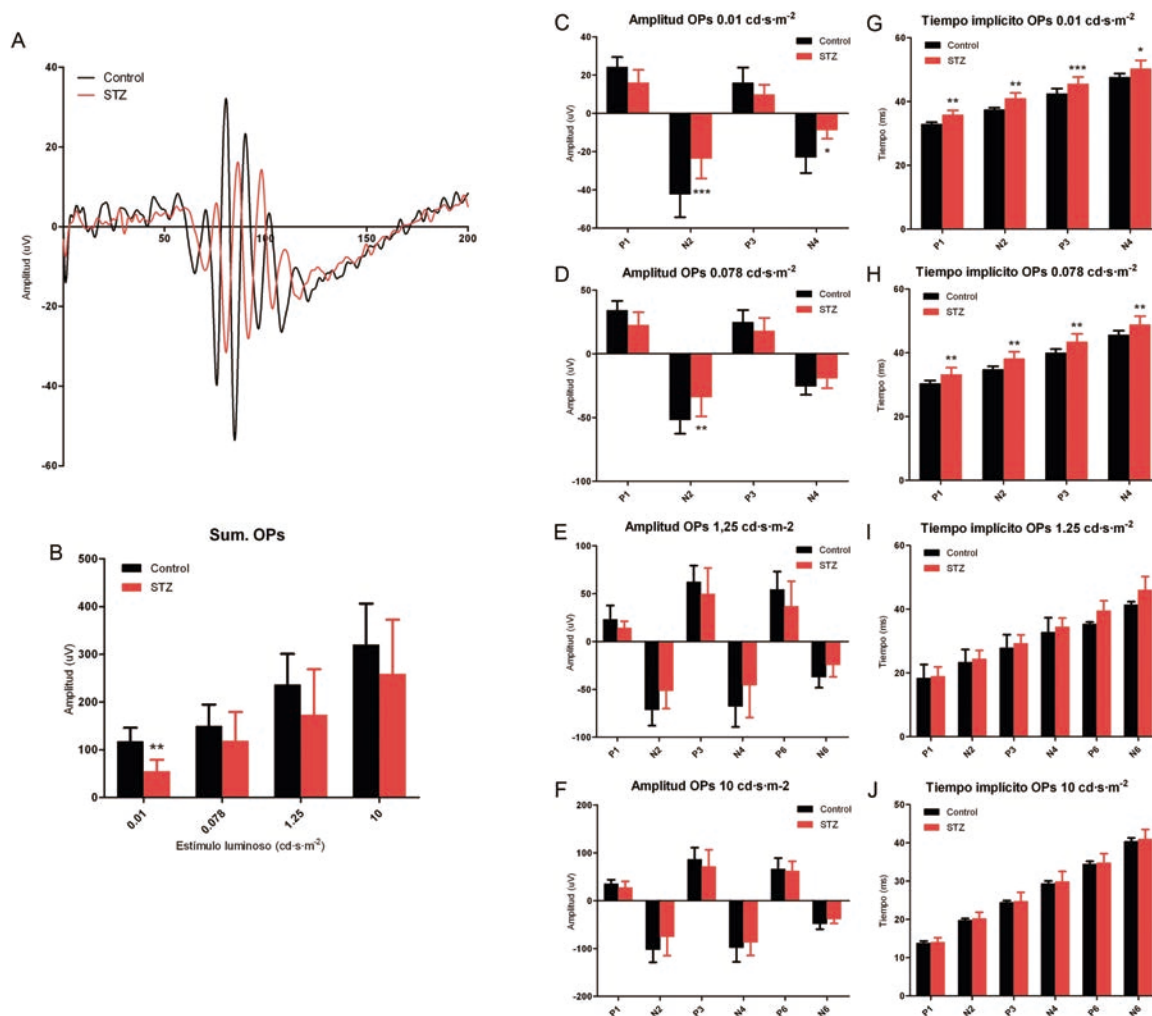


Figura R-09. Comparativa de los potenciales oscilatorios (OPs) de animales control y STZ, 2 meses post-inducción de la diabetes. (A) Gráfica representativa de la extracción de los OPs a 10 cd-s-m⁻² de un animal del grupo control y un animal del grupo STZ. (B) Comparativa de promedio \pm SD del sumatorio de las amplitudes de todos los OPs a distintas intensidades de flash de luz, entre animales control y STZ. (C-F) Comparativa de los promedios \pm SD de las amplitudes de los OPs por separado, a 0.01, 0.078, 1.25 y 10 cd-s-m⁻² respectivamente, entre animales control y STZ. (G-J) Comparativa de los promedios \pm SD de tiempo implícito de los distintos potenciales oscilatorios a 0.01, 0.078, 1.25 y 10 cd-s-m⁻² respectivamente, entre animales control y STZ. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparado con el control a la misma intensidad.

R2.1.2.3. Análisis del ERG a 3 meses post-inducción

A 3 meses de la inducción de la diabetes, el análisis de los ERGs mostró una afectación más pronunciada en los animales STZ. El tiempo implícito seguía mostrando un aumento significativo a bajas intensidades (figura R-10B) comparado con los controles y la reducción en las amplitudes de las ondas *b* y *a* (figuras R10C y D respectivamente) se vio más pronunciada. La onda *b* experimentó una reducción muy significativa ya desde bajas intensidades, mientras que la onda *a* sólo experimentó una reducción significativa a la intensidad más alta.

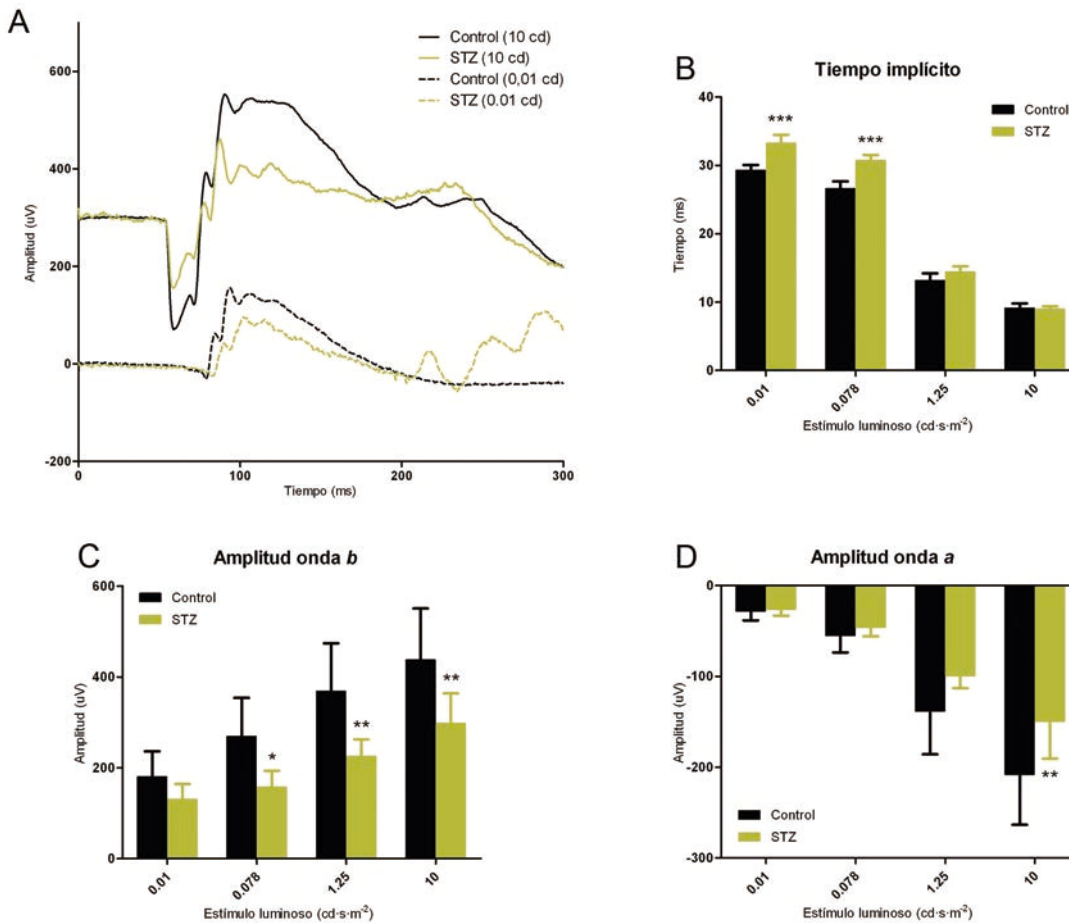
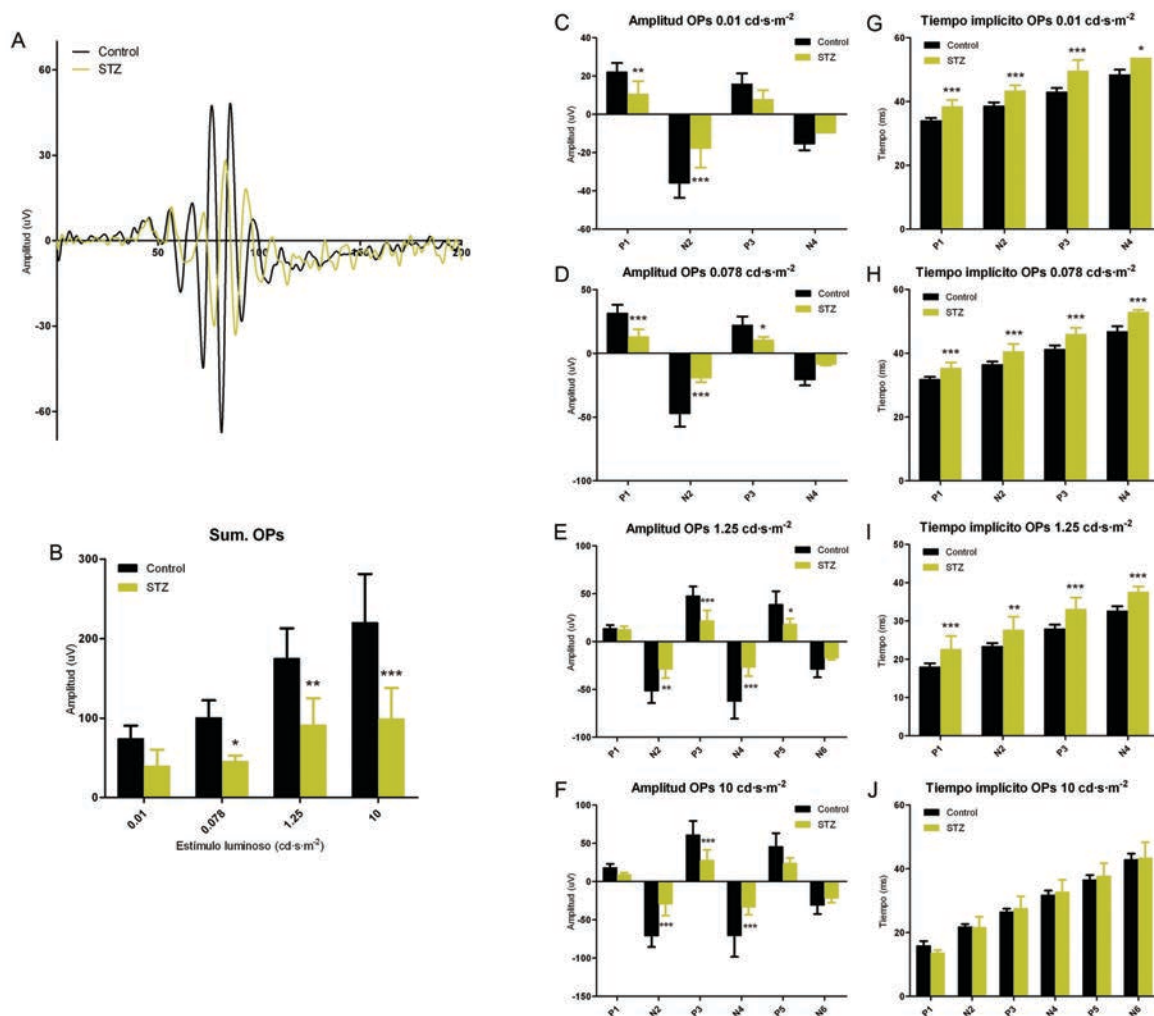


Figura R-10. Comparativa de la respuesta electroretinográfica entre animales control y STZ, 3 meses post-inducción de la diabetes. (A) Gráfica representativa de electroretinograma a 0.01 y 10 cd·s·m⁻² de un animal control y un animal diabético. (B) Promedio ± SD de tiempos implícitos a distintas intensidades de los animales de grupos control y STZ. (C) Promedios ± SD de amplitudes de onda b a distintas intensidades de los animales de grupos control y STZ. (D) Promedios ± SD de amplitudes de onda a, a distintas intensidades de controles y STZ. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparado con el control, a la misma intensidad.

La alteración en los OPs también se hizo más patente. La amplitud total de éstos se vio reducida en animales STZ en casi todas las intensidades (figura R-11B), viéndose reflejado en el análisis individual de cada OP, donde se aprecia cómo los OPs más afectados son el 1-2 a bajas intensidades, o 2-3 a altas intensidades (figuras R-11C-F). El tiempo implícito de éstos también se vio más alterado en animales STZ, siendo significativamente más elevado en todos ellos en casi todas las intensidades (figuras R-11G-J), comparado con los mismos OPs de los animales control.



R2.1.2.4. Progresión cronológica de la respuesta ERG de ratas STZ

El análisis cronológico del tiempo implícito de las respuestas de los animales muestra un aumento en el grupo STZ a bajas intensidades de flash de luz y se mantiene así durante todo el estudio, revelando una respuesta significativamente más lenta de la retina STZ es respuesta al estímulo luminoso (figura R-12A). En cambio, este parámetro no se ve alterado cuando los animales son estimulados con flash de luz brillante (10 $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$) (figura R-12B).

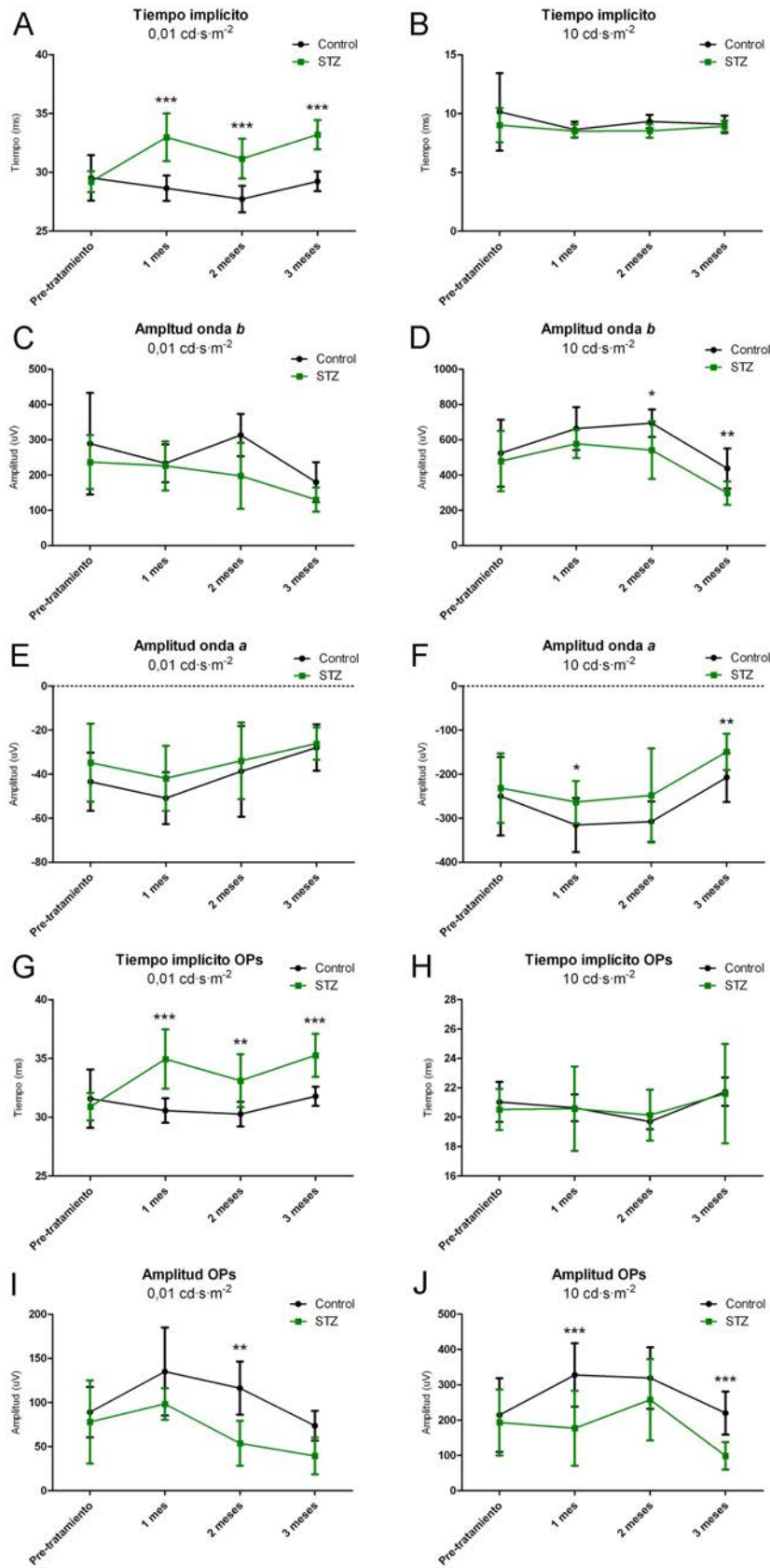


Figura R-12. Análisis cronológico comparativo de la respuesta ERG de ratas STZ y controles. Gráficas comparativas de los distintos parámetros analizados en electroretinogramas de ratas control y STZ pre-tratamiento y a 1, 2 y 3 meses post-inducción de la diabetes. (A,B) Comparación de tiempos implícitos, (C,D) comparación de amplitudes de onda b, (E,F) comparación de amplitudes de onda a, (G,H) comparación de tiempos implícitos de OPs y (I,J) comparación de amplitudes de OPs, a baja o alta intensidad de estímulo luminoso respectivamente. Los puntos representan el promedio \pm SD. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p>0,001$ comparado con el control, en el mismo momento de análisis.

El promedio de amplitudes de la onda *b* sólo se ve significativamente reducido en animales STZ a partir del segundo mes de diabetes, sólo cuando la retina es estimulada con un flash de luz a alta intensidad y esta reducción se hace más evidente a los tres meses (figura R-12D,C).

En cuanto a la onda *a*, este parámetro evoluciona de una manera menos constante a lo largo de los tres meses de estudio, viéndose sólo una clara reducción en su amplitud a los 3 meses, a altas intensidades (figuras R12-E,F)

El análisis cronológico de la evolución de los OPs muestra que ya desde el primer mes de diabetes los animales STZ sufren un aumento en el tiempo implícito de todos ellos a baja intensidad pero no a alta intensidad, que se mantiene a lo largo del estudio (figuras R-12G,H). En cambio, el análisis de las amplitudes muestra un comportamiento más inestable durante los dos primeros meses, apareciendo amplitudes significativamente más bajas en animales STZ en sólo algunos OPs y sólo algunas intensidades de flash de luz, pero finalmente a 3 meses post-inducción la reducción de las amplitudes se generaliza, afectando a prácticamente todos los OPs y en todas las intensidades (figura R-12I,J).

Tomado en conjunto estos datos electroretinográficos se puede concluir que, aunque las alteraciones a nivel de función visual ya empiezan a apreciarse 1 mes post-inducción, no es hasta los 3 meses cuando estas alteraciones se hacen más evidentes y más significativas en todos los parámetros evaluados. Por tanto este sería el momento ideal de evaluación de la terapia génica.

R2.1.3. Análisis angiográfico

Los animales de los dos grupos experimentales fueron sometidos a angiografía fluoresceínica para la evaluación de aparición de anomalías vasculares a 1, 2 y 3 meses post-inducción de la diabetes. Se tomaron fotografías de fondo de ojo de animales STZ y controles (figura R-13) a 5 min post-administración de la fluoresceína, bajo filtro de fluorescencia verde. En ningún caso se detectaron puntos de exudación, avascularización o angiogénesis cuantificables. Los animales STZ aparentemente exhibieron una red vascular normal, similar a los animales control en todos los puntos de análisis. Sólo en algunos animales STZ a 3 meses post-inducción se apreció una zona levemente más fluorescente en retina central, pero no se pudo cuantificar y, por tanto, no se tomó como una alteración a tener en cuenta.

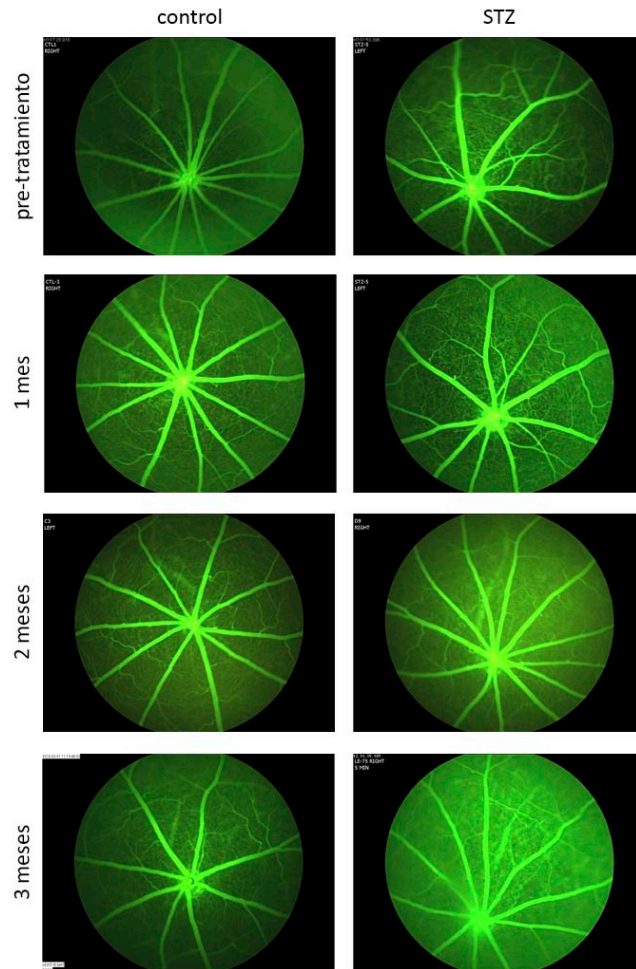


Figura R-13. Análisis angiográfico de animales control y tratados con STZ. Angiografías fluoresceínicas mediante inyección intraperitoneal de fluoresceína y visualización de la red vascular de la retina en el fondo del ojo, pre-tratamiento y a 1, 2 y 3 meses post-inducción de la diabetes. Se tomaron fotografías de fondo de ojo 5 min post-administración de 10 μ l/g peso corporal de fluoresceína al 10% para evaluar la aparición de puntos de exudación o avascularización.

Por tanto, aunque la técnica de angiografía fluoresceínica es muy útil a nivel experimental por la posibilidad que ofrece de realizar un análisis *in vivo* no invasivo del estado de la red vascular retiniana, en este modelo en particular no nos sirve ya que no es lo suficientemente resolutive como para mostrar las alteraciones microangiopáticas que sufren los animales en estas fases tan tempranas de la patología.

R2.1.4. Evaluación *post-mortem* de los eventos patológicos en la retina

Los animales del segundo bloque experimental (18 ratas inyectadas con 65 mg/kg STZ y 18 ratas inyectadas con el vehículo) fueron eutanasiados a 1, 2 y 3 meses post-inducción para realizar caracterización *post-mortem* de alteraciones a nivel morfológico, histológico y de expresión génica en retina.

R2.1.4.1. Análisis morfológico

Para evaluar los cambios morfológicos en la retina de ratas STZ se cuantificó el grosor de las distintas capas de la retina en criosecciones teñidas con hematoxilina-eosina de 5 animales por grupo, en 3 campos por cada ojo, a 1, 2 y 3 meses post-inducción de la diabetes (figura R-14). Las retinas de las ratas STZ aparecieron significativamente más delgadas ya a 1 mes post-inducción, comparado con retinas de ratas control. Este adelgazamiento se situó sólo en las capas nuclear interna y plexiforme interna, donde se encuentran las células bipolares, amacrinas y horizontales principalmente. La reducción en el grosor de estas capas se mantuvo más o menos estable durante los 3 meses de estudio, detectándose en los análisis a 2 y 3 meses post-inducción. El grosor del resto de capas de la retina se mantuvo sin cambios, comparado con las retinas control.

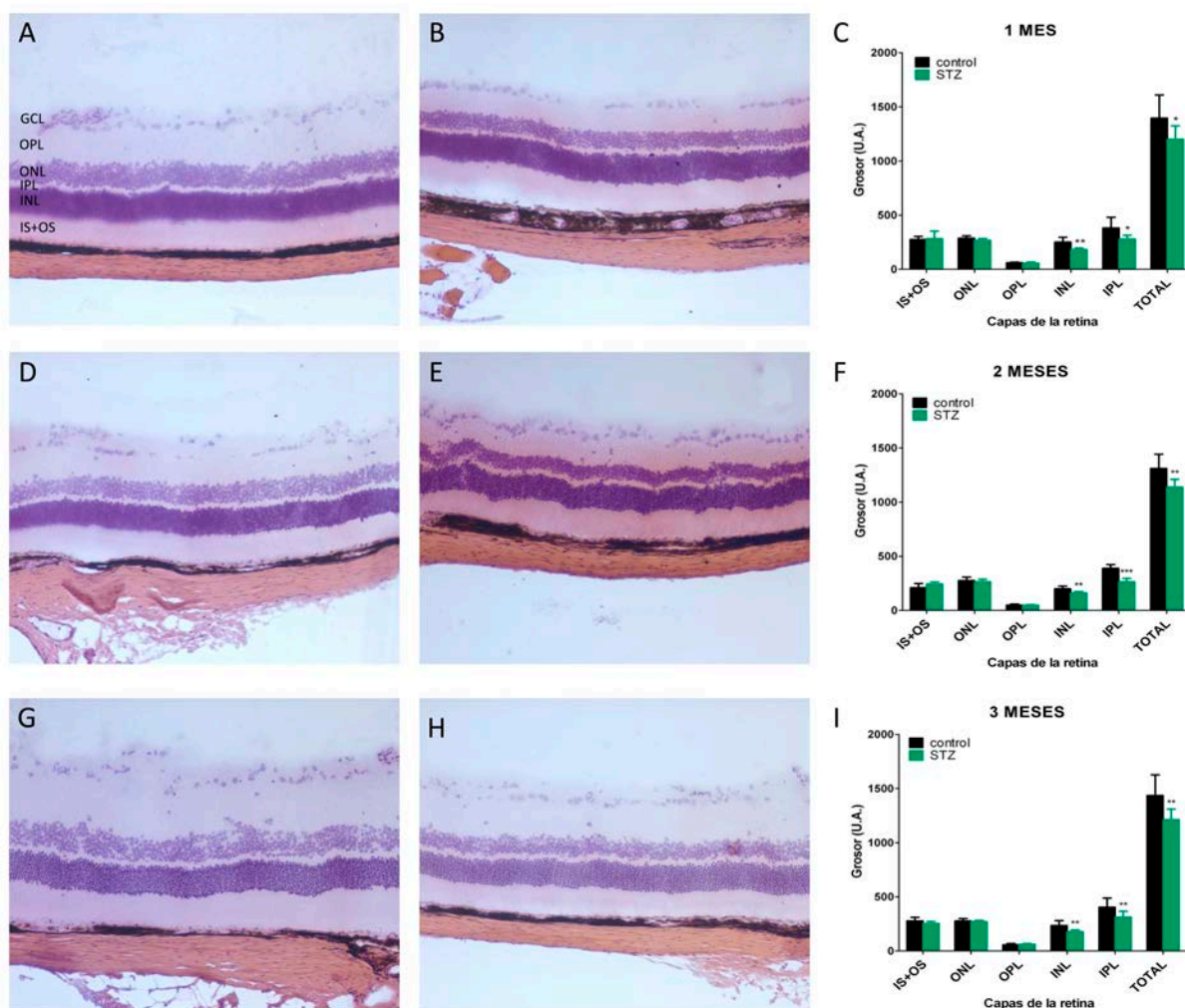


Figura R-14. Efectos del tratamiento con STZ en la histología de la retina de rata. (A,D,G) Imágenes representativas de retinas de animales control, y (B,E,H) retinas de animales tratados con STZ a 1, 2 y 3 meses post-inducción de la diabetes respectivamente. (C,F,I) Gráficos comparativos de las medias de grosor de las distintas capas de la retina a 1, 2 y 3 meses post-inducción respectivamente. Las barras representan la media \pm SD de la cuantificación de 6 animales por grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comprado con ratas control del mismo tiempo de tratamiento. En A se indican los acrónimos para cada uno de las secciones de la retina analizadas: IS+OS: segmentos internos y externos de los fotorreceptores, ONL: capa nuclear externa, OPL: capa plexiforme externa, INL: capa nuclear interna, IPL: capa plexiforme interna, GCL: capa de células ganglionares.

R2.1.4.2. Análisis de la expresión génica

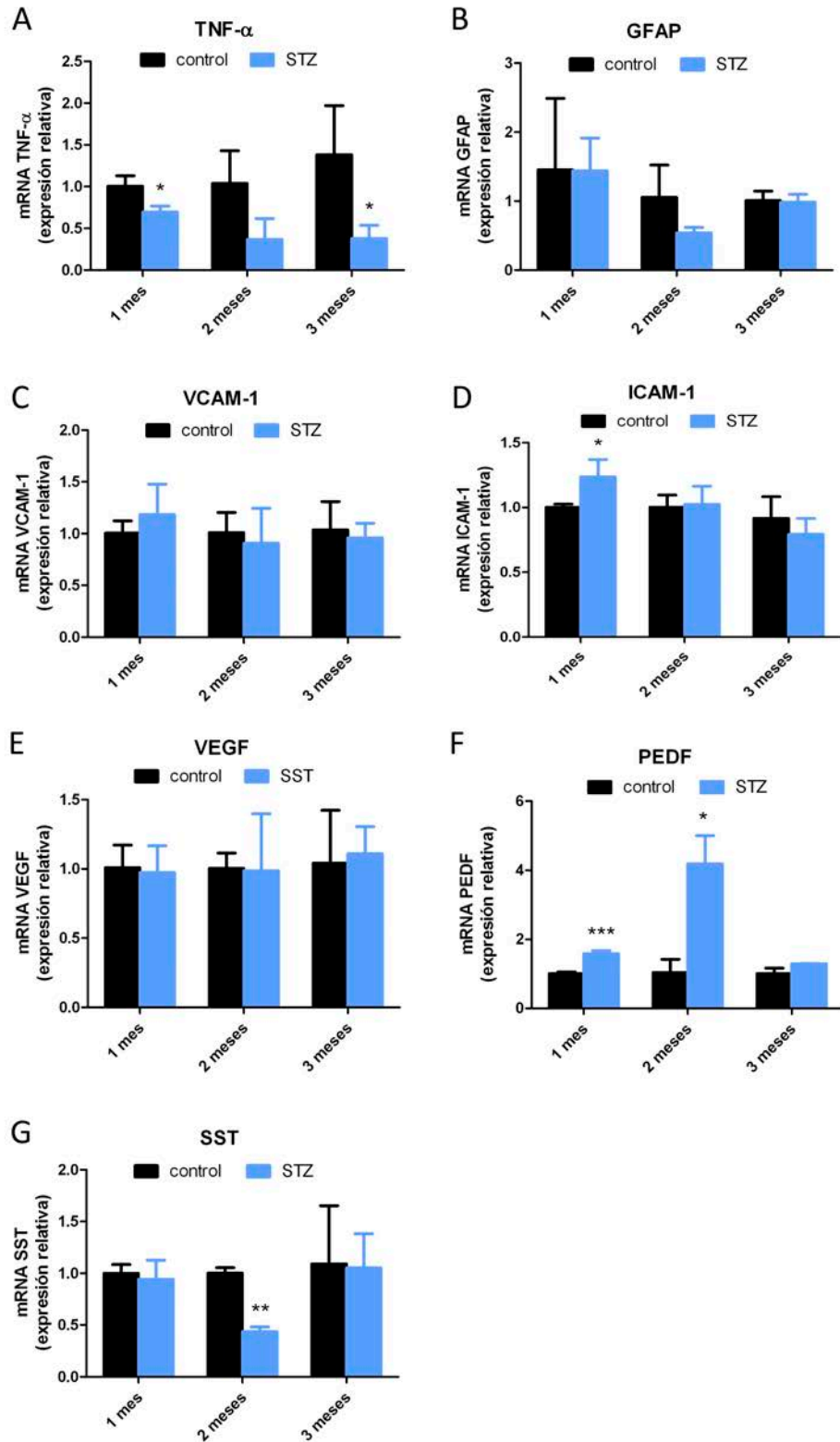


Figura R-15 Efectos del tratamiento con STZ en la expresión génica en retina de factores inflamatorios y pro-angiogénicos. Se extrajo RNA mensajero de retinas de ratas de los grupos control y STZ a 1, 2 y 3 meses post-inducción de la diabetes. Se analizaron y compararon los niveles de expresión de (A) TNF- α , (B) GFAP, (C) VCAM-1, (D) ICAM-1, (E) VEGF, (F) PEDF y (G) SST. Los niveles de expresión de los distintos genes fueron normalizados con el gen GAPDH, de expresión constitutiva. Los datos representan la media \pm SD de 6 ratas por grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comprado con ratas control del mismo tiempo de tratamiento.

A fin de determinar los cambios en la expresión génica de genes pro-inflamatorios y relacionados con la angiogénesis en retinas STZ se realizó PCR cuantitativa de extractos de RNA de retinas de ratas STZ y controles a 1, 2 y 3 meses post-inducción de la diabetes.

El factor de necrosis tumoral (TNF- α), una citoquina inflamatoria relacionada con la apoptosis, el reclutamiento leucocitario y la expresión de moléculas de adhesión, al contrario de lo esperado, vio disminuida su expresión en retinas STZ comparado con retinas control a partir de 1 mes post-inducción (figura R-15A). No se observó una alteración significativa en ningún punto de análisis en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), relacionada con la activación de la glía de la retina en respuesta a un estrés metabólico (figura R-15B).

También se analizó la expresión de la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) (figuras R-15C y D), dos mediadores de la adhesión de células inmunitarias a los vasos sanguíneos, relacionadas con la leucostasis, la oclusión capilar, la permeabilidad vascular y la pérdida de células endoteliales. Sólo en el caso de ICAM-1 se observó un incremento significativo del orden de 0.5 veces en la expresión a un mes post-inducción en retinas de ratas STZ comparado con ratas control, aunque la expresión se vio normalizada a 2 y 3 meses. En cambio, no se observó ninguna alteración en la expresión de VCAM-1.

Se analizó la expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGFa), un factor clave en la promoción de la neovascularización ocular y la inflamación, y en este caso, al contrario de lo esperado, tampoco se observaron alteraciones significativas en su expresión a 1, 2 o 3 meses post-inducción de la diabetes comparando retinas STZ con retinas control (figura R-15E).

Finalmente se analizaron los niveles de expresión de los dos factores anti-angiogénicos seleccionados como posibles agentes terapéuticos en este trabajo, el factor derivado de epitelio pigmentado (PEDF) y la somatostatina (SST). En el primer caso (figura R-15F) se observó cómo las retinas de ratas STZ mostraban una sobre-expresión de PEDF creciente a 1 y 2 meses post-inducción, comparado con retinas control, aunque esta sobre-expresión se vio normalizada a los 3 meses. En cambio, la expresión de SST se vio levemente disminuida en retinas STZ a 2 meses post-inducción (figura R-15G), alteración que no se observó ni a 1 ni a 3 meses.

R2.1.4.3. Análisis inmunohistoquímico

Finalmente, se determinó la presencia de células apoptóticas mediante tinción TUNEL y se realizó simultáneamente inmunotinción contra GFAP para determinar la activación glial en criosecciones de retinas control y retinas STZ a 1, 2 y 3 meses post-inducción (figura R-16). No se observaron células claramente positivas por TUNEL en ningún momento post-inducción de la diabetes, sólo una leve tinción difusa en algunas criosecciones en ratas 2 y 3 meses post-tratamiento. En cambio, la

inmuntinción contra GFAP reveló un incremento progresivo en la expresión de esta proteína en las células gliales de ojos de ratas tratadas con STZ comparado con ojos de ratas control, observándose una máxima expresión de GFAP a 2 meses post-inducción.

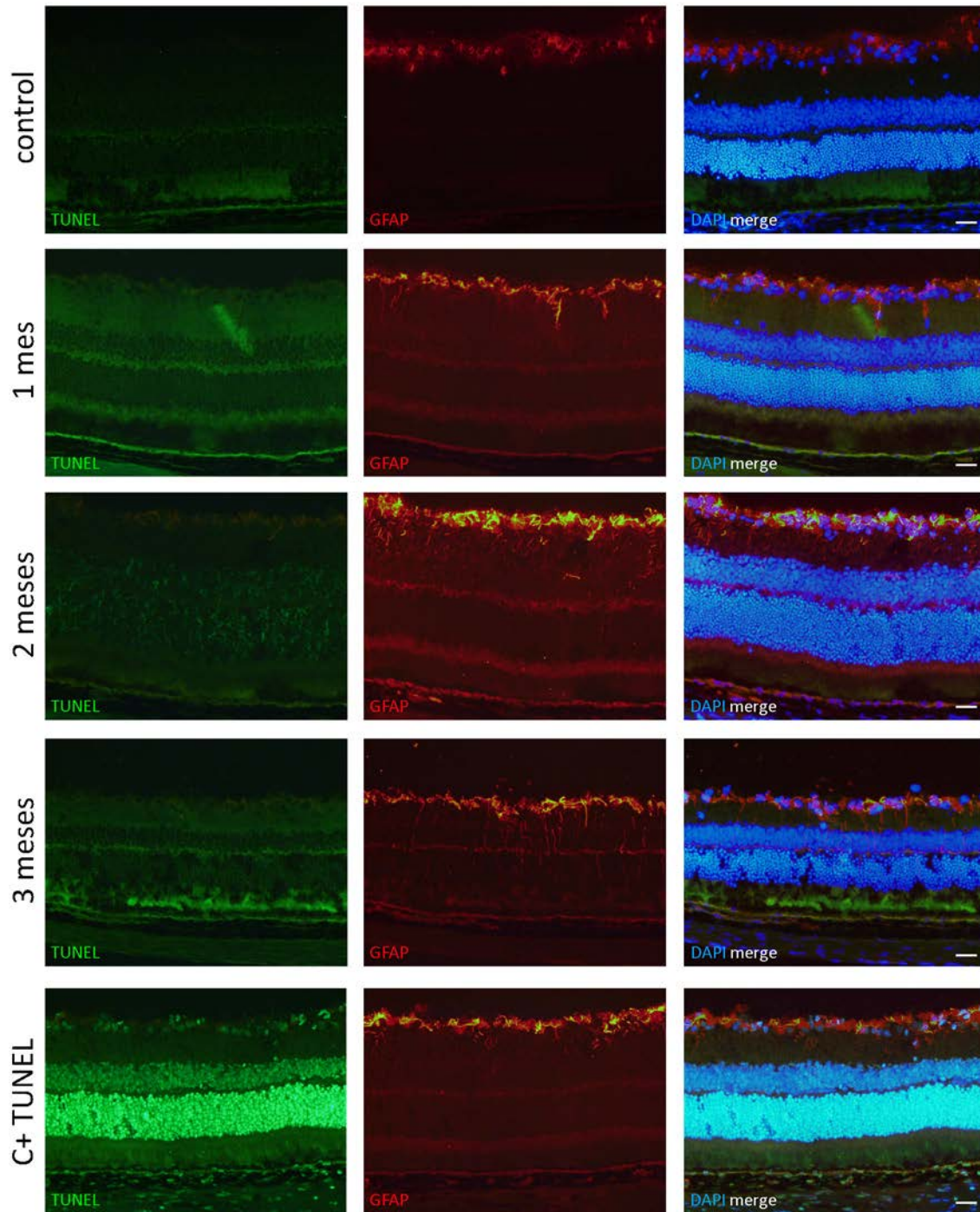


Figura R-16 Efecto del tratamiento con STZ en la apoptosis y la activación glial de retina de rata. Se realizó ensayo TUNEL (fluorescencia verde) para detectar la presencia de células apoptóticas, y inmuntinción contra GFAP (fluorescencia roja) para detectar la activación glial en criosecciones de retinas de ratas control o tratadas con STZ a 1, 2 y 3 meses post-tratamiento. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. Barra de escala = 20 μ m.

En conjunto, los datos analizados de los distintos parámetros estudiados en este modelo de retinopatía diabética nos revelan que estos animales sufren una cierta alteración ocular a causa de la diabetes inducida, principalmente en la función electroretinográfica. No se ha detectado alteración alguna en el análisis angiográfico, probablemente debido al tipo de alteraciones vasculares, que no suelen progresar a alteraciones macroscópicas en tan poco tiempo. Las alteraciones morfológicas de las retinas STZ, con el adelgazamiento de la capa nuclear interna, concuerdan con los resultados electroretinográficos donde se muestra una clara alteración en los OPs, que provienen de la actividad de células amacrinas y bipolares. Sin embargo, al contrario de lo esperado, no se ha detectado apoptosis en esta capa de la retina en los ensayos TUNEL, aunque sí se ha detectado una cierta activación glial, señal de estrés oxidativo. Los resultados menos concluyentes de este estudio han sido los análisis de expresión de factores inflamatorios y relacionados con patología vascular. En todos los genes analizados no se ha detectado una alteración clara en los animales STZ, y en el caso del TNF- α , típico factor sobreexpresado en retinas diabéticas, se ha detectado una reducción en su expresión.

R2.2- Modelo de neovascularización ocular en ratón

El objetivo de este apartado de mi tesis ha consistido en la puesta a punto y optimización del modelo de neovascularización coroidea (NVC) inducido por láser en ratón así como su completa caracterización, tanto a nivel de función de retina como a nivel de progresión de la neovascularización y los principales eventos patológicos.

R2.2.1. Generación del modelo de NVC mediante fotocoagulación con láser verde de 532 nm

Para la generación del modelo se usaron ratones macho salvajes de la cepa C57BL/6N, que son ratones pigmentados y, por tanto, absorben bien la energía del láser, y estudios anteriores indican cómo los machos de la sub-cepa N responden mejor a la creación de lesiones neovasculares por láser (Poor *et al.*, 2014).

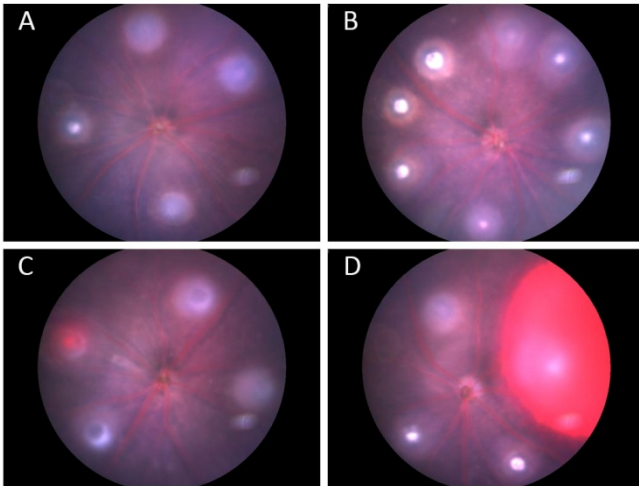


Figura R-17. Inducción de lesiones en retina de ratón con un sistema de láser guiado por imagen. (A) Imagen de fondo de ojo de ratón con 4 lesiones en retina central, equidistantes del nervio óptico. (B) Imagen de fondo de ojo de ratón con 7 lesiones en retina central, equidistantes del nervio óptico. (C) Imagen de fondo de ojo con aparición de hemorragia subretiniana leve en una lesión. (D) Imagen de fondo de ojo con aparición de hemorragia intravítrea grave en una lesión.

Una vez anestesiados los animales y las pupilas dilatadas, se realizaron las lesiones por fotocoagulación con láser verde a 250 mW de intensidad y 100 ms de duración, con un tamaño de *spot* de 50 μm , en el área de retina central. Se realizaron 4 lesiones por ojo en las posiciones a 3, 6, 9 y 12 horas equidistantes al nervio óptico en los animales asignados al protocolo 1, dirigido a los estudios *in vivo* y a la evaluación *post-mortem* de la aparición de neovascularización coroidea (figura R-17A). De esta manera las lesiones quedaban lo suficientemente separadas como para reducir al máximo las probabilidades de fusión entre ellas. Los animales asignados al protocolo 2, dirigido al estudio de los cambios en la expresión génica y análisis histológicos, fueron sometidos a 7 lesiones con láser por ojo (figura R-17B), aumentando así la alteración de la retina con el fin de hacer más patentes los cambios en los patrones de expresión.

Una fotocoagulación exitosa es aquella que provoca la rotura de la membrana de Bruch (MB), hecho que permitirá la invasión del espacio sub-retiniano por los neovasos emergentes desde la coroides en el proceso de angiogénesis patológica. En un primer momento, una correcta lesión se presumía por la aparición de una burbuja alrededor del *spot* quemado (forma de halo), observada en el fondo de ojo en el momento de la aplicación del láser. Además, la rotura de la MB se corroboró mediante tomografía de coherencia óptica (OCT), realizada el mismo día de la fotocoagulación (figura R-18). Si la lesión había sido realizada correctamente se observaba una discontinuidad en la capa de la MB (figura R-18AB), en cambio una lesión mal ejecutada no producía ninguna discontinuidad (figura R-18D), por tanto el láser no había sido enfocado correctamente y no había llegado a romper la MB.

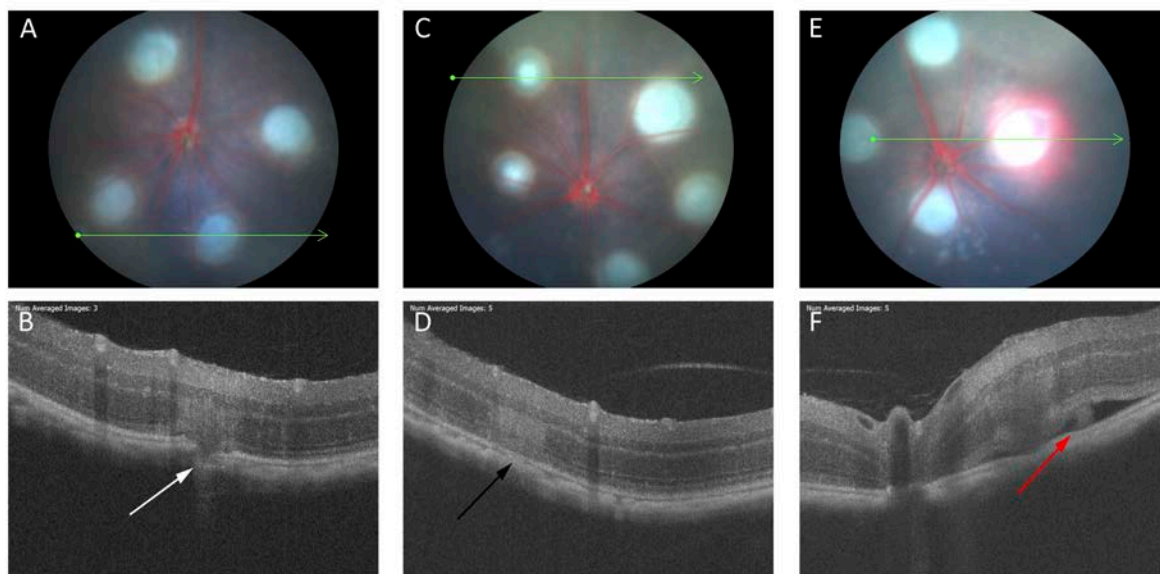


Figura R-18: Visualización por OCT de distintos tipos de lesiones. (A,B) imagen de fondo de ojo y OCT de una lesión en la que se ha conseguido de manera apropiada la ruptura de la membrana de Bruch (señalado con flecha blanca). (C,D) Imagen de fondo de ojo y OCT de una lesión fallida, que no ha conseguido la ruptura la membrana de Bruch (señalado con flecha negra). (E,F) Imagen de fondo de ojo y OCT de una lesión fallida, que ha provocado hemorragia subretiniana y desprendimiento de retina (señalado con flecha roja). Las flechas verdes en las imágenes de fondo de ojo indican la zona donde se ha realizado el OCT.

En algunos casos, la aplicación del láser provocó hemorragias, que pudieron ser de pequeña envergadura (figura R-17C) o masivas (figura R-17D). En el primer caso la lesión en concreto podía ser excluida en los estudios de neovascularización. En cambio, el segundo caso el ojo entero era excluido del estudio ya que la hemorragia provocaba un desprendimiento de retina (figura R18-F) que podía afectar al proceso de neovascularización e inducir alteraciones inflamatorias no deseadas.

R2.2.2. Caracterización *in vivo* de la progresión de las lesiones

Las lesiones fueron analizadas a distintos tiempos post-láser mediante angiografía fluoresceínica (AF) y tomografía de coherencia óptica (OCT) para monitorizar su evolución y determinar el punto óptimo de progresión para los estudios post-mortem.

Se realizó AF a día 2, 4, 7, 9, 11 y 14 post-láser y se observó la aparición de exudados hiperfluorescentes en las zonas lesionadas (figura R-19A,B). Estas áreas fluorescentes fueron cuantificadas mediante software de imagen *Image-J* y la evolución temporal se midió calculando al diferencia de tamaños entre dos días de análisis consecutivos (figura R-19C). De esta manera se observó como las áreas de exudación sufrían una regresión inicial entre los días 2 y 4 post-láser, probablemente debido a una reducción en la inflamación inicial de la zona lesionada. Posteriormente las lesiones evolucionaron incrementando significativamente su tamaño entre los días 4 y 7, momento en el que

se presume la aparición de los neovasos, seguido de un estancamiento hasta el final del estudio a 14 días post-láser.

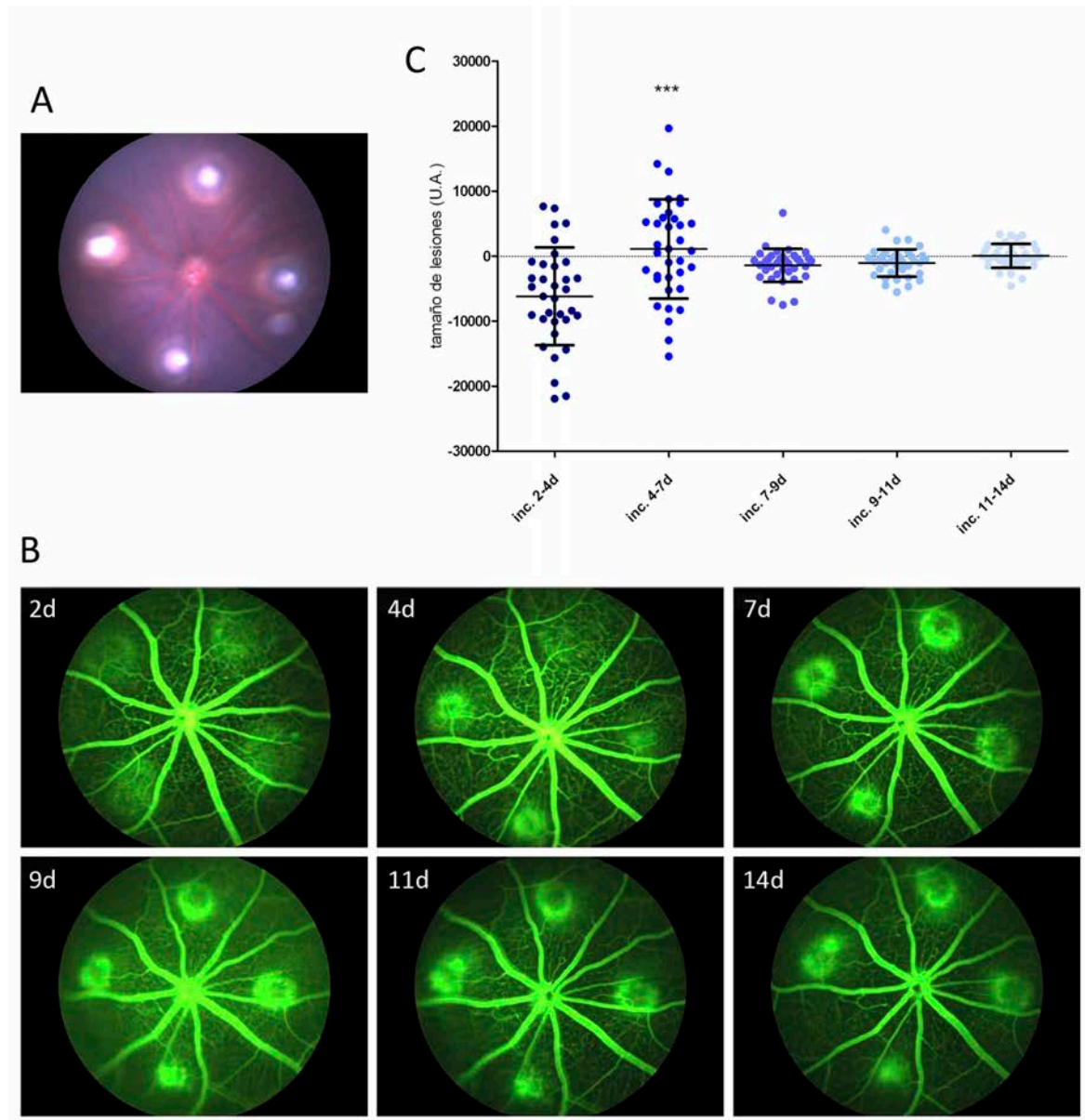


Figura R-19. Análisis temporal angiográfico. (A) imagen de fondo de ojo con 4 lesiones equidistantes del nervio óptico en retina central. (B) Imágenes de angiografía fluoresceínica a 2, 4, 7, 9, 11 y 14 días post-láser. (C) Cuantificación de la progresión en el tamaño de las lesiones mediante medición de área exudativa y cálculo de la diferencia de tamaño entre días consecutivos. Cada punto representa la diferencia de tamaño de una lesión en un período temporal y las barras representan la media \pm SD. *** $p < 0.001$, comparado con el período temporal anterior.

La evolución de las lesiones también fue monitorizada mediante OCT a 2, 5 y 7 días post-láser (figura R-20). Esta técnica permitió observar cómo lesiones que habían roto la MB, a día 2 aún no exhibían alteraciones sub-retinianas y a partir del día 5 empezaba a aparecer una masa celular alrededor de la lesión, correspondiente a la neovascularización invadiendo el espacio sub-retiniano (figura R-20, señalado con flechas rojas), junto con aparición de fluido en algunos casos (figura R-20, señalado con flechas blancas), típico síntoma de exudación por parte de los nuevos vasos más débiles.

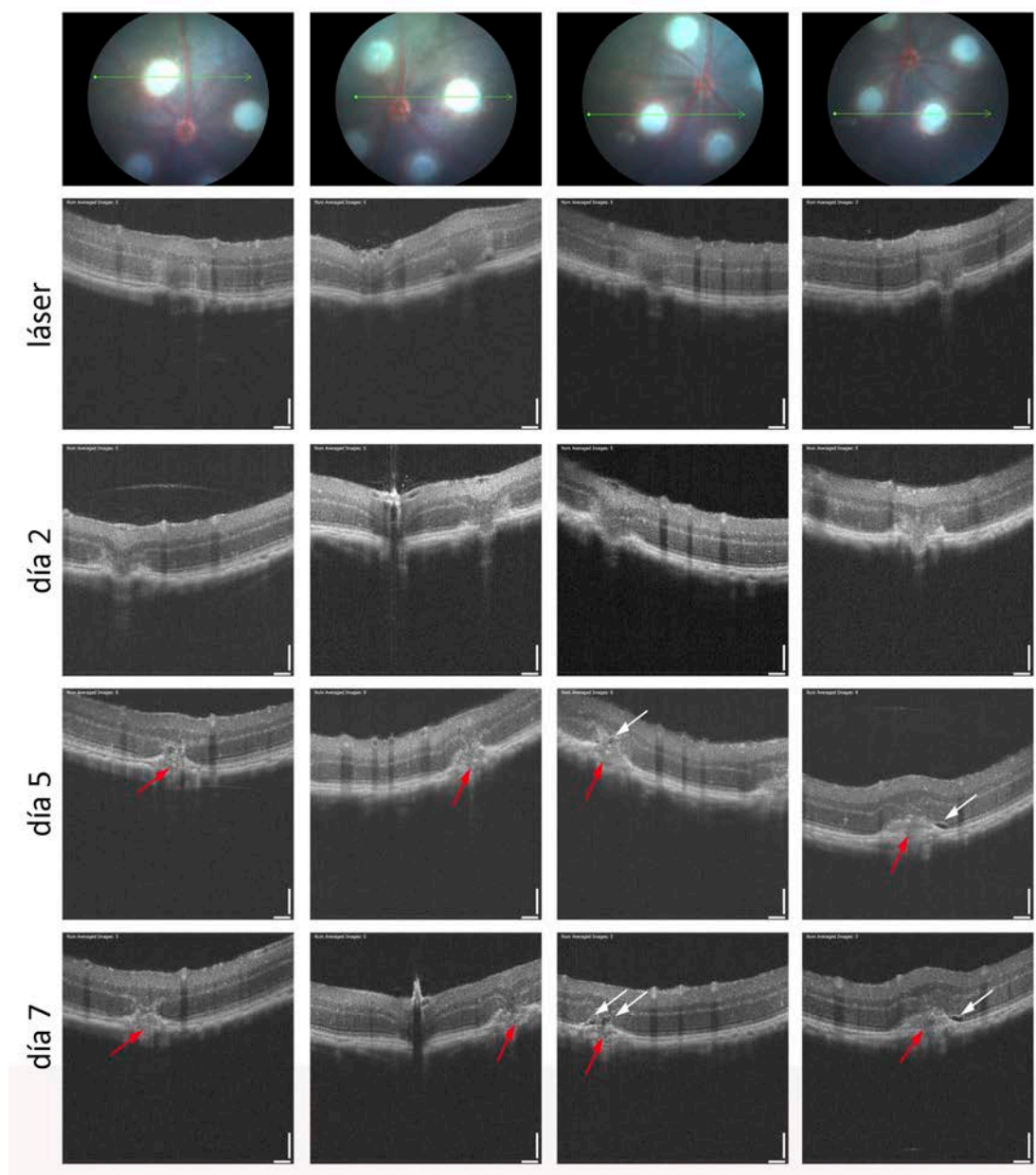


Figura R-20: Seguimiento por OCT de la evolución de lesiones durante 7 días. Se realizó OCT en el momento de aplicación del láser en las 4 lesiones de un ojo para visualización de rotura de membrana de Bruch. Posteriormente se realizó OCT a días 2, 5 y 7 post-láser para monitorización de la evolución de las lesiones, visualización de aparición de áreas neovasculares (zonas señaladas en rojo) y aparición de fluido subretiniano (zonas señaladas en blanco).

Se analizaron 3 animales (6 ojos) mediante OCT y se cuantificaron el número de roturas de la MB, el número de lesiones con aparición de neovascularización y el número de exudados sub-retinianos (tabla...). De un total de 25 lesiones analizadas, se detectó rotura de la MB en 23 y en todas ellas meno una se observó aparición de neovascularización coroidea a partir del día 5. En cambio, sólo en 56% de las lesiones exhibieron presencia de fluido sub-retiniano, a partir del día 5. En algunos casos el líquido desaparecía cuando se analizaba a día 7, en otros, el líquido no aparecía hasta el día 7. Sólo en un caso la NVC observada a día 5 desapareció (cicatrizaciónd e la herida) a día 7.

Tabla R-02: cuantificación de lesiones con neovascularización y líquido sub-retiniano en imágenes OCT. OD, ojo derecho; OI, ojo izquierdo; MB, membrana de Bruch; NV, neovascularización; LSR, líquido sub-retiniano.

	animal 1, OD	animal 1, OI	animal 2, OD	animal 2, OI	animal 3, OD	animal 3, OI	TOTAL	
n° lesiones	4	4	4	5	4	4	25	100%
n° roturas MB	4	4	4	3	4	4	23	92%
n° NV (día 2)	0	0	0	0	0	0	0	0%
n° NV (día 5)	3	4	4	3	4	4	22	88%
n° NV (día 7)	3	4	3	3	4	4	21	84%
n° LSR (día 2)	0	0	0	0	1	0	1	4%
n° LSR (día 5)	2	3	2	1	4	2	14	56%
n° LSR (día 7)	1	3	1	1	4	3	13	52%

R2.2.3. Evaluación de la función visual mediante electroretinograma focal (fERG)

La alteración funcional de la retina en las áreas lesionadas se determinó mediante fERG en condiciones escotópicas (figura R-21). Se realizaron lecturas electroretinográficas a tres intensidades de estímulo luminoso, a días 7 y 14 post-láser, en un área incluyendo una sola lesión de cada ojo y se compararon con lecturas en un área del mismo tamaño en ojos control sin lesionar.

A 7 días de la realización de las lesiones con láser se observó una reducción significativa en la amplitud de la onda *b* de los animales de estudio, comparado con los animales control. Esta reducción sólo se detectó cuando se estimularon los ojos a máxima intensidad de flash de luz ($12800 \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$) pero no se observó a intensidades menores, donde la respuesta electroretinográfica es muy leve. El mismo análisis realizado a 14 días post-láser reveló la misma alteración en la amplitud del ERG de los animales de estudio, aunque en este punto la diferencia frente a los controles era menor. También se comparó la amplitud de la onda *a* del electroretinograma y en este caso sólo se observó una disminución significativa en la señal en animales tratados con láser a 7 días post-intervención en las mismas condiciones de estímulo luminoso. Finalmente se comparó el tiempo implícito del ERG (tiempo que tarda en aparecer la onda electroretinográfica desde la estimulación con luz) y este parámetro también se vió alterado tanto a 7 días como 14 días, viéndose una diferencia estadísticamente significativa sólo cuando se estimulaba a baja intensidad de flash de luz ($200 \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$), cuando no se satura la retina y se aprecian las diferencias en cuanto a velocidad de respuesta. Estos resultados demuestran que la aplicación de láser para la rotura de la membrana de Bruch y el subsiguiente crecimiento de neovasos provenientes de la coroides, invadiendo el espacio sub-retiniano, causa una alteración plausible en la retina neural afectando a la transducción de la señal

eléctrica y, por tanto, afectando a la funcionalidad de la retina. Esta alteración es más evidente a 7 días post-láser, momento de máximo crecimiento de la lesión neovascular, mientras que a 14 días sufre una cierta reversión debido seguramente a procesos de cicatrización y recuperación de la retina.

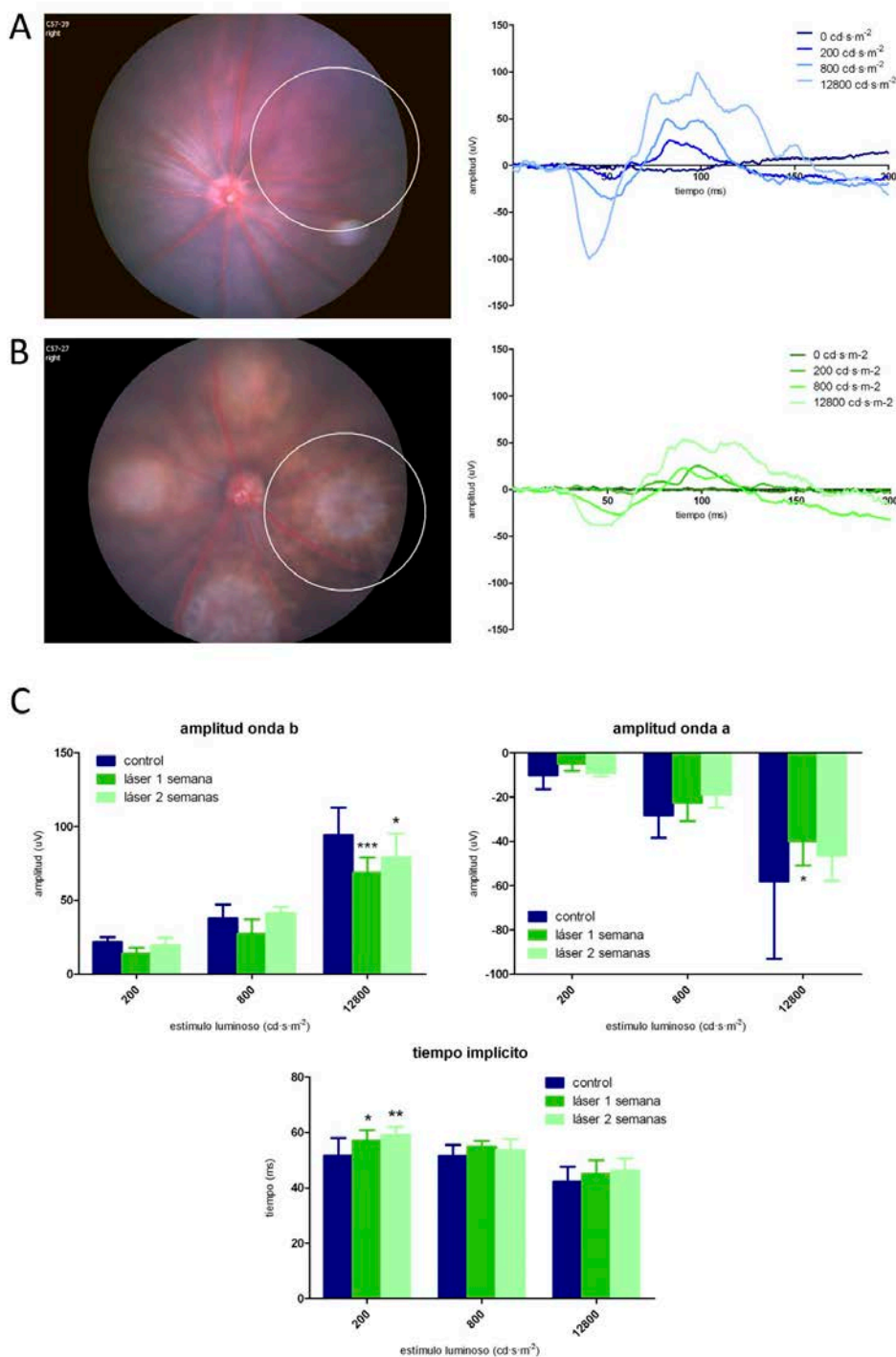


Figura R-21. Análisis electroretinográfico comparativo entre zona no lesionada y zona lesionada de retina de ratón a 7 y 14 días post-láser. Se realizó fERG de áreas de retina sana de ojo control (A) y áreas de retina lesionada de ojo lesionado con láser (B) midiendo a distintas intensidades de flash luminoso a 7 y 14 días post-láser. (C) Cuantificación y comparación de la amplitud de las ondas b y a, y el tiempo implícito, representando una media de 6 animales por grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparado con área sin lesionar (control) a la misma intensidad.

R2.2.4. Cuantificación de las áreas neovasculares mediante inmunofluorescencia en *flat-mounts*

Otra forma de cuantificar las lesiones neovasculares consiste en la realización de inmunotinción con isolectina-B4 *post-mortem* para la detección de células endoteliales en las zonas lesionadas. El tejido ocular fue diseccionado, eliminando el polo anterior y la retina, y se dispuso el polo posterior (EPR + coroides + esclera) en forma de *flat-mount* (figura R-23A). En la figura R-22 se muestran dos imágenes de la capa de células del EPR desde una vista frontal, donde se observaron las uniones intercelulares marcadas en rojo por la inmunotinción con anticuerpo anti-*zonula occludens-1*. En la zona donde se realizó la lesión con láser (figura R22B) se observó una alteración de la capa del EPR, desapareciendo las uniones intercelulares y apareciendo en el centro de la lesión una tinción específica con isolectina-B4, señal de presencia de células endoteliales emergiendo desde la coroides hacia el espacio sub-retiniano. Estas células crecieron desordenadamente, en distintos planos.

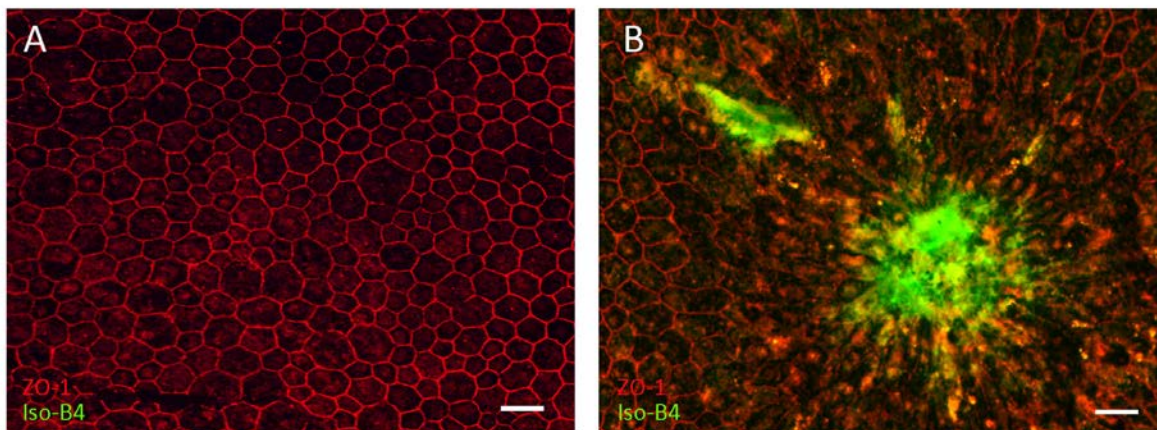


Figura R-22: Detección de células endoteliales en las áreas lesionadas. Los ojos de los animales de estudio fueron diseccionados, se eliminó la retina y el polo posterior fue montado en *flat-mount* exponiendo el EPR. Se realizó co-inmunofluorescencia anti-zónula ocludens (ZO-1) para la visualización del EPR y isolectina-B4 (Iso-B4) para la detección de células endoteliales. (A) Imagen de microscopía de fluorescencia de una zona sin lesionar. (B) Imagen de microscopía de fluorescencia de una zona lesionada. Barras de escala = 10 μ m.

Se compararon los tamaños de lesiones a 7 y 14 días post-láser en 6 ratones por grupo con 4 lesiones en cada ojo, para determinar el crecimiento de las áreas neovasculares (figura R-23). Los promedios de las cuantificaciones mostraron como a 7 días post-láser las lesiones eran significativamente más grandes que a 14 días. Esto puede ser debido al estancamiento en la angiogénesis y al proceso de cicatrización que se da entre los días 7 y 14.

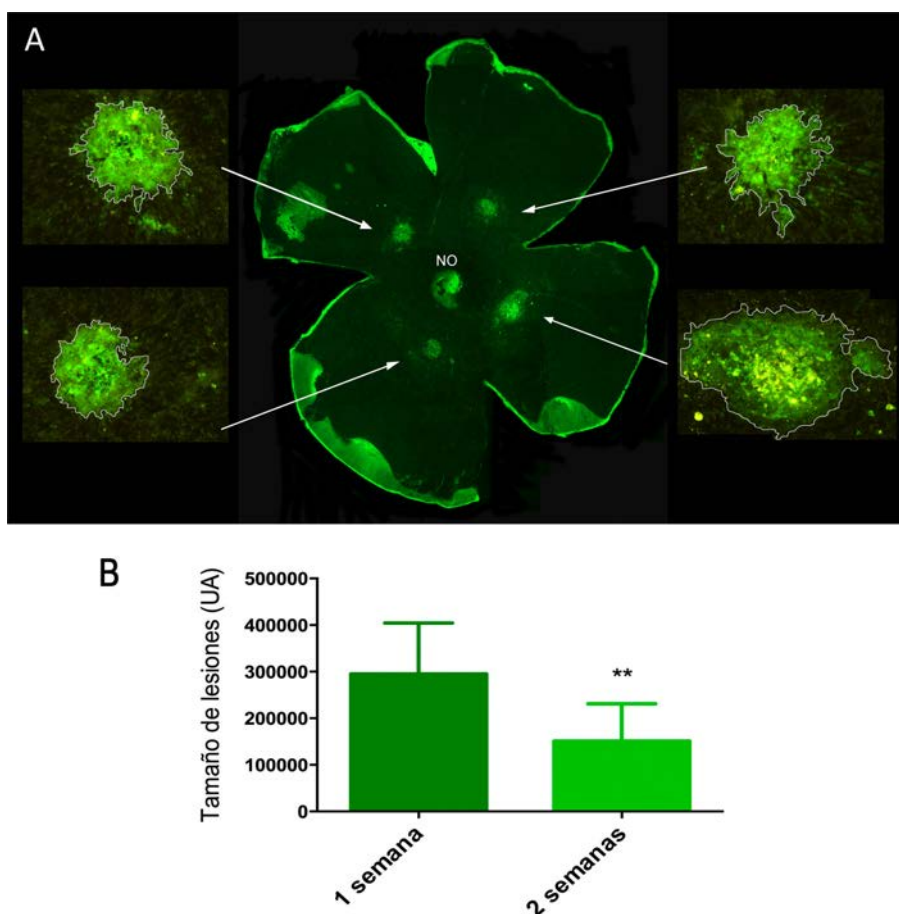


Figura R-23: Cuantificación de las áreas neovasculares a 7 y 14 días post-láser. (A) Ejemplo de las cuatro lesiones de un ojo marcadas con isoelectina-B4. El tamaño de las lesiones fue cuantificado mediante delimitación del perímetro y obtención del valor de área en unidades arbitrarias. (B) Cuantificación de las lesiones de 6 animales a 7 días post-láser y 6 animales a 14 días. Representación de la media de tamaños \pm SD. ** $p < 0.01$ comparado con la media de tamaños a 1 semana post-láser. NO: nervio óptico.

Tomando estos resultados en conjunto con los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* de caracterización de evolución de las lesiones y evaluación de la función visual, se determinó el día 7 post-láser como el momento óptimo de análisis en futuros estudios de terapias anti-angiogénicas.

R2.2.5. Evaluación de la expresión génica

A parte de los estudios vasculares, otro punto de caracterización del modelo fue el análisis de las alteraciones en la expresión de diversos genes relacionados con procesos inflamatorios y angiogénicos en retina lesionada con láser. Se extrajo RNA de polo posterior de ojos con 7 lesiones a 1, 2, 3 y 5 días post-láser y de ojos control sin láser. Se observó como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), relacionada con el estrés glial, se encontraba sobre-expresada a 1, 2 y 3 días post-láser, comparado con el control (figura R24-A). Esta sobre-expresión fue máxima a día 1 y luego fue disminuyendo hasta alcanzar los niveles basales a día 5. Lo mismo se observó en el caso de la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), una de las quimiocinas clave en la regulación de

la migración e infiltración de monocitos y macrófagos, y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), una citoquina clave en procesos inflamatorios y apoptóticos. En ambos casos se observó un pico de sobre-expresión a día 1 post-láser que fue remitiendo en días posteriores hasta alcanzar niveles basales a los 5 días (figuras R24B y C). La sobre-expresión temprana de estos tres factores es indicativo de un proceso inflamatorio agudo debido a la realización de las lesiones, que va remitiendo a medida que el tejido va cicatrizando.

Por otra parte también se analizó la expresión de genes relacionados con angiogénesis, como son la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), el factor de crecimiento placentario (PIGF-1), la variante 165 del factor derivado de endotelio vascular (VEGF-165) y el VEGF-120 (figuras R-24D-G). Sin embargo, en estos casos no se observó una sobre-expresión de estos factores, como era de esperar debido al evidente crecimiento neovascular que se da en las lesiones. No se detectó alteración significativa en la expresión de ICAM-1, y en el caso del PIGF y las dos variantes de VEGF la expresión se vio inhibida a 3 -5 días post-láser, en comparación con los ojos control.

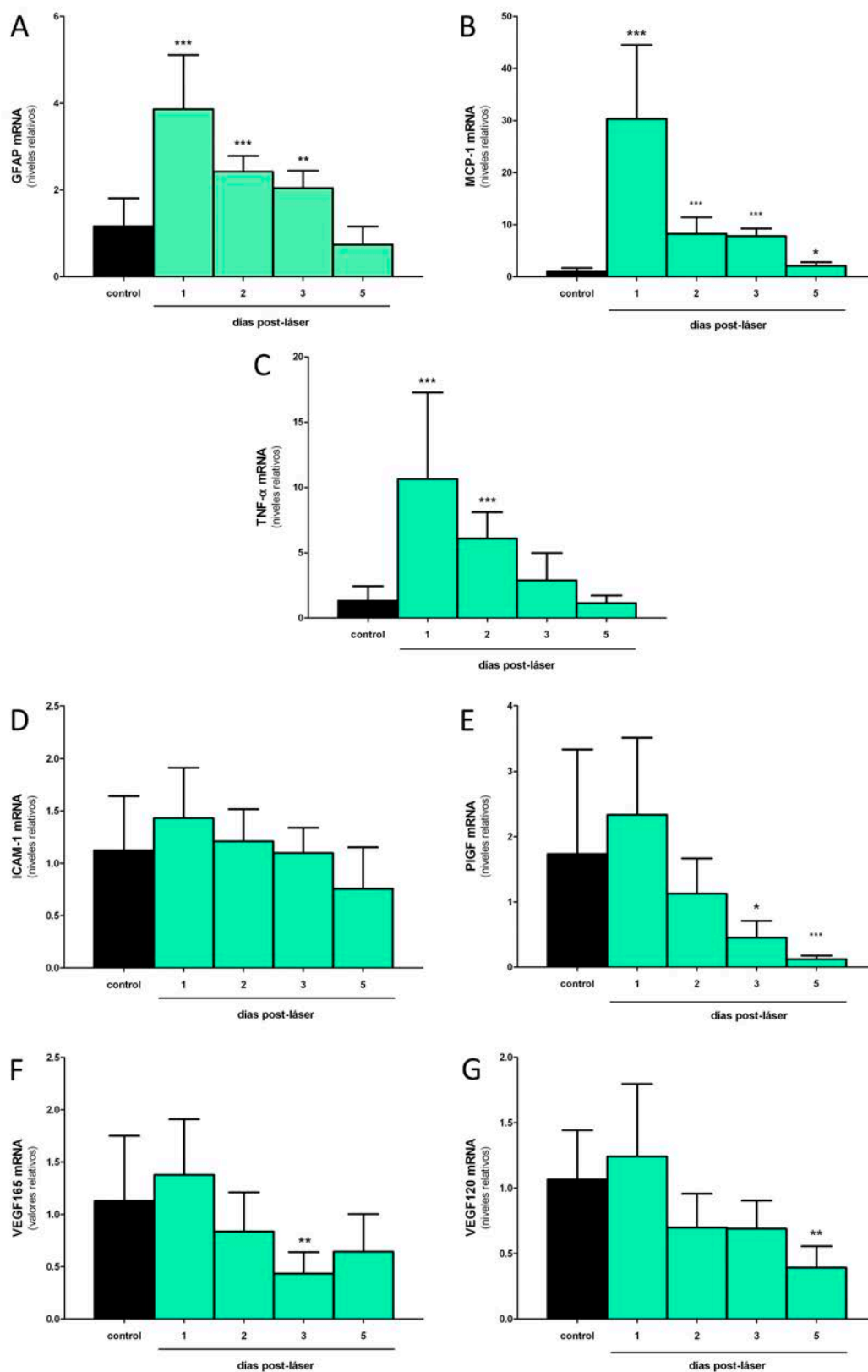


Figura R-24: Efectos de la lesión con láser en retina de ratón en la expresión génica de factores inflamatorios y pro-angiogénicos. Se extrajo RNA de polo posterior de ojos de ratón a 1, 2, 3 y 5 días post-láser, o de ojos control. Se analizaron y compararon los niveles de expresión de (A) GFAP, (B) MCP-1, (C) TNF- α , (D) ICAM-1, (E) PIGF-1, (F) VEGF-165 y (G) VEGF-120. Las barras representan la media \pm SD de 6 animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparado con el grupo control.

R2.2.6. Evaluación histológica

Por último, se efectuaron pruebas histológicas para componer un análisis cualitativo de la expresión de distintos factores en una zona control y una zona lesionada con láser. La tinción con hematoxilina-eosina permitió situar áreas control y las áreas lesionadas (figura R-25A,B) en los ojos de animales tratados con láser 3 días post-intervención. En las lesiones se pudo observar la desestructuración de la retina en la zona donde impactó el láser con rotura del EPR, así como la invasión del espacio sub-retiniano por una masa celular que correspondería a la neovascularización emergiendo desde la coroides.

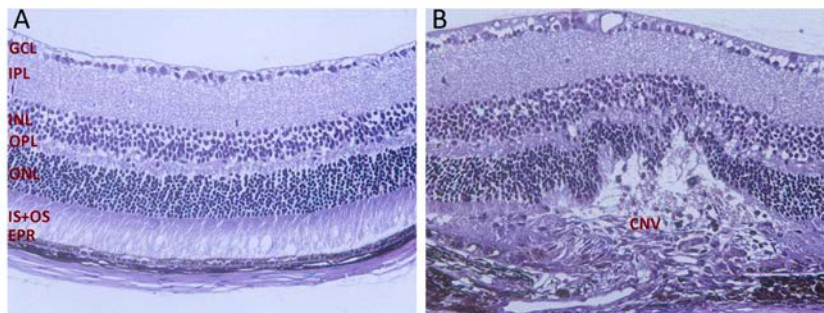


Figura R-25: Imagen histológica de una lesión neovascular. Microsecciones de parafina teñidas con hematoxilina-eosina para la visualización de las estructuras celulares. (A) Retina de ratón sin lesionar. (B) Retina lesionada, 7 días post-láser, con disrupción de la membrana de Bruch y el EPR, e invasión endotelial en el espacio sub-retiniano. GCL: capa de células ganglionares, IPL: capa plexiforme interna, INL: capa nuclear interna, OPL: capa plexiforme externa, ONL: capa nuclear externa, IS+OS: segmentos internos y externos de los fotorreceptores, EPR: epitelio pigmentado de la retina, CNV: neovascularización coroidea.

Se usaron microsecciones consecutivas para realizar inmunofluorescencia (figura R-26). La tinción anti-RPE-65 (fluorescencia roja) marcó las células del EPR y permitió visualizar la continuidad de éste en una retina control (figura R-26A), o la disrupción debida a la lesión con láser (figura R-26B), evidenciando la rotura de la membrana de Bruch. Se observó como la GFAP, que sólo se encuentra expresada en la capa de células ganglionares en las zonas control, aumentó su expresión en las zonas lesionadas, internalizándose en las capas exteriores de la retina, apuntando a una activación glial en la zona afectada. El VEGF mostró una expresión ubicua en toda la zona de la retina sin lesionar (zona control), pero esta expresión se vio levemente incrementada en la zona lesionada, sobretudo en las células emergentes de la lesión. Sin embargo, esta sobre-expresión no se detectó en la retina neural, posible motivo por el cual no se observó un incremento de la expresión de VEGF en extractos de RNA total de polo posterior cuando se analizó por PCR cuantitativa. Finalmente, el marcaje con colágeno IV permitió visualizar las células endoteliales. En la zona control sólo se observó marcaje en los vasos propios de la retina y en la coroides, mientras que en la zona lesionada se observó marcaje en el centro de la lesión, concretamente en el espacio sub-retiniano, indicando la invasión endotelial que se produce debido a la neovascularización.

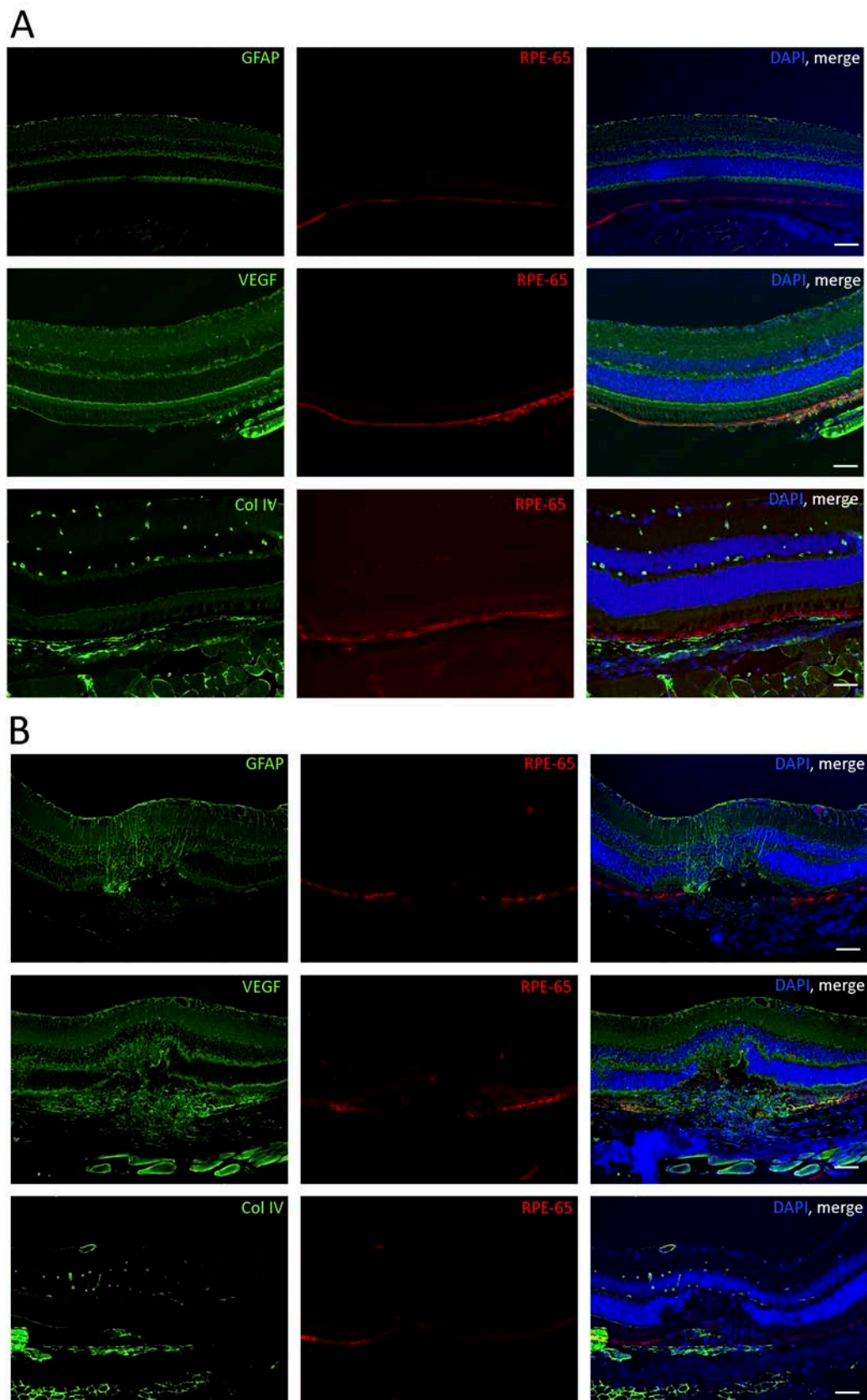


Figura R-26: Efecto de la lesión con láser en la expresión de GFAP, VEGF, Colágeno-IV y RPE-65. (A) Inmunotinciones en microsecciones de 5 μm de retinas control y (B) retinas con lesión a 3 días post-láser, con anticuerpos anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP) para detectar estrés glial, anti-factor derivado de epitelio pigmentado (VEGF) para detectar angiogénesis, colágeno IV (Col IV) para marcar células endoteliales y anti-proteína RPE-65 para marcar el epitelio pigmentado de la retina. Contratinción de los núcleos con DAPI. Barras de escala = 40 μm.

R2.3- Inyección sub-retiniana para administración de terapia génica ocular

R2.3.1. Puesta a punto de la técnica de inyección sub-retiniana en roedores

La ruta de administración elegida para llegar al espacio sub-retiniano fue la vía trans-escleral. La metodología fue desarrollada adaptando varios protocolos publicados anteriormente (Puras *et al.*, 2013, Delgado *et al.*, 2012), siguiendo los pasos ilustrados en la figura R-27. Manteniendo el animal anestesiado y una vez dilatada la pupila, el ojo fue inmovilizado mediante puntos de sutura y se disgregó el tejido conjuntivo de la zona superior del globo ocular para acceder a la esclera (figura R-27A-C). Se realizó la esclerotomía con un bisturí, efectuando un corte lo suficientemente profundo como para acceder a la retina pero sin sobrepasarla (figura R27D-E) y finalmente se introdujo la aguja de inyección de una forma tangencial, para acceder al espacio sub-retiniano, donde se administró el compuesto deseado en cada caso (figura 728F).

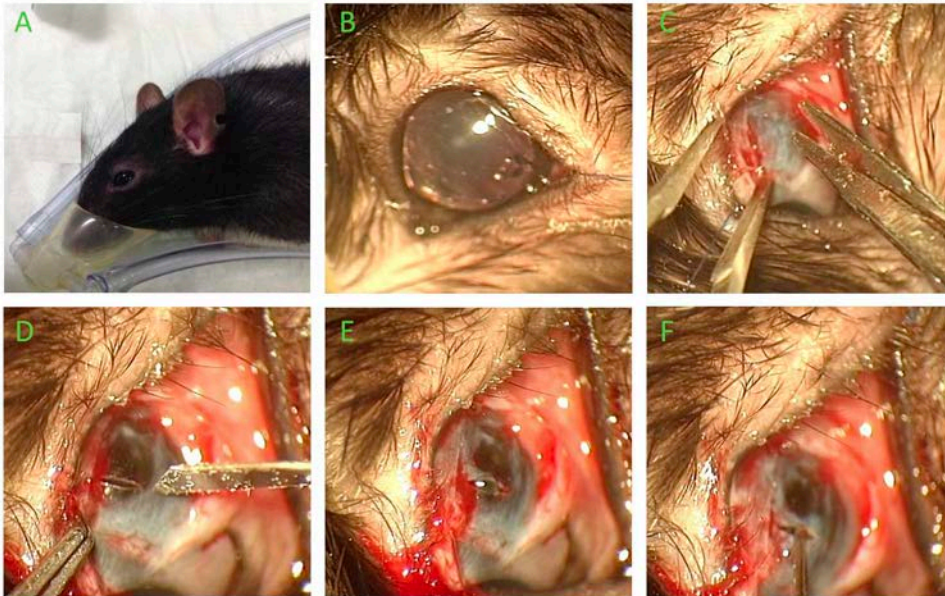


Figura R-27: Imágenes de los principales pasos para la administración de compuestos en el espacio sub-retiniano de un ojo de roedor. (A) Mantenimiento de la anestesia con isoflurano inhalado. (B) Ojo con pupilas dilatadas. (C) Procedimiento de separación del tejido conjuntivo para la exposición de la esclera. (D) Realización de un corte en esclera y coroides con bisturí. (E) Visualización de la retina evaginando por el orificio. (F) Introducción de la aguja con punta roma, paralela a la coroides, para la administración en el espacio sub-retiniano.

El procedimiento condujo a tres posibles resultados: una administración correcta, creando una burbuja por debajo de la retina y subsiguiente desprendimiento de retina (figura R-28A), la punción de un vaso sanguíneo de la retina con la aguja de inyección, causando una hemorragia intravítrea o sub-retiniana (figura R-28B) o el sobrepaso de toda la retina y la administración en el vítreo, con posible punción del cristalino (figura R-28C). Las situaciones 2 y 3 se consideraron administraciones fallidas y por tanto se descartaron de los estudios de terapia génica.

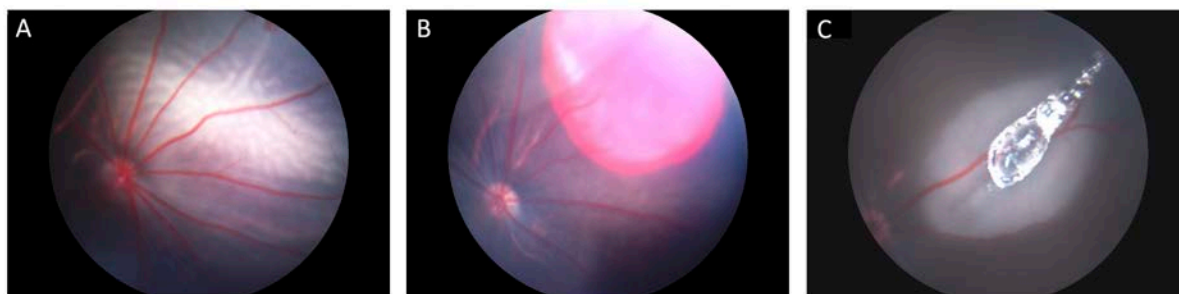


Figura R-28: Posibles resultados de la inyección sub-retiniana visualizados mediante imagen de fondo de ojo. Inmediatamente posterior a la realización de la inyección, los animales fueron colocados en el equipo MicronIII para visualización del fondo de ojo. (A) Imagen mostrando una administración en el espacio sub-retiniano (B) Imagen de fondo de ojo de una administración en el espacio subretiniano con presencia de hemorragia. (C) Imagen mostrando una administración incorrecta, con invasión en la cavidad vítrea.

Una vez optimizada la técnica de administración se llegó a conseguir un porcentaje de éxito de entre el 60 y el 80%.

Tabla R-03: Resumen del número de inyecciones realizadas durante el proceso de optimización de la técnica y cuantificación de los distintos resultados obtenidos.

Producto administrado	Nº de ojos inyectados	Nº de inyecciones correctas (presencia de burbuja SR, ausencia de hemo)	Nº de inyecciones con presencia de burbuja SR y hemorrágica	Nº de inyecciones sin burbuja SR
PBS	16	10	3	3
Lipofectamina + pMC-tdTomato	10	6	1	3
Total	26	16 (61,5%)	4 (15,4%)	6 (23,1%)

R2.3.2. Caracterización de los eventos derivados de la inyección

Animales administrados correctamente con 2 μ l de PBS fueron mantenidos durante 4 semanas hasta el momento de la eutanasia para la evaluación histológica de posibles alteraciones permanentes en retina debido al procedimiento quirúrgico. La inmunofluorescencia en criosecciones reveló un aumento significativo en la expresión de GFAP en la zona de inyección, comparado con una zona alejada del mismo ojo, revelando una activación de las células de Müller y por tanto un estrés de la retina en esa área. En cambio, la tinción TUNEL no reveló presencia células apoptóticas en ninguna capa de la zona de retina inyectada (figura R-29).

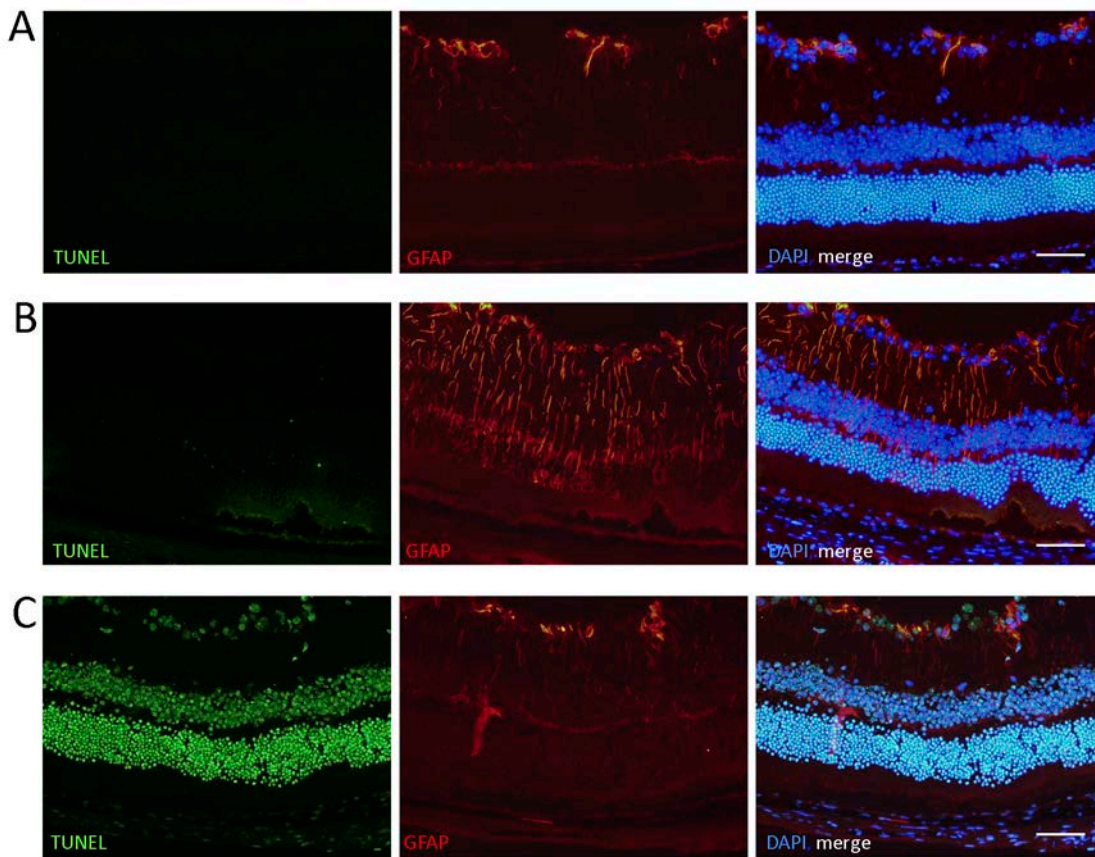


Figura R-29: Efecto de la inyección sub-retiniana en la apoptosis celular y la expresión de GFAP en retina. Imágenes de inmunofluorescencia en criosecciones de ojos con inyección subretiniana de PBS, a 4 semanas post-inyección. (A) Zona control de la retina, (B) zona inyectada, (C) control positivo de la técnica TUNEL. Se realizó inmunotinción de células apoptóticas mediante técnica TUNEL y inmunotinción con anticuerpo anti-GFAP. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. Barras de escala = 40 μ m.

R2.3.3. Transfección con *Lipofectamina*[®] y plásmido de expresión de tdTomato en EPR de rata mediante inyección sub-retiniana

Una vez puesta a punto la técnica de inyección sub-retiniana se dispuso a realizar un experimento de transfección con el reactivo comercial *Lipofectamina*[®] (LF) como vehículo de internalización de ADN. Se usó el plásmido pcDNA.tdTomato, que contiene el gen tdTomato bajo el promotor constitutivo de origen viral CMV y se generaron los complejos de transfección mezclando 0,2 μ g pcDNA.tdTomato + 40% LF.

A los 5 días post-transfección, se detectó una expresión significativa de tdTomato (fluorescencia roja) en la capa del EPR de los ojos inyectados con LF/tdTomato, comparado con los ojos inyectados con PBS, donde no se detectó ninguna fluorescencia parecida (figura R-30). De los 6 ojos inyectados exitosamente con mc.tdTomato, se detectaron células positivas por tdTomato en 5 de ellos, sólo en la capa del EPR, en la zona próxima al punto de inyección. Esto sugiere que la administración sub-

retiniana tuvo un efecto localizado, por tanto es improbable que, mediante esta técnica, se llegue a transfectar zonas más alejadas de la retina.

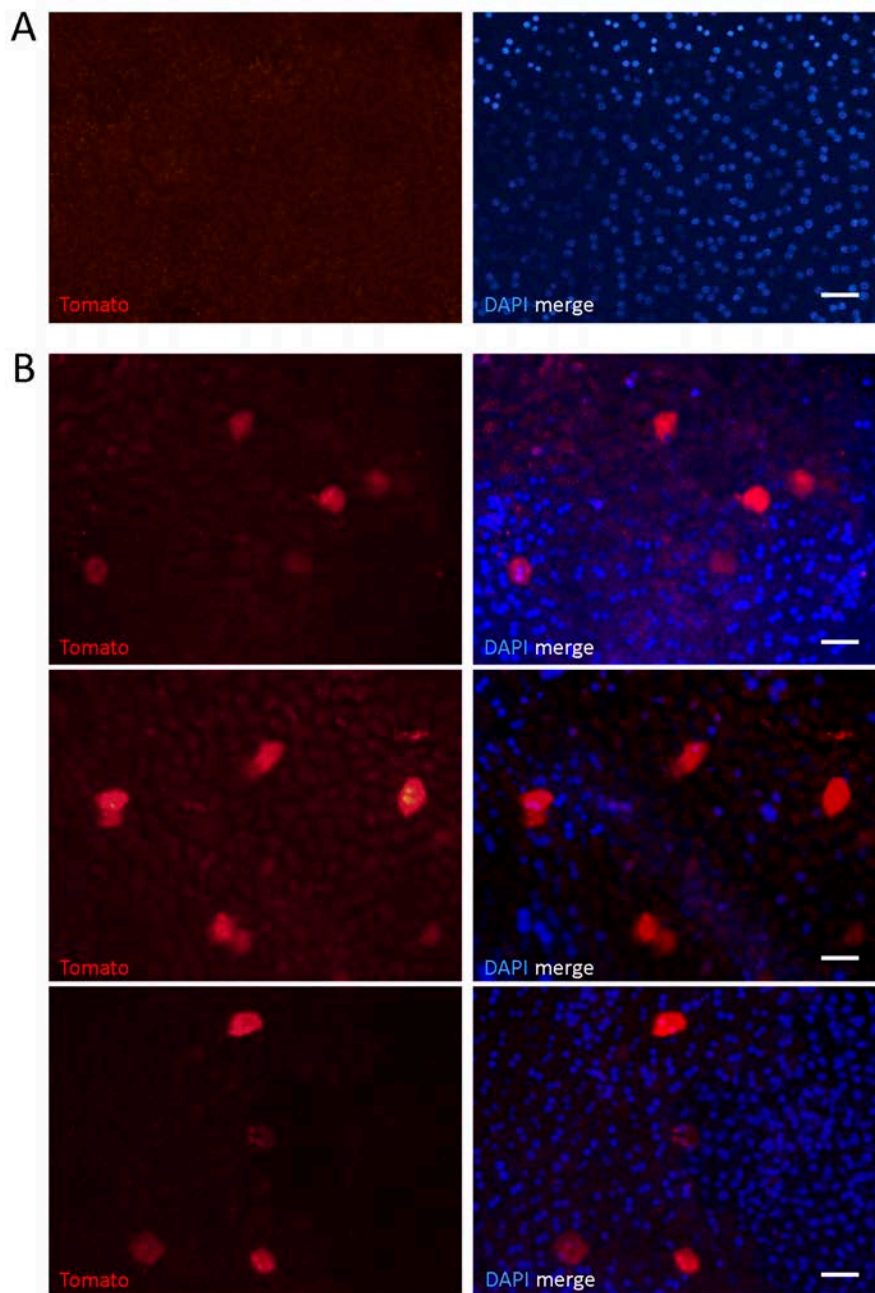


Figura R-30: Visualización de células rojas en EPR de rata transfectado con Lipofectamina + plásmido mc.tdTomato mediante inyección sub-retiniana. Ojos control inyectados con 2 μ l PBS (A) y ojos inyectados con 0,2 μ g pcDNA.tdTomato en medio acuoso conteniendo 40% LF (B) fueron diseccionados 5 días post-inyección y el EPR fue expuesto mediante montaje en *flat-mount* del polo posterior. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI y las preparaciones fueron observadas en el microscopio de fluorescencia bajo filtro verde para la detección de células positivas para Tomato. Barras de escala = 10 μ m.

Resultados - Parte III

ESTUDIO DE SISTEMAS NO VIRALES DE TERAPIA GÉNICA EN RETINA

El objetivo principal de esta tesis es la generación de un sistema de terapia génica no viral para la expresión de los factores PEDF y SST en retina, para el tratamiento de patologías oculares vasoproliferativas. En el desarrollo óptimo de estos sistemas, tan importante es el vehículo de transfección (nanopartícula) como el material genético (vector plasmídico). Durante mi trabajo de tesis doctoral se ha trabajado en el desarrollo de vectores plasmídicos específicamente diseñados para terapia génica ocular y en el testado de dos sistemas de nanopartículas no virales como vehículos de transferencia genética en células del EPR: nanopartículas proteicas y quitosanos.

R3.1- Generación de vectores no virales de expresión de PEDF y SST

R3.1.1. Clonación de los vectores plasmídicos

Se generaron dos tipos de vectores plasmídicos, usando como esqueleto el vector precursor de minicírculos (pMC). El primer tipo de plásmidos se generó mediante la introducción de los cDNAs del PEDF, la SST y el tdTomato en pMC junto con el promotor CMV y una secuencia de poliadenilación al final (figura R-31A-C). En segundo lugar, otro set de plásmidos fue generado usando también el pMC, cambiando esta vez el promotor por VMD2 y añadiendo la secuencia S/MAR a C-terminal de los genes (figura R-31D-E). Los 6 plásmidos fueron comprobados por patrón de digestión y secuenciación (datos no mostrados).

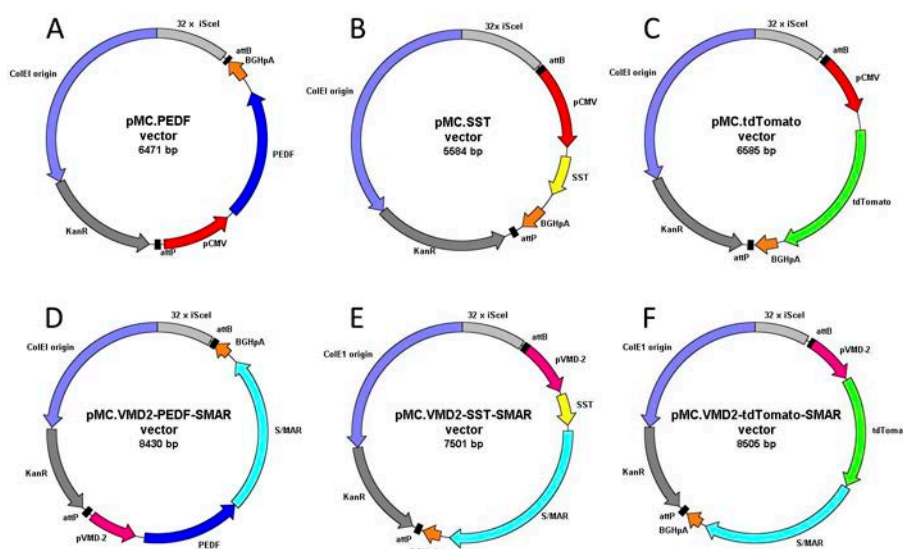


Figura R-31: Representación esquemática de los plásmidos obtenidos en las clonaciones. (A,B,C) plásmidos de expresión de PEDF, SST y tdTomato bajo CMV. (D,E,F) plásmidos de expresión de PEDF, SST y tdTomato bajo VMD-2 y S/MAR. Coll Origin: origen de replicación en procariontes; 32xiScel: 32 dianas de restricción consecutivas para la enzima iScel; attB y attP: sitios específicos de recombinación; KanR: gen de resistencia a Kanamicina; BGHpA: secuencia de poliadenilación; S/MAR: región de unión a matriz.

R3.1.2. Generación de los minicírculos

Una vez obtenidos los plásmidos pMC, estos se sometieron al protocolo de generación de minicírculos (figura R-32A). En este protocolo se indujo la recombinación entre las secuencias *att* mediante la inducción de la expresión de la recombinasa Cre bacteriana con L-arabinosa, generándose dos plásmidos: el minicírculo conteniendo exclusivamente el casete de expresión (*promotor – gen – secuencias reguladoras*) y otro plásmido conteniendo el resto de secuencia bacteriana o esqueleto. Este último fue degradado por las mismas bacterias con la enzima iScel producida también bajo inducción por L-arabinosa. Finalmente se purificaron los productos de las

inducciones y se analizaron mediante digestión y electroforesis en gel de agarosa (figura R-32B). En todos los casos se observó como el producto de inducción contenía mayoritariamente una banda correspondiente al minicirculo, de tamaño molecular inferior al vector pMC, purificado de cultivos sin inducir. El gel también reveló que la inducción no era 100% efectiva, apareciendo siempre una fina banda del tamaño del plásmido precursor en los extractos purificados de la inducción. Este remanente de plásmido precursor presente en los purificados no se tomó como contaminación negativa, debido a su igual capacidad de expresión del gen, y se procedió con los experimentos usando estas muestras.

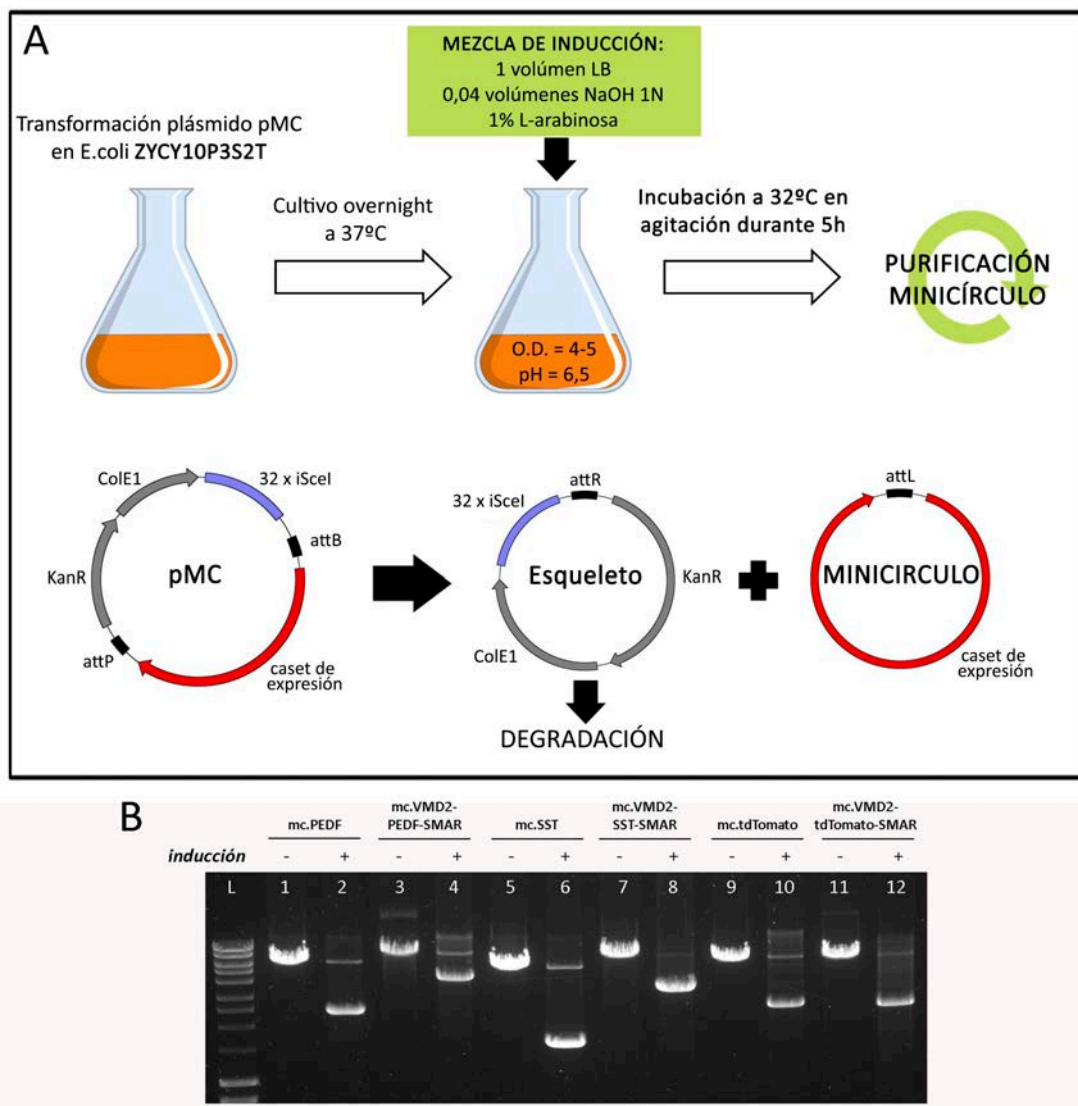


Figura R-32: Sistema de generación de minicirculos. (A) Diagrama del proceso de producción de plásmidos minicirculos, por el cual se induce la expresión de la recombinasa Φ C31 y la enzima iScel, codificadas en el genoma de las bacterias ZYCY10P3S2T. Φ C31 produce la recombinación entre las secuencias attP y attB del vector precursor, generando el minicirculo y el plásmido esqueleto, que es degradado por iScel. Finalmente se purifica el minicirculo mediante kit maxiprep. pMC: vector precursor de minicirculo, LB: caldo de lisogenia. (B) Gel de agarosa de comprobación de generación de minicirculos de todos los vectores de interés, obtenidos en el proceso de clonación. Las bandas representan los plásmidos linealizados. Columnas 1,3,5,7,9 y 11 plásmidos precursores, obtenidos de la purificación del cultivo sin inducción. Columnas 2,4,6,8,10 y 12 plásmidos minicirculo obtenidos de la purificación del cultivo en que se ha añadido la mix de inducción. L: marcador de peso molecular.

R3.1.3. Análisis *in vitro* de la expresión de tdTomato, SST y PEDF

Los minicirculos generados en el apartado anterior fueron usados en ensayos de transfección *in vitro* en células de epitelio pigmentado humano (línea celular ARPE-19) para corroborar su capacidad de expresión de los transgenes en células eucariotas.

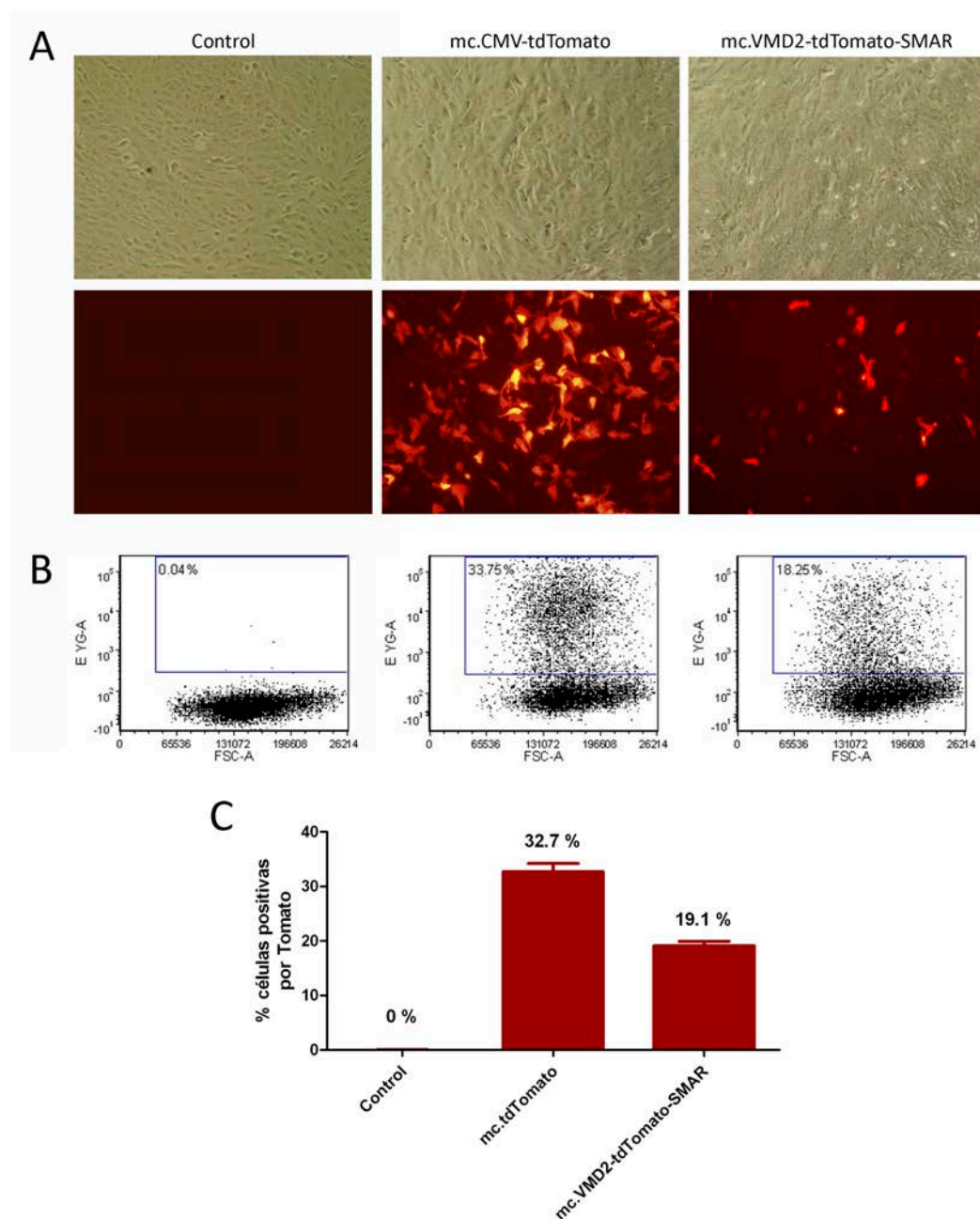


Figura R-33: Expresión *in vitro* de tdTomato en células ARPE-19 transfectadas con mc.tdTomato o mc.VMD2-tdTomato-SMAR. Cultivos de células ARPE-19 fueron transfectados con los minicirculos de expresión de tdTomato (mc.tdTomato o mc.VMD2-tdTomato-SMAR) con la ayuda de X-Treme®. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de células control (sin transfectar) o transfectadas con los dos vectores, 24 h post-transfección. (B) Análisis por citometría de flujo del número de células positivas por tdTomato. (C) Cuantificación del porcentaje de transfección con los dos vectores minicirculo. Las barras representan la media de 4 réplicas \pm SD.

El análisis bajo microscopía de fluorescencia de las células transfectadas con los minicírculos de expresión de tdTomato (mc.tdTomato y mc.VMD2-tdTomato-SMAR) 48 h post-transfección mostró una expresión significativa de la proteína roja fluorescente en comparación con las células sin transfectar, que no mostraron fluorescencia (figura R-33A). La cuantificación mediante citometría de flujo mostró como el minicírculo de expresión de tdTomato bajo CMV produce unos ratios de transfección significativamente mayores (37.7% de las células tdTomato+) que el minicírculo de expresión bajo VMD2 (19.1% de las células tdTomato+) (figura R-33B,C).

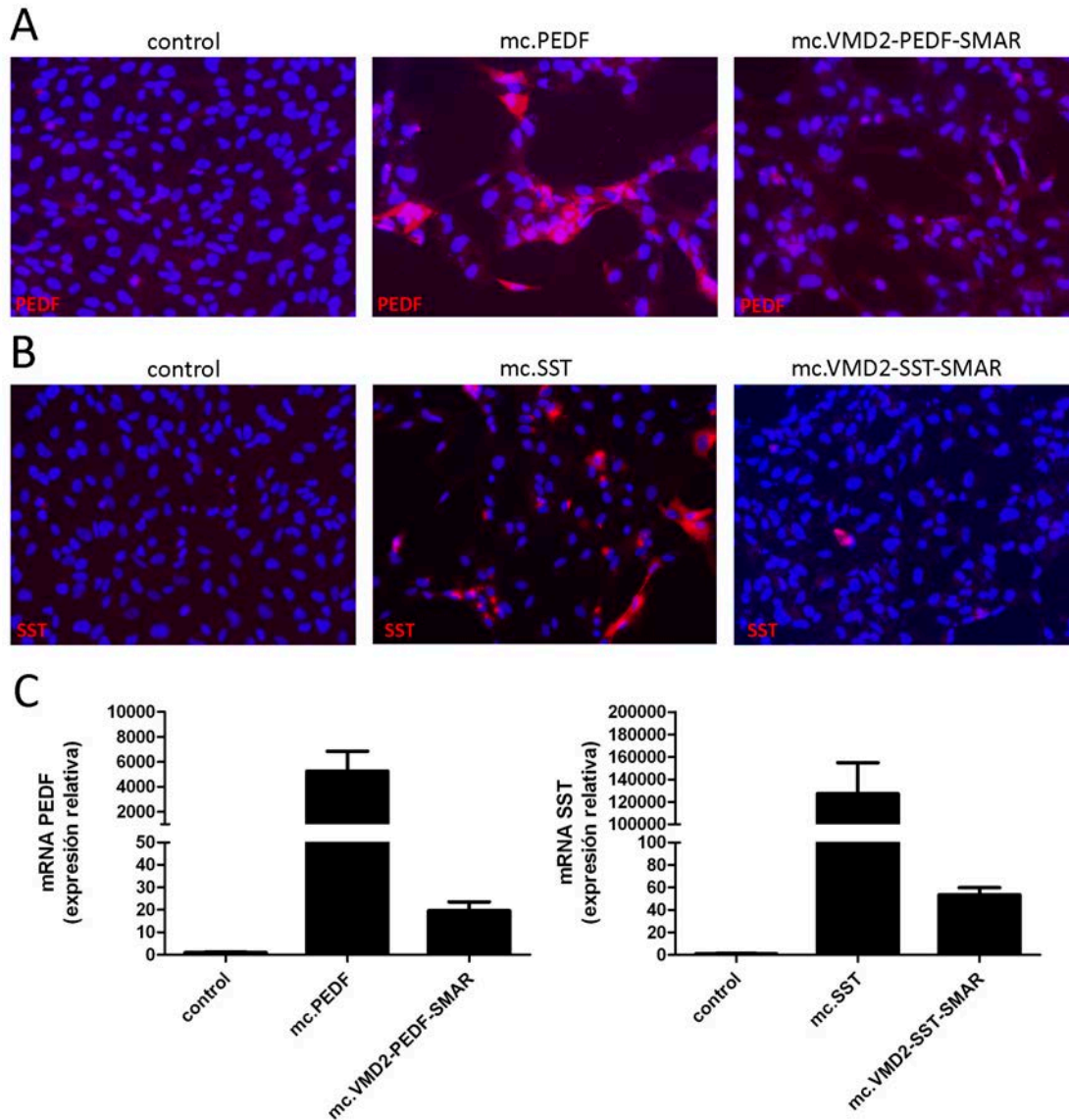


Figura R-34: Expresión *in vitro* de PEDF y SST en células ARPE-19 transfectadas con mc.PEDF, mc.VMD2-PEDF-SMAR, mc.SST o mc.VMD2-SST-SMAR. (A) imágenes de fluorescencia de inmunocytoquímica anti-PEDF (marcado en rojo) en células sin transfectar (control), células transfectadas con X-Treme® + el plásmido mc.PEDF y células transfectadas con X-Treme® + el plásmido mc.VMD2-PEDF-SMAR. (B) imágenes de fluorescencia de inmunocytoquímica anti-SST (marcado en rojo) en células sin transfectar (control), células transfectadas con X-Treme® + el plásmido mc.SST y células transfectadas con X-Treme® + el plásmido mc.VMD2-SST-SMAR. Visualización de los núcleos con tinción DAPI en azul. (C) Cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa de PEDF o SST en extractos de RNA de ARPE-19 transfectadas con los distintos complejos. Las barras representan la media \pm SD de 4 replicados.

La transfección transitoria en ARPE-19 con los minicírculos de expresión de PEDF y SST mostró unos resultados similares (figura R-34). Los vectores mc.PEDF y mc.SST, de expresión bajo el promotor CMV, exhibieron unos altísimos ratios de expresión de los transgenes, con una sobre-expresión del orden de 6.000 y 15.000 veces superior a las células control, respectivamente. En cambio, los plásmidos mc.VMD2-PEDF-SMAR y mc.VMD2-SST-SMAR produjeron una sobre-expresión mucho más moderada (de 20 y 50 veces superior a la expresión basal en las células control, respectivamente).

Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que el promotor de origen vírico CMV es mucho más potente que el promotor de origen humano VMD-2 en cultivos celulares.

R3.2- Estudio de las nanopartículas proteicas R9-GFP-H6 como sistemas transferencia génica no viral en retina

En este punto de mi trabajo de tesis se estableció una colaboración con el Dr. Villaverde para testar las nanopartículas R9-GFP-H6 como sistema no viral de terapia génica ocular.

R3.2.1. Producción y caracterización de las nanopartículas R9-GFP-H6

En primer lugar se realizó un experimento de producción y purificación de proteína R9-GFP-H6. Este experimento se llevó a cabo en los laboratorios del Dr. Villaverde, con la colaboración de la Dra. Neus Ferrer.

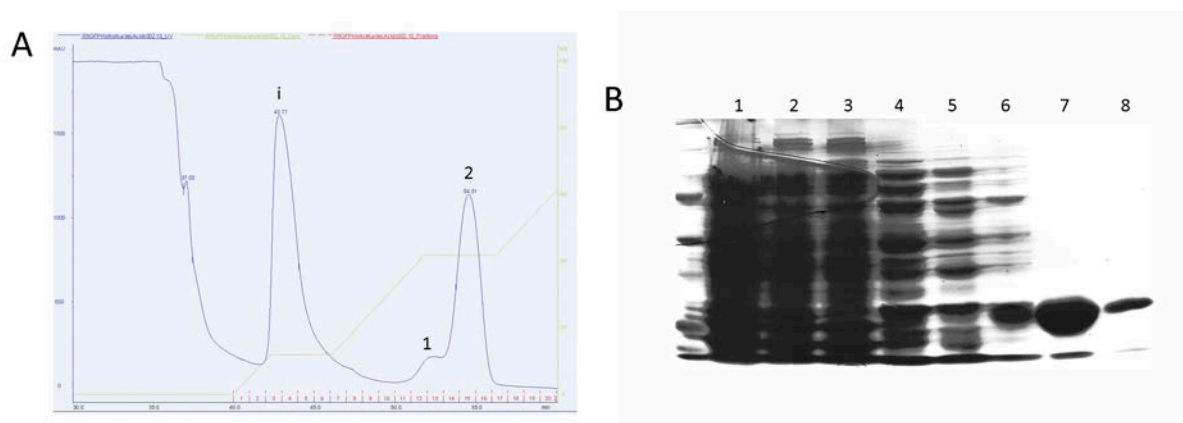


Figura R-35: Purificación de la nanopartícula R9-GFP-H6. (A) Cromatograma del paso del extracto proteico producto de la lisis del cultivo bacteriano por una columna de Ni^{2+} mediante FPLC. Se recogieron las fracciones de la 1 a la 17. El pico "i" contiene una fracción inespecífica de proteínas, el pico 1 representa la primera muestra específica de R9-GFP-H6 (fracciones 12-13) y el pico 2 contiene la mayor parte de proteína R9-GFP-H6 (fracciones 14-16). (B) Gel de acrilamida de las distintas fases de purificación de la proteína. Carril 1, lisado celular; carril 2, muestra de carga en el cromatograma; carril 3, flujo a través de la cromatografía; carril 4, fracción 4 del pico inespecífico; carril 5, fracción 5 del pico inespecífico; carril 6, Pico 1; carril 7, Pico 2; carril 8, última fracción recogida (17).

La proteína R9-GFP-H6 producida en *E. coli* fue purificada mediante cromatografía líquida rápida de proteína (FPLC) y se obtuvieron 2 muestras correspondientes al **pico 1** y el **pico 2** del cromatograma (figura R-35A). El **pico 1** mostró una fluorescencia verde menos intensa, mientras que la proteína del **pico 2** exhibía un potente color verde, debido a la GFP. En gel de acrilamida de las distintas etapas del proceso de purificación se observa como la muestra, que al principio era totalmente heterogénea y presentaba una gran cantidad de proteínas provenientes de la lisis celular (figura R-35B, carril 1), a medida que se iba sometiendo a los pasos de purificación, fue perdiendo impurezas y finalmente se obtuvo una muestra pura de la proteína de interés (figura R-35B, carriles 7 y 8).

Una vez purificadas, las proteínas fueron dializadas usando distintos buffers (tabla R-04). Las proteínas recogidas en el **pico 1**, por su menor cantidad, sólo fueron dializadas con buffer Tris-Dextrosa y se obtuvo una solución a 685.5 ug/ml. En cambio, el producto recogido en el **pico 2** de diálisis fue repartido en tres alícuotas que fueron dializadas con 3 buffers distintos para probar su solubilidad en cada uno de ellos: 500 mM Tris-NaCl, Tris-Dextrosa 5% y tampón salino de Hank (HBS, de sus siglas en inglés). En los 3 casos gran parte de la proteína precipitó, mostrando su baja solubilidad, siendo el 500 mM Tris-NaCl el más efectivo solubilizando. Los precipitados de las tres diálisis fueron aislados y resuspendidos en 1 M Tris-NaCl, que por su elevado contenido en sales fue capaz de solubilizar toda la proteína. De esta manera, al final se obtuvieron 7 muestras distintas de la proteína: una muestra proveniente del **pico 1**, dializado en Tris-Dextrosa, y 6 muestras del **pico 2**, 3 de ellas correspondientes a las fases solubles de las diálisis con 500 mM Tris-NaCl (solución a 1020.9 µg/ml de proteína), Tris-Dextrosa (solución a 100 µg/ml de proteína) y HBS (solución a 92.3 µg/ml de proteína), y 3 de ellas correspondientes a las solubilizaciones de los precipitados en las diálisis con 1 M Tris-NaCl (soluciones a 1916.9, 3049.5 y 2127.6 ug/ml).

Tabla R-04: Productos finales de la diálisis de las fracciones de proteína R9-GFP-H6 obtenidos por HPLC. SN, sobrenadante.

Muestra	Producto de diálisis	Código	Conc. (ug/ml)
PICO 1	SN del dializado con Tris-Dextrosa	1-TD	685,5
PICO 2	SN del dializado con Tris-NaCl 500 mM	2-TN	1020,9
	Pellet del dializado con Tris-NaCl 500mM, resuspendido en Tris-NaCl 1M	2-P.TN-TN	1916,9
	SN del dializado con Tris-Dextrosa	2-TD	100
	Pellet del dializado con Tris-Dextrosa, resuspendido en Tris-NaCl 1M	2-P.TD-TN	3049,5
	SN del dializado con HBS	2-HBS	92,3
	Pellet del dializado con HBS, resuspendido en Tris-NaCl 1M	2-P.HBS-TN	2127,6

R3.2.2. Estudios de unión a ADN plasmídico

Los distintos productos obtenidos de la diálisis fueron mezclados con 500 ng de ADN plasmídico a distintos ratios proteína-ADN (1:1, 10:1 y 40:1; ng proteína:ng ADN). Las mezclas fueron incubadas en tubos de microcentrífuga a temperatura ambiente durante 1 h y seguidamente se analizó la formación de complejos mediante electroforesis en gel de agarosa (figura R-36). Debido a su baja concentración, las muestras provenientes de las fases solubles recuperadas de la diálisis con Tris-Dextrosa y HBS de la proteína del **pico 2** no fueron utilizadas en este ensayo, sólo las muestras resolubilizadas en 1 M Tris-NaCl.

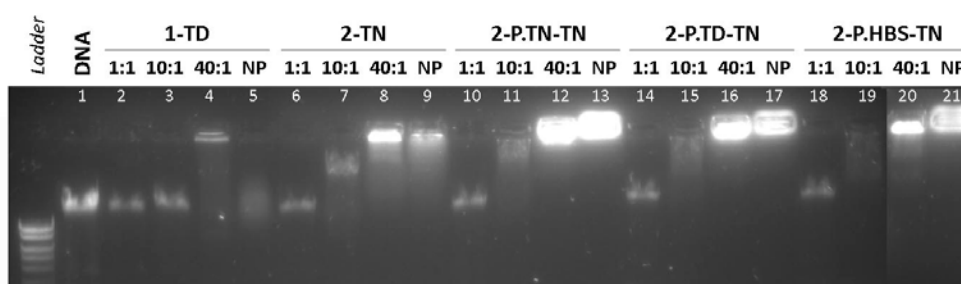


Figura R-36: Eficiencia de unión de las distintas muestras de nanopartícula R9-GFP-H6 y ADN a distintos ratios NP/ADN. Visualización por electroforesis en gel de agarosa. El ADN usado fue un plásmido circular de unos 8.000 pb. 1:1, 10:1 y 40:1 se refiere a los distintos ratios NP:ADN ($\mu\text{g}:\mu\text{g}$) probados. NP, nanopartícula; 1-TD, muestra proveniente del pico 1, dializada con solución de Tris-Dextrosa; 2-TN, muestra proveniente del pico 2 dializada con solución de 0.5 M Tris-NaCl; 2-P.TN-TN, muestra proveniente del pico 2 dializada con 0.5 M Tris-NaCl precipitada y resuspendida en 1 M Tris-NaCl; 2-P.TD-TN, muestra proveniente del pico 2 dializada con Tris-Dextrosa, precipitada y resuspendida en 1 M Tris-NaCl; 2-P.HBS-TN, muestra proveniente del pico 2 dializada con buffer HBS, precipitada y resuspendida en buffer 1 M Tris-NaCl.

En todos los casos, el gel de agarosa mostró un retardo total en la migración del ADN bajo el pulso electroforético sólo cuando éste fue mezclado a ratio 40:1 con las proteínas. Las mezclas a ratio 1:1 no produjeron a penas ningún retardo en el plásmido y sólo parcialmente a ratio 10:1.

El gel de agarosa también mostró una elevada quimioluminiscencia de la proteína sin unir a plásmido, observada en los carriles 9, 13, 17 y 21. Este hecho fue indicativo de una gran cantidad de ADN exógeno unido a las nanopartículas, probablemente procedente de las bacterias donde se realizó la producción, que quedó libre en el proceso de lisis y pudo adherirse a las proteínas y ser arrastrado por ellas durante todo el proceso de purificación.

Este ADN exógeno podría ser también el causante de la baja eficiencia de unión de plásmido por parte de las proteínas.

R3.2.3. Estudios de transfección *in vitro*

Los complejos proteína-ADN fueron testados en cultivos de la línea celular ARPE-19 para probar su habilidad de transfección y promoción de la expresión de un gen reportero, en este caso el tdTomato. Se usó el plásmido mc.tdTomato, generado en los anteriores experimentos de clonación, que contiene el gen *tdTomato* bajo el promotor vírico CMV.

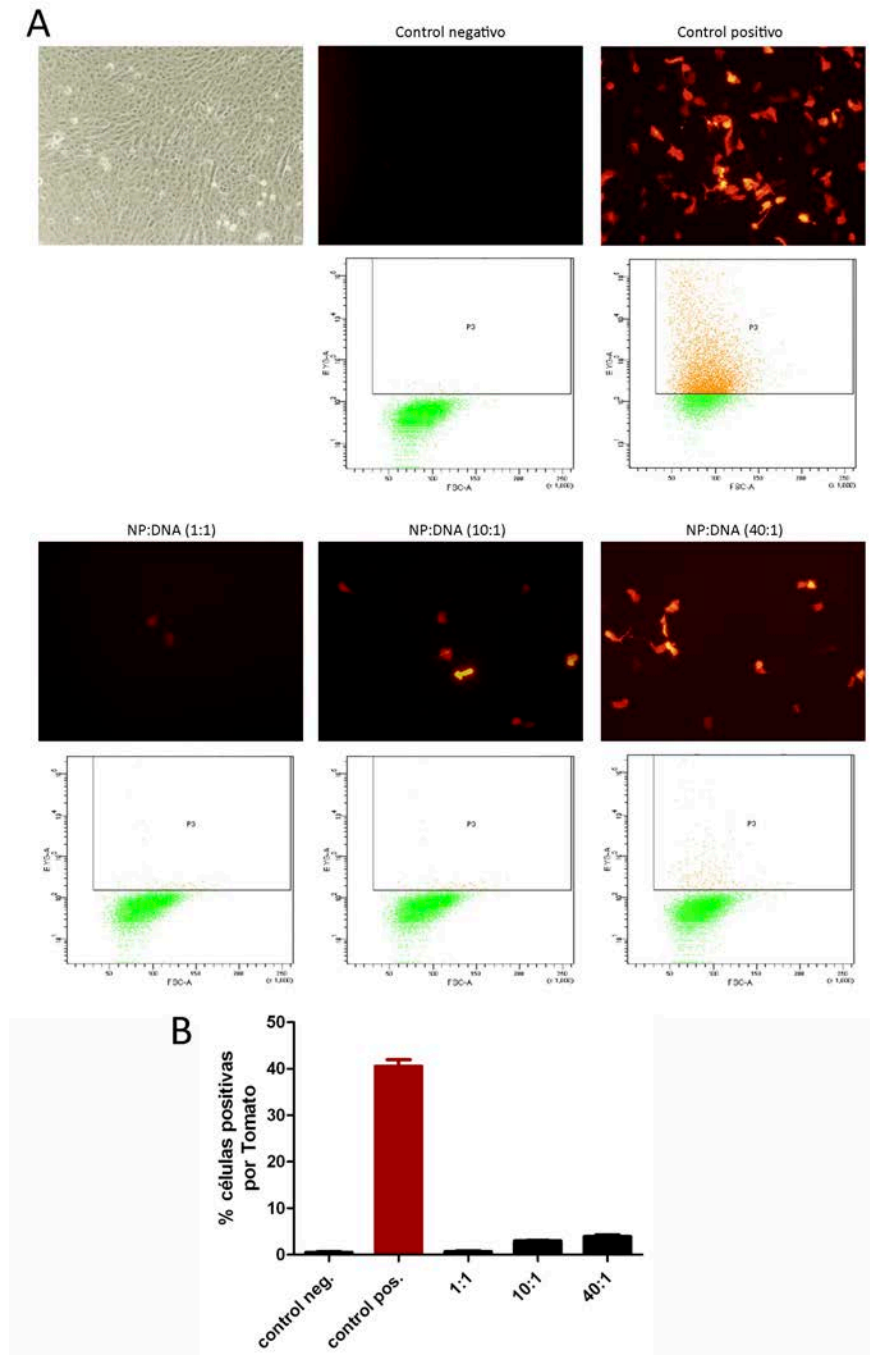


Figura R-37: Eficiencia de transfección *in vitro* de los complejos R9-GFP-H6/ADN en cultivos de ARPE-19. Las células ARPE-19 fueron incubadas con distintas formulaciones NP:ADN y la eficiencia de transfección fue cuantificada por citometría de flujo. (A) imágenes de microscopía de fluorescencia y gráficos de puntos de citometría de flujo de las células control negativo (sin transfectar), control positivo (transfectado con X-Treme®) y transfecciones con las distintas formulaciones NP:ADN a ratios 1:1, 10:1 y 40:1. (B) gráfica de barras de porcentaje de células positivas por tdTomato (media de 3 experimentos \pm SD).

Las células transfectadas con X-Treme® (control positivo) o con proteína-ADN a ratios 1:1, 10:1 y 40:1 fueron observadas bajo microscopio de fluorescencia 24 h post-transfección y analizadas mediante citometría de flujo para cuantificar el porcentaje de células positivas por tdTomato en cada caso (figura R-37). Los análisis revelaron que, aunque aparecieron células rojas en la transfección con los complejos en las tres formulaciones, las eficiencias de transfección fueron bastante bajas comparadas con el control positivo, consiguiendo un máximo del 4% de las células transfectadas en la formulación 40:1 (figura R-37B). Se demostró, por tanto, una mala capacidad de estas nanopartículas de actuar como vehículo para terapia génica en estas condiciones específicas de cultivo *in vitro*.

R3.2.4. Estudios de transfección *in vivo*

Finalmente se decidió por testar la eficiencia de transfección *in vivo* de los complejos R9-GFP-H6-ADN a ratio 40:1. Sólo en 3 ojos de 8 inyectados correctamente con NP+tdTomato (37.5% de los casos) mostraron una cierta transfección exclusivamente en la capa de células del EPR, visualizado como fluorescencia roja debida a la expresión de tdTomato en las preparaciones en *flat-mount* (figura R-38A) así como en las imágenes de criosecciones de retina (figura R-38B).

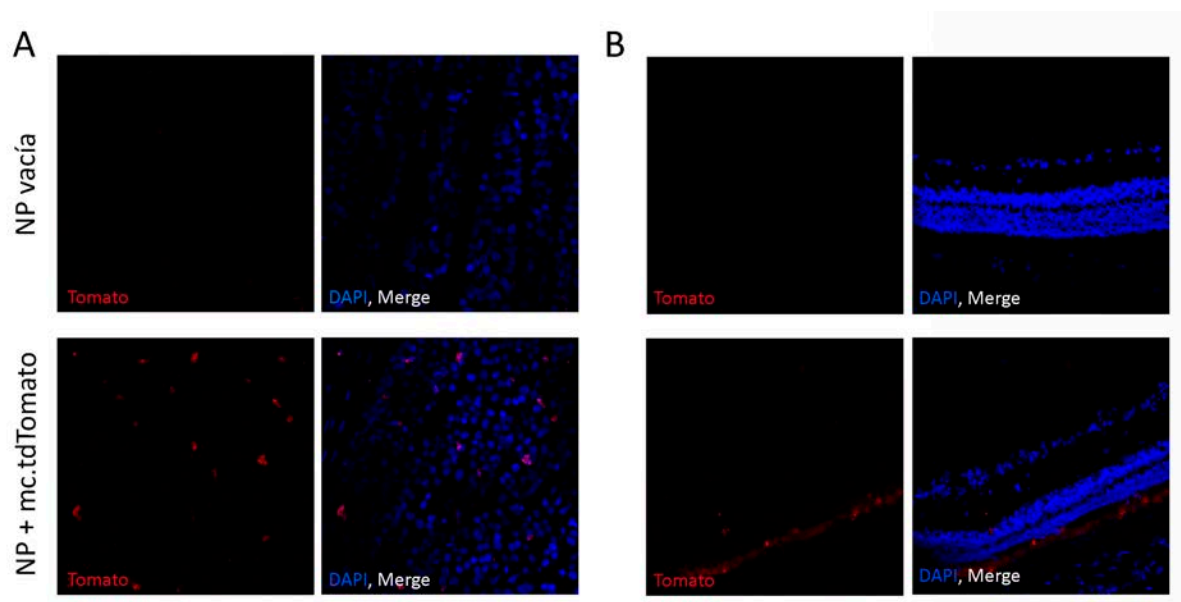


Figura R-38: Expresión génica *in vivo* de tdTomato después de inyección sub-retiniana de nanopartícula R9-GFP-H6 vacía (NP vacía) o políplexos R9-GFP-H6/ADN con el plásmido mc.tdTomato (NP + mc.tdTomato) a ratio 40:1 en rata. (A) imágenes de microscopía confocal de polo posterior de rata montado en *flat mount*, enfocado en el EPR. (B) imágenes de microscopía confocal de criosecciones de retina de rata. Expresión nativa de tdTomato con tinción DAPI de los núcleos.

Esta expresión sólo se detectó en la zona adyacente al sitio de inyección, en una cantidad muy reducida de células, indicando nuevamente una baja eficiencia de transfección de estos complejos NP+ADN bajo estas condiciones experimentales.

R3.2.5. Estudio de los quitosanos NOVAFACT O15 como sistemas de transferencia génica no viral en retina

Debido a los malos resultados obtenidos en los experimentos de transfección con R9-GFP-H6 se decidió de barajar otros sistemas de transferencia génica no viral.

Los quitosanos, políplexos compuestos de cadenas lineares de β -(1-4) D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, son compuestos biodegradables de muy baja toxicidad que han sido ampliamente estudiados como vehículos de terapia génica por su capacidad de compactar ADN mediante interacciones electroestáticas. Estos polímeros pueden variar mucho según su peso molecular y su grado de deacetilación, características que influyen en su efectividad como vectores no virales (Klausner *et al.*, 2012). En esta parte de mi tesis se estudió la capacidad de transfección de los oligoquitosanos ultrapuros NOVAFACT O15 (Novamatrix®, FMC Corp. Sandvika, Noruega) como vectores de terapia génica no viral para retina.

R3.2.6. Caracterización de los complejos quitosano-ADN

Tabla R-05: Formulaciones de políplexos quitosano/ADN a diferentes ratios de carga N/P.

	Ratio de carga N/P				
	1:1 (µl)	5:1 (µl)	10:1 (µl)	20:1 (µl)	30:1 (µl)
Plásmido (0,5 mg/ml)	2.64	2.64	2.64	2.64	2.64
NOVAFACT O15 (2 mg/ml)	0.45	2.21	4.42	8.84	13.3
Agua ultrapura	496.91	495.15	492.94	488.52	484.06
Volumen total	500	500	500	500	500

Existen publicaciones anteriores que demuestran la capacidad de los quitosanos Novafect O15 de compactar plásmidos de ADN (Klausner *et al.*, 2010; Puras *et al.*, 2013). Estos complejos, aunque suelen ser bastante estables, es necesario de prepararlos frescos en cada experimento por tal de obtener resultados reproducibles. Se prepararon políplexos quitosano/ADN usando 13.2 µg/ml de plásmido mc.tdTomato y distintas cantidades de quitosano según el ratio de carga (ratio N/P) (tabla R-05), siguiendo las instrucciones del fabricante. El estudio de la capacidad de unión a nuestro ADN plasmídico se realizó mediante ensayo de retardo en gel de agarosa (figura R-39). El carril 1 corresponde al plásmido “libre” sin quitosano, y por tanto muestra su patrón electroforético normal.

Los carriles 3-7 corresponden a los poliplexos en distintos ratios N/P. Se observó como a medida que el ratio N/P iba aumentando, el patrón electroforético del ADN plasmídico iba cambiando, retardando su migración a través del gel y finalmente, en los ratios más elevados (10:1, 20:1 y 30:1), quedaba completamente secuestrado, indicio de que todo el ADN era acomplejado en nanopartículas con los quitosanos.

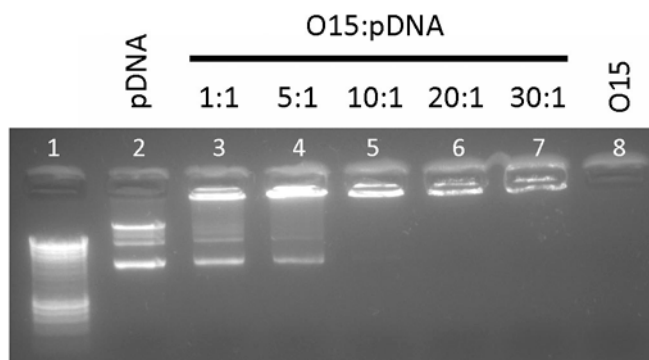


Figura R-39: Eficiencia de unión entre quitosano O15 y ADN plasmídico a diferentes ratios N/P. Electroforesis en gel de agarosa de los distintos complejos. El carril 2 corresponde al ADN plasmídico (pDNA) libre, los carriles 3-7 corresponden a los poliplexos quitosano:ADN (O15:pDNA) de menor a mayor ratio de carga y el carril 8 corresponde al quitosano sin ADN.

R3.2.7. Estudios de transfección *in vitro*

Previamente al testado de la capacidad de transfección *in vivo* de los poliplexos quitosano/ADN en retina de rata, se estudió la influencia del ratio N/P y el pH en la eficiencia de transfección en cultivos de ARPE-19. En estos estudios se usaron sólo los ratios N/P que habían mostrado una efectividad total de formar poliplexos en el ensayo de retardo en gel de agarosa (ratios 10:1, 20:1 y 30:1).

Como se observa en la figura R-40, los niveles de transfección en ARPE-19 fueron muy bajos en todas las condiciones, comparado con el control positivo. En todos los ratios N/P testados, la eficiencia de transfección fue mayor a pH 7.1 que a pH 7.4, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La máxima expresión de tdTomato se observó a ratio 10:1, pH 7.1 (4.5% de las células). Sin embargo, las células mostraron un aspecto sano, no se detectó un incremento en la muerte celular y se consideró que los quitosanos no provocaban toxicidad.

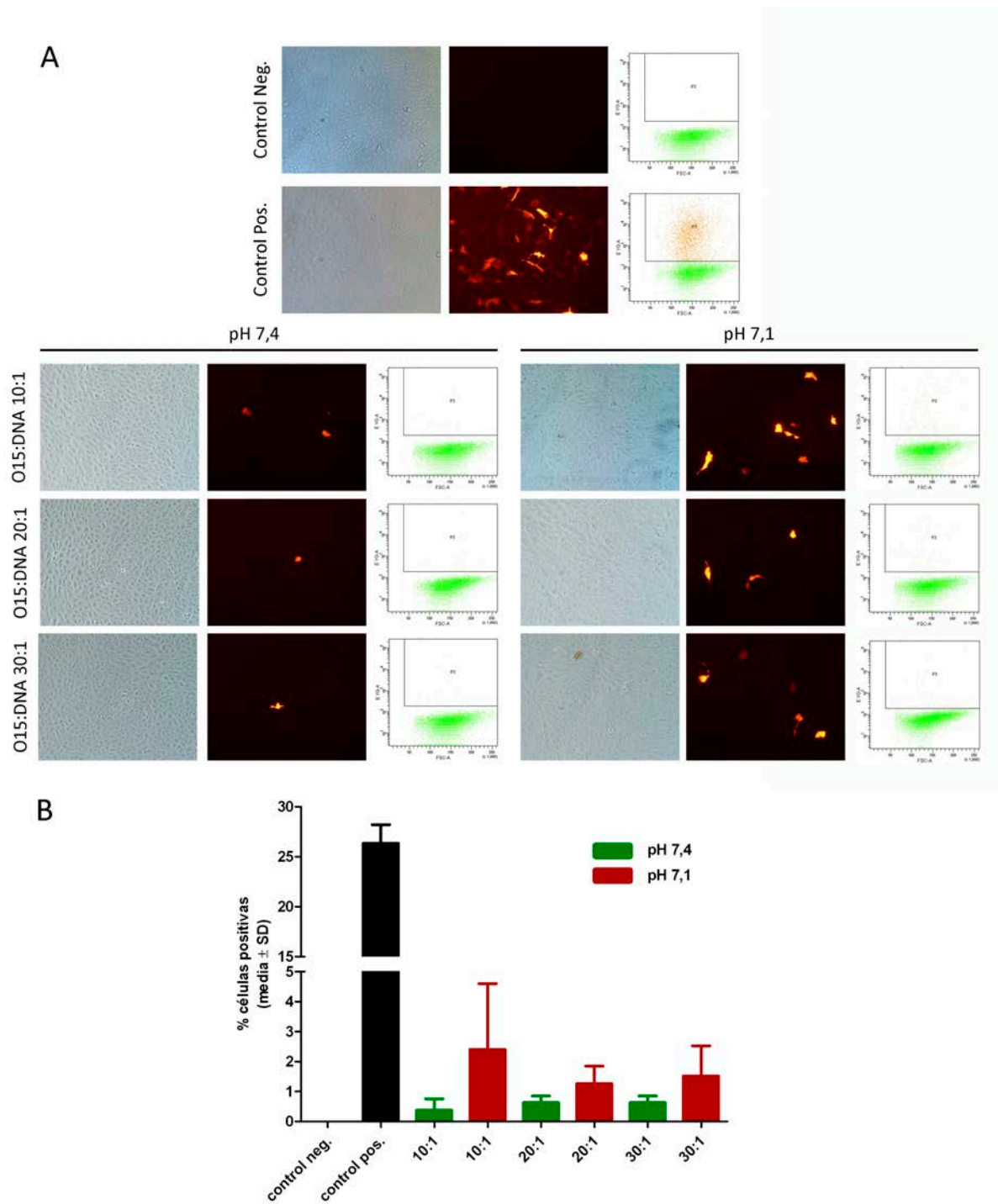


Figura R-40: Eficiencia de transfección de los poliplexos quitosano/ADN en células ARPE-19. (A) Imágenes de contraste de fase, imágenes de fluorescencia y gráfica de puntos de citometría de células ARPE-19 control (Control Neg.), transfectadas con X-Treme® (Control Pos.) o con poliplexos quitosano/ADN a ratios de carga 10:1, 20:1 y 30:1 en medio a pH 7,4 o 7,1. Las imágenes fueron adquiridas 24 horas post-transfección. (B) Cuantificación de las células positivas por tdTomato bajo transfección con Lipofectamina 2000TM o distintos ratios de quitosano a pH 7.4 o 7.1. (media \pm SD, n=3).

R3.2.8. Estudios de transfección *in vivo*

Siguiendo los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro*, se tomó el ratio N/P de 10:1 para el testado de la eficiencia de transfección *in vivo* en ojos de rata mediante inyección sub-retiniana. Se inyectaron 5 ojos con pliplexos O15:pcDNAhrGFP en medio a pH 7.1 y 4 ojos con medio sin pliplexos como controles.

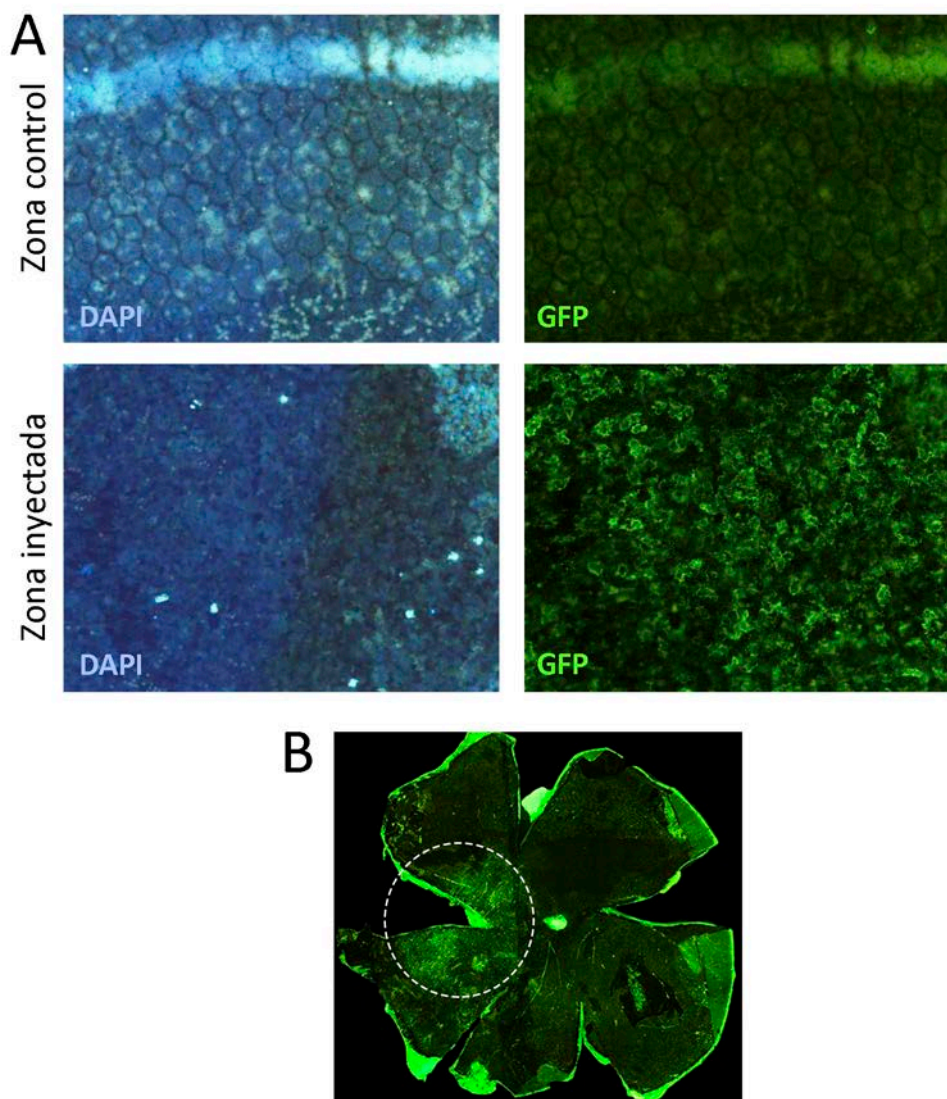


Figura R-41: Expresión génica *in vivo* de hrGFP después de inyección sub-retiniana de poliplexo quitosano O15/ADN en ojo de rata. Se inyectaron 2 μ l de poliplexos con el plásmido mc.hrGFP, a ratio N/P de 10:1, en el espacio sub-retiniano. (A) imágenes de fluorescencia de *flat-mounts* de polo posterior enfocado en el EPR, de una zona no inyectada y una zona inyectada con los poliplexos. Los núcleos se marcaron con DAPI y se realizó inmunofluorescencia con anticuerpo anti-GFP para detectar la expresión producida por la transfección. (B) Imagen de una preparación en *flat-mount* entera señalando la zona de inyección donde se encontraron células positivas por GFP.

A los 5 días post-inyección, los ojos fueron diseccionados y montados en *flat-mounts* para la realización de inmunofluorescencia anti-GFP. La expresión de GFP fue evaluada mediante

visualización de la fluorescencia verde en las zonas de inyección y en zonas control (alejadas del punto de inyección) (figura R-41). Se observó una fluorescencia aparentemente específica en 3 de los 5 ojos transfectados con O15:ADN, en las zonas adyacentes al punto de inyección (figura R-41B). Esta señal no apareció en ninguno de los ojos inyectados con medio ni tampoco en las zonas de la retina alejadas del punto de inyección. Sin embargo, las células fluorescentes observadas en las zonas transfectadas tenían una morfología un tanto distinta a la típica morfología del epitelio pigmentado de la retina, observada en las zonas control (figura R-41A). Este resultado, sorprendentemente positivo si nos guiamos por los datos obtenidos en la fase *in vitro*, nos hizo sospechar de la presencia de otro tipo celular debido a la alteración de las capas de la retina producida por la inyección, o de una posible toxicidad de los poliplexos, aunque estas cuestiones aún quedan por dilucidar.

DISCUSIÓN

La retinopatía diabética (RD) y la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) son dos de las degeneraciones retinianas más prevalentes en los países industrializados, siendo las principales causas de pérdida de visión en adultos de edad avanzada. Las dos patologías, que tienen orígenes distintos y mecanismos moleculares complejos, se caracterizan por una neurodegeneración progresiva con presencia de apoptosis en la retina, activación glial y estrés oxidativo, y la aparición de neovascularización en sus fases más avanzadas. El PEDF y la SST son dos factores expresados de forma natural en el ojo que han sido ampliamente investigados por sus potenciales acciones anti-angiogénicas y neuroprotectoras y por tanto han sido considerados por muchos autores como dos potenciales agentes terapéuticos para el tratamiento de la RD y la DMAE.

Este trabajo se ha centrado en el estudio de nuevas estrategias de terapia génica no viral para la sobre-expresión de PEDF y SST en el tratamiento de la RP y la DMAE. Para ello, se han desarrollado modelos *in vitro* para el estudio de las acciones anti-angiogénicas del PEDF y la SST; se han generado y caracterizado dos modelos animales, uno de diabetes tipo I con alteración retiniana parecida a la RD y uno de NVC mimetizando la neovascularización presente en la DMAE exudativa. También se ha puesto a punto la técnica de inyección sub-retiniana en rata y ratón para la administración de compuestos de terapia génica y se ha corroborado la capacidad de transfección de las células del epitelio pigmentado. De cara a la terapia génica no viral, se han realizado experimentos de clonación para la obtención de vectores plasmídicos optimizados de expresión de SST y PEDF, se ha estudiado su capacidad de expresión en cultivos celulares y finalmente se han realizado estudios de eficacia de transfección *in vitro* e *in vivo* con dos sistemas de terapia génica no viral basados en nanopartículas proteicas y quitosanos.

D1. EL FACTOR DERIVADO DE EPITELIO PIGMENTADO (PEDF) Y LA SOMATOSTATINA (SST) COMO CANDIDATOS PARA TERAPIA GÉNICA EN RD Y DMAE

El factor derivado del epitelio pigmentado (PEDF) es la molécula anti-angiogénica más potente conocida (Dawson *et al.*, 1999). La acción del PEDF en el tejido ocular y sus patrones de expresión relacionados con la expresión de VEGF han sido ampliamente estudiados, revelando la acción contrapuesta de estos dos factores en un balance de estímulos que controla el desarrollo de la neovascularización (Sparger *et al.*, 2001). Varios estudios publicados han demostrado la acción anti-angiogénica y neuroprotectora del PEDF tanto en modelos *in vitro* como en modelos animales (Duh *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 1999; Amano *et al.*, 2005). El estudio publicado por Elayappan *et al.* muestra como el tratamiento de células endoteliales de retina con 10 nM de PEDF

inhibió la viabilidad inducida por VEGF a través de la inhibición de la señalización PI3K/Akt, indujo la apoptosis mediante activación de caspasa-3 e inhibió la migración inducida por VEGF (Elayappan, *et al.*, 2009). Cai, *et al.* también reportan una reducción significativa de la proliferación endotelial inducida por VEGF al tratar los cultivos con 100 ng/ml (2.3 nM) PEDF así como un efecto inhibitorio significativo en la migración y la formación de estructuras tubulares (Cai, *et al.*, 2006). En nuestros experimentos estudiamos el efecto del PEDF a distintas concentraciones sobre la acción angiogénica inducida por VEGF en células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC). Nuestros resultados han demostrado, en concordancia con los datos previos, un efecto inhibitorio del PEDF a concentración 10 nM en la migración de células HUVEC inducida con VEGF, así como la proliferación de estas células inducida con VEGF. Además, el PEDF también fue capaz de inhibir la formación de estructuras tubulares en co-cultivo de endoteliales y fibroblastos inducido con un cóctel de factores de crecimiento. En conclusión, se corroboró la potente acción anti-angiogénica del PEDF y se instauraron en el laboratorio las técnicas necesarias para demostrarlo.

La somatostatina (SST) es un péptido con un amplio espectro de acciones inhibitorias, principalmente en el sistema nervioso central, pero también en otros tejidos como el tracto digestivo (Reichin, 1983). En el ojo, se ha demostrado que la SST es una de las moléculas neuroprotectoras más importantes sintetizadas por la retina (Cervia *et al.*, 2007). La acción anti-angiogénica de la SST ha sido estudiada sobre todo en modelos de células tumorales, usando análogos de SST con afinidad específica por los distintos receptores (Woltering, 2003; Danesi y Del Tacca, 1996). En células endoteliales, se ha visto que los análogos de SST ejercen su actividad anti-angiogénica a través de la inhibición directa de la proliferación celular y/o mecanismos indirectos afectando a la acción de determinados factores de crecimiento (Lawnicka *et al.*, 2002; Dasgupta, 2004; Dal Monte *et al.*, 2011). En particular, en células endoteliales de microvasculatura humana, análogos de SST con alta afinidad por el receptor *sst1* han demostrado que interfieren con la producción de VEGF y su receptor VEGFR-2 (Bocci, *et al.* 2007). En cuanto al efecto anti-angiogénico de la SST en ojo, también se han realizado varios trabajos usando modelos animales *knock-out* por *sst1* o *sst2*, donde se ha determinado la función clave del receptor *sst2* en el control de la angiogénesis ocular (Dal Monte *et al.*, 2007; Cervia *et al.*, 2012). Los resultados de nuestros estudios *in vitro* muestran como la somatostatina-14 nativa a concentración 100 μ M inhibe la proliferación y la migración de células endoteliales inducida por VEGF así como la formación de estructuras tubulares, aportando nuevas evidencias a la acción anti-angiogénica de este péptido.

En general, los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* sirvieron para corroborar el potencial anti-angiogénico de los péptidos PEDF y SST. Estos dos factores, que se secretan de forma natural por las células del EPR y ejercen sus funciones de forma paracrina en las células de la retina (Simó *et al.*, 2010), se ha demostrado que se encuentran disminuidos en pacientes con RD (Ogata *et al.*, 2002;

Hernández *et al.*, 2005; Simó *et al.*, 2007) y, sólo en el caso del PEDF, también en pacientes con DMAE exudativa (Holekamp *et al.*, 2002). Estos datos, junto con las evidencias de la acción anti-angiogénica y neuroprotectora del PEDF y la SST (Tombran-Tink & Barnstable, 2003; Zhu & Zou, 2012; Dal Monte *et al.*, 2012; Carrasco & Miralles, 2007), nos indujeron a plantearnos el desarrollo de una estrategia de terapia génica para el tratamiento de la RD y la DMAE mediante la sobre-expresión de estos factores en retina.

D2. EL MODELO DE DIABETES TIPO I INDUCIDO CON STZ EN RATA COMO MODELO DE RD

La diabetes inducida con estreptozotocina (STZ) es un modelo experimental pre-clínico usado comúnmente. El modelo de rata tratada con STZ mimetiza la patología humana induciendo la hiperglicemia mediante la destrucción de las células beta del páncreas (Schnedl *et al.*, 1994), pero aunque se han descrito cambios vasculares en este modelo muy parecidos a los que se dan en humanos, la vasculopatía no progresa a neovascularización. Los eventos patológicos en la vasculatura de la retina descritos en este modelo van desde pérdida de pericitos, fuga vascular, rotura de la barrera hemato-retiniana, pérdida de células ganglionares, daño en las células endoteliales, oclusión vascular y engrosamiento de la membrana basal (Robinson, *et al.*, 2012). También se ha descrito una respuesta inflamatoria de la retina dependiendo de la cepa de rata usada (Adamis y Berman, 2008), así como alteraciones en la función visual (Kohzaki, *et al.*, 2008).

En el desarrollo de esta tesis doctoral se decidió usar ratas de la cepa Long Evans para crear este modelo de retinopatía diabética, siguiendo lo que otros autores habían descrito en la literatura. Esta cepa es pigmentada y por tanto permite la correcta visualización de la vasculatura retiniana mediante angiografía fluoresceínica, al contrario de las cepas albinas, como Sprague Dawley o Wistar, donde la ausencia de pigmentación provoca que se confundan los vasos de la coroides con los vasos de la retina cuando, en presencia de fluoresceína, son visualizados por retinografía bajo filtro verde. En nuestro caso, el modelo de diabetes fue creado correctamente mediante inducción con una sola inyección intra-peritoneal de STZ (65 mg/kg) que causó una desregulación en los niveles de glucosa en sangre de las ratas, mostrando valores por encima de 300 mg/dl a partir de 48 h post-tratamiento y durante todo el tiempo de estudio. Esta incapacidad de absorción de la glucosa por parte de los animales provocó una pérdida de peso generalizada en todo el grupo de estudio. Estos animales, definidos como diabéticos de tipo I debido a su incapacidad de segregar insulina, fueron evaluados oftalmológicamente para caracterizar el alcance de la patología ocular derivada de la diabetes.

La funcionalidad de la retina fue estudiada mediante electroretinograma (ERG). Las ondas *a* y *b* del electroretinograma escotópico se vieron alteradas, tanto en su tiempo de latencia, que se vio aumentado ya desde el primer mes post-inducción en los animales STZ comparado con los controles, como en su amplitud, que se vio reducida en fases más tardías, a partir de los 2 meses y siendo más evidente a los 3 meses. Las ondas *a* y *b* son indicadores de la funcionalidad de los fotorreceptores y la capa nuclear interna de la retina respectivamente. En concreto, se cree que la onda *b* viene determinada por la actividad de las células bipolares ON (Green y Kapousta-Bruneau, 1999; Karwoski y Xu, 1999) y con contribución de las células de Müller (Ripps y Witkovsky, 1985). Por tanto, la reducción en la amplitud de ambas ondas sugiere una alteración tanto en la capa de fotorreceptores como en la capa nuclear interna. Otro parámetro que se estudió fueron los potenciales oscilatorios (POs). Estas oscilaciones, que aparecen en la pendiente ascendente de la onda *b*, se cree que resultan de la actividad de las células amacrinas, como la retroalimentación entre las células amacrinas y bipolares y/o la comunicación entre amacrinas y células ganglionares (Wachtmeister, 1998). Las alteraciones en los POs fueron las más consistentes a nivel de función visual observadas en nuestro modelo, donde se observó un claro aumento en el tiempo implícito ya a 1 mes post-inducción y una disminución generalizada en las amplitudes de las distintas ondas, que se hizo más evidente a lo largo de los meses de estudio.

En sus inicios, el uso del ERG en pacientes no era capaz de detectar diferencias entre diabéticos y controles. Sin embargo, desde 1962, cuando la intensidad de luz usada para generar un ERG se incrementó, los potenciales oscilatorios fueron observados por primera vez y se descubrió una distorsión en estas ondas en los pacientes diabéticos. Desde principios de los años 60 se han realizado numerosos estudios que han mostrado que el tiempo y la amplitud de los POs están alterados en los diabéticos (Bresnick *et al.*, 1984; Juen y Kieselbach, 1990; Shirao y Kawasaki, 1998). El hallazgo más consistente es un retraso significativo en el tiempo de latencia del primer PO, llamado PO1. Esto también ha sido descrito en modelos animales de diabetes (Aung *et al.*, 2013). Es importante destacar que alrededor del 31% de los pacientes sin retinopatía clínicamente detectable (sin cambios vasculares detectables por oftalmoscopia o angiografía fluoresceínica) mostraron un retraso significativo en el PO1 (Simonsen, 1980). Estos hallazgos en pacientes concuerdan con nuestros resultados en el modelo inducido con STZ en rata, donde, aunque sí que se observaron cambios electroretinográficos, no se observó ninguna alteración angiopática mediante angiografía fluoresceínica.

En cambio, sí que se detectaron alteraciones morfológicas en los animales tratados con STZ comparado con los controles, viéndose un adelgazamiento en las capas internas de la retina (capa nuclear interna y capa interplexiforme interna) a 1, 2 y 3 meses post-inducción. Estos resultados concuerdan con las alteraciones electroretinográficas, respaldando la teoría de que se dan

alteraciones en la retina interna, probablemente en células bipolares y amacrin. Sin embargo, no se detectaron alteraciones en la capa de fotorreceptores. Existe una gran controversia en la literatura en cuanto a alteraciones en los grosores de las distintas capas de la retina en este modelo, habiendo autores que, como en nuestro caso, han reportado cambios morfológicos en las capas internas de la retina (Barber *et al.* 1998), otros sólo observan adelgazamiento en la capa de fotorreceptores (Park *et al.*, 2003), y finalmente autores que no reportan ningún cambio morfológico (Kirwin *et al.*, 2009). En nuestro caso, además, nos aparece una incongruencia en los resultados habiendo sido incapaces de detectar células apoptóticas en las retinas STZ mediante la técnica TUNEL, cuando se esperaría detectar un cierto incremento en la apoptosis en las capas internas de estas retinas. La muerte celular en estas capas, sin embargo, podría ser detectada por otras técnicas o por conteo de núcleos, obteniendo más información de estas alteraciones morfológicas. Sí que se detectó, sin embargo, un aumento en la inmunoreactividad por GFAP en las criosecciones de ojos STZ a 2 meses post-inducción, aunque esta sobre-expresión no se vio reflejada en los análisis cuantitativos de los niveles de ARNm. Kirwin *et al.* reportan resultados parecidos en niveles de GFAP analizados por qPCR, donde no observan ningún cambio a nivel de expresión génica a 1 y 3 meses de diabetes en ratas Long Evans inducidas con STZ (Kirwin *et al.*, 2011). Estos resultados podrían ser debidos a un patrón irregular de activación glial observado en los ojos STZ en nuestros experimentos, que podría estar enmascarando la sobre-expresión de GFAP a nivel de retina total.

Además de GFAP también se cuantificó la expresión de genes relacionados con inflamación y angiogénesis como son ICAM-1, VCAM-1, TNF- α y VEGF, así como los genes de PEDF y SST. ICAM-1 se vio sobre-expresado a 1 mes post-inducción con STZ pero no se detectó incremento en los niveles de mRNA ni a 2 ni a 3 meses. ICAM-1 es un importante mediador de la adhesión de neutrófilos y monocitos al endotelio vascular y se ha demostrado que se encuentra sobre-expresado en retinas de pacientes diabéticos (McLeod *et al.*, 1995). Miyamoto *et al.* describió una elevación en los niveles de ARNm de ICAM-1 en ratas diabéticas inducidas con STZ 7 días post-inducción y lo relacionó con el incremento de leucostasis y la permeabilidad vascular (Miyamoto *et al.*, 1999). Posteriormente, Yu *et al.* reportó un incremento en los niveles de proteína ICAM-1 en retinas de rata a 1, 3 y 6 meses post-inducción con STZ (Yu *et al.*, 2010). Sin embargo, estudios más recientes publicados por Mima *et al.* describen una sobre-expresión génica de ICAM-1 en ratas inducidas con STZ sólo a 4 meses post-inducción pero no antes. Estos resultados incongruentes presentados por varios autores dejan por determinar si ICAM-1 sufre una alteración verdadera en las retinas de las ratas inducidas con STZ.

Resultados parecidos se obtuvieron en el análisis de la expresión de VCAM-1, otro importante mediador de la adhesión de monocitos, linfocitos y otras células inmunitarias en los vasos sanguíneos, donde no se observó ninguna alteración en los niveles de ARNm de ojos STZ en comparación con controles. Contradictoriamente, otros autores sí que han reportado un aumento en

los niveles de esta proteína en este modelo animal (Thing-Fong *et al.*, 2016), aunque no hay muchos datos que respalden estos estudios.

El factor de necrosis tumoral (TNF- α), por otra parte, se vio inhibido a nivel de ARNm en las retinas de ratas STZ en todos los tiempos analizados, comparado con ratas control de la misma edad. El TNF- α es una citoquina pro-inflamatoria que actúa mediante interacciones ligando-receptor promoviendo varios procesos inflamatorios como la regulación positiva de la expresión de moléculas de adhesión, el reclutamiento leucocitario, la inducción de la apoptosis, la quimioatracción de monocitos y la amplificación de la respuesta inmune a través de la estimulación de varios factores de transcripción, factores de crecimiento y otros mediadores inflamatorios (Navarro *et al.*, 2006). Los datos de estudios pre-clínicos y clínicos han implicado este factor en el desarrollo de RD. Estudios clínicos han demostrado niveles elevados de TNF- α en membranas fibrovasculares oculares (Limb *et al.*, 1996), humor vítreo (Demircan *et al.*, 2006) y plasma (Ben-Mahmud *et al.*, 2004) de pacientes con RD, y datos parecidos se han publicado en estudios pre-clínicos usando el modelo de rata inducido con STZ, reportando una sobre-expresión tanto a nivel de ARNm como de proteína a 2 semanas, 1, 2 y 4 meses post inducción (Ibrahim *et al.*, 2010; Mima *et al.*, 2012; Tzeng *et al.*, 2016). Nuestros resultados se contradicen con estos datos publicados, poniendo en duda la reproductibilidad y fiabilidad de este modelo.

Esto se ve reforzado por los datos obtenidos del análisis de la expresión de VEGF, donde, una vez más, no hemos detectado diferencias de expresión en los animales STZ comparado con los controles. El VEGF es uno de los inductores de la angiogénesis más potentes y se ha demostrado que su expresión se ve alterada positivamente en ojos de pacientes diabéticos (Aiello *et al.*, 1994; Adamis *et al.*, 1994). En el modelo de diabetes inducido con STZ en rata, sin embargo, encontramos publicaciones con resultados distintos. Varios autores publican un rápido aumento en la expresión de VEGF a partir del séptimo día tras la inducción de la diabetes con STZ (Jousen *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2010). En cambio, otros autores no ven un aumento significativo en el VEGF hasta los 2 – 4 meses de diabetes (Mima *et al.*, 2012). En nuestros análisis se usaron oligonucleótidos que reconocen zonas comunes de las distintas isoformas de VEGF, hecho que no nos permitió identificar si había diferencias de expresión entre ellas. El análisis por separado de las distintas isoformas sería un punto a tener en cuenta en experimentos futuros, así como el análisis de la expresión de los receptores de VEGF, para poder dilucidar definitivamente si existe una alteración en los patrones de expresión de este factor.

En resumen, tomando todos los resultados de expresión génica obtenidos en conjunto, con una n de animales adecuada y con desviaciones similares a las publicadas, parece indicar que el modelo de retinopatía diabética generado en este trabajo no experimenta apenas ninguna alteración a nivel

inflamatorio. Esta conclusión se ve respaldada por el trabajo publicado por Kirwin *et al.*, que compara la respuesta inflamatoria a nivel de expresión génica y proteica en tres cepas distintas de rata inducidas con STZ y revela una gran diferencia de respuesta entre ellas, siendo la cepa Sprague Dawley la que reproduce una respuesta inflamatoria leve pero significativa. Sin embargo, ni la cepa Brown Norway ni la cepa Long Evans exhiben una respuesta inflamatoria, mostrando unos niveles de expresión de varios genes inflamatorios en animales tratados con STZ parecidos a los niveles de los animales control (Kirwin *et al.*, 2009). Sin embargo, cabría analizar en más profundidad la expresión de estos factores en este modelo, estudiando los niveles de proteínas.

Por tanto cabe concluir que, en nuestro caso, los experimentos de caracterización de la retinopatía diabética en ratas Long Evans tratadas con STZ, a lo largo de 3 meses post-inducción, han demostrado una alteración significativa a nivel de función visual, una alteración en la estructura histológica de las retinas, una leve activación glial pero la inexistencia de respuesta inflamatoria en la retina de los animales diabéticos. Por tanto, la evaluación de una terapia génica en este modelo sólo se podría enfocar a la evaluación de la recuperación de la función visual y las alteraciones histológicas, pero sería necesario usar ratas de otra cepa si se quisiera evaluar el efecto de la terapia sobre alteraciones inflamatorias o vasculares.

D3. EL MODELO DE NEOVASCULARIZACIÓN COROIDEA INDUCIDA CON LÁSER EN RATÓN COMO MODELO DE DMAE HÚMEDA

La degeneración macular asociada a la edad es una patología degenerativa de la retina muy compleja que involucra tanto factores genéticos como ambientales y afecta principalmente a la mácula, la zona altamente especializada de la retina encargada de la visión fina de los detalles (Lim *et al.*, 2012). Debido a estas características es muy complicado de obtener un modelo animal que mimetice completamente la patología, ya que la mayoría de especies usadas en experimentación, exceptuando los primates, no tienen mácula.

Sin embargo, existen varios modelos que recrean uno o varios acontecimientos patológicos presentes en DMAE, ya sea en sus fases más tempranas o en sus fases más avanzadas de DMAE atrófica y DMAE neovascular (revisado por Pennesi *et al.*, 2012). De entre ellos, el modelo de neovascularización coroidea (NVC) inducido por láser en ratón como modelo de DMAE neovascular es uno de los más usados en el estudio de nuevas terapias anti-angiogénicas, debido a su fácil y reproducible creación y su rápida progresión (Grossniklaus *et al.*, 2010). Aunque ya se considera de rutina, el modelo de CNV inducida con láser requiere de un diseño y una implementación muy controlados. En el desarrollo de este modelo en nuestro laboratorio usamos varios experimentos

para optimizar la aplicación del láser, el marcaje de los neovasos, las técnicas de disección y fijación del tejido ocular y la metodología de medición de las áreas neovasculares, así como los criterios de exclusión. Consideramos que, para poder ser usado en la evaluación de una terapia anti-angiogénica, un punto muy importante es el establecimiento de los criterios de exclusión de lesiones. Cuando aparecieron hemorragias intra-vítreas o sub-retinianas se consideró que la lesión no se había realizado correctamente y, dependiendo del grado de envergadura de la hemorragia se decidía de excluir del estudio sólo la lesión en concreto o todo el ojo, en concordancia con los parámetros establecidos por Gong *et al.* (Gong *et al.* 2015).

El análisis del tamaño de las lesiones se realizó mediante dos técnicas: la angiografía fluoresceínica (AF) y la inmunofluorescencia en *flat-mounts*. La primera, basada en la administración de un compuesto fluorescente que recorre el circuito venoso y posterior retinografía bajo filtro verde, es un procedimiento rápido y sencillo que permite analizar una gran cantidad de animales en poco tiempo y sin necesidad de eutanasia. Sin embargo, esta técnica puede introducir variabilidad en la medición real de la neovascularización debido a fenómenos de difusión del marcaje fluorescente que se da por las fugas vasculares y a la dificultad de protocolizar la toma de imágenes debido a las diferencias de captación y circulación del compuesto fluorescente entre los animales. Por otro lado, la técnica de inmunofluorescencia por *flat-mount*, aunque es más laboriosa, requiere de la eutanasia de los animales y se tarda más tiempo en obtener los resultados, permite un marcaje más fiable de la neovascularización y por tanto una medición más precisa de las lesiones. En nuestro caso usamos isolectina-B4, que marca vasos sanguíneos naïve, ramitas inmaduras de células endoteliales y microglia de apoyo asociado. Este hecho puede provocar la observación de tamaños de lesión ligeramente más grandes del real (Shah *et al.*, 2016). Otro factor a tener en cuenta es la cepa de ratón escogida. Poor *et al.* reportan diferencias significativas en cuanto a tamaños de lesión obtenidos y evolución de éstas dependiendo de si la cepa *wild-type* de ratón se adquiere en Charles River, Taconic o laboratorios Jackson (Poor *et al.*, 2014).

La evolución de las lesiones neovasculares en este modelo, según nuestras observaciones, se podría clasificar en 3 fases: una fase “temprana” durante los 3 primeros días post-láser, una fase “intermedia” de los 3 a los 5 días y una fase “final” del día 7 al 14. Durante la fase temprana de desarrollo de NVC, entre los días 1-3 post-láser, no se detectó presencia de neovascularización mediante AF ni en los análisis mediante OCT. En cambio, se detectó una fuerte respuesta inflamatoria debido al daño causado por el láser, observado en el análisis de expresión génica, donde se detectó un pico de expresión de los factores MCP-1, TNF- α y GFAP. Esta cascada inflamatoria producida por la lesión provocaría la liberación de metaloproteínas de matriz que degradarían la membrana basal de los vasos de la coroides (Carmeliet, 2000), induciendo a la formación de los neovasos. En esta fase también se ha descrito la presencia de microglía accesoria y el reclutamiento

de macrófagos, que contribuirían a la organización y expansión de los neovasos (Caicedo *et al.*, 2005; Checchin *et al.*, 2006). La activación glial en la zona de la lesión también se detectó a 3 días post-láser mediante inmunofluorescencia y, aunque no había presencia de neovascularización, sí que se detectó una acumulación de células endoteliales, correspondiéndose con la fase temprana de crecimiento angiogénico descrita en DMAE (Campa *et al.*, 2010). Durante la fase intermedia de desarrollo de NVC (4-5 días post-láser) se empezó a apreciar la aparición de flujo sanguíneo en las lesiones con exudados detectado por angiografía fluoresceínica. Esto se confirmó en los análisis mediante OCT, donde se aprecia una masa sub-retiniana en la zona lesionada junto con, en algunos casos, la aparición de fluido sub-retiniano. En este punto, la actividad inflamatoria ya había disminuido, observándose unos niveles normalizados de GFAP, MCP-1 y TNF- α . En este punto del proceso de angiogénesis, a nivel celular, las células endoteliales estarían extendiéndose hacia fuera formando los neovasos y estableciendo el lumen de estos, iniciándose la perfusión (Carmeliet, 2000). En los días posteriores, la red neovascular sigue creciendo hasta que alcanza su máximo tamaño que, en nuestro estudio, se dio a los 7 días post-láser. En esta fase final de desarrollo (días 7-14) se detectó una estabilización de las áreas neovasculares mediante AF, y se observó un incremento en la aparición de fluido sub-retiniano mediante OCT. En esta fase de desarrollo del modelo se cuantificaron el tamaño de lesiones y las alteraciones en la función visual, comparando a 7 y 14 días, para establecer el punto máximo de progreso de la patología. Los estudios de cuantificación de tamaño de lesiones *post mortem* mediante tinción con isolectina-B4 mostraron una regresión sustancial de las lesiones a 14 días comparado con 7 días. Este patrón se observó también en cuanto a alteraciones en la función visual de las áreas lesionadas analizadas mediante ERG focal, donde se registraron amplitudes de onda significativamente más reducidas a 7 días que a 14 días post-láser. La regresión en la lesiones se piensa que esta inducida en primer término por el EPR reactivo que envuelve la lesión de NVC y absorbe el fluido subretiniano acumulado proveniente de los vasos aberrantes (Miller *et al.*, 1986). Por otra parte, el EPR iniciaría una respuesta de cicatrización de la herida (por ejemplo, secretando PDGF, EGF o HGF) para controlar la NVC (Sugino *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2007). Otro posible mecanismo sería que las células del EPR envolvieran los vasos aberrantes en la lesión. Un estudio histopatológico mostró que células del EPR intactas pueden proliferar siguiendo un patrón papilar alrededor de la periferia de una lesión neovascular desde áreas no dañadas y crecer lentamente hacia el centro de la lesión, envolviendo los vasos anormales (Miller *et al.*, 1986). Además, otros investigadores han reportado una desaparición de la exudación en las áreas de NVC a 14 días post-láser (Shah *et al.*, 2016).

Finalmente, para estudiar con más en detalle el proceso de neovascularización en este modelo, se cuantificó la expresión de genes relacionados con angiogénesis, como son el VEGF (isoformas 120 y 165), PIGF y ICAM-1, en extractos de ARN total de polo posterior de ojos lesionados con láser, a 1, 2,

3 y 5 días post-lesión, comparándolo con ojos control (sin lesionar). Curiosamente, los resultados obtenidos no fueron los esperados. No se observó, como era de esperar, una sobreexpresión en ninguno de estos factores, sino al contrario, en el caso de las isoformas del VEGF y el PlGF se determinó una reducción progresiva en los niveles de expresión en los ojos lesionados, comparado con los controles, y en el caso de ICAM-1 no se observaron diferencias. Como apuntan varios trabajos publicados anteriormente, la formación de NVC es el resultado de un complejo balance entre influencias pro- y anti-angiogénicas que no se limita a la sobreexpresión aislada de VEGF (Rakic *et al.*, 2003; Bora *et al.*, 2005). Rakic *et al.* muestran como el VEGF cambia su patrón de expresión sólo en la zona lesionada, donde se experimenta una expresión diferencial de VEGF120 en detrimento de la expresión de las otras isoformas, pero este fenómeno no se experimenta ni en la retina neural ni en la coroides intacta. De forma parecida, reportan un aumento en la expresión de PlGF sólo en la zona de impacto del láser. Estos resultados van en concordancia con nuestras observaciones en las inmunofluorescencias en criosecciones donde visualizamos una expresión incrementada de VEGF sólo en las lesiones, co-localizando con las células endoteliales visualizadas con colágeno IV de las áreas neovasculares, pero no en el resto de la retina. Existen publicaciones, sin embargo, que sí que reportan un aumento generalizado de la expresión de VEGF en este modelo (Zhou *et al.*, 2005; Bora *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2012), junto con otros estudios que demuestran una inhibición de la neovascularización en este modelo mediante la administración de compuestos anti-VEGF (Saishin *et al.*, 2003; Reich *et al.*, 2003). Todos estos datos nos sugieren la necesidad de realizar más estudios para comprender definitivamente la importancia relativa de cada miembro de la familia VEGF en el desarrollo de la NVC, teniendo en cuenta que, aunque la expresión de VEGF probablemente es necesaria para el desarrollo de neovascularización, otros mecanismos proangiogénicos pueden estar involucrados en el proceso.

En conclusión, el trabajo realizado hasta la fecha en la generación y caracterización del modelo de NVC inducido con láser en ratón nos ha brindado una serie de parámetros cuantificables para ser usados en el estudio de terapias anti-angiogénicas, como son el tamaño de las lesiones, la función visual, la aparición de fluido sub-retiniano y la expresión de genes pro-inflamatorios, aunque más estudios deberían realizarse en la dilucidación de los mecanismos de angiogénesis en este modelo.

D4. ESTRATEGIAS DE TERAPIA GÉNICA NO VIRAL EN RETINA

El objetivo final de este proyecto ha sido el desarrollo de nuevas estrategias de terapia génica para la sobre-expresión del PEDF y la SST. Existen trabajos publicados anteriormente donde se prueban distintas estrategias de terapia génica para la expresión de PEDF en tejido ocular en modelos pre-

clínicos, la mayoría de ellas usando vectores virales, tanto para RD como para DMAE (Hurigot *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2010; Mori *et al.*, 2002a; Mori *et al.*, 2002b). Más aún, en 2006 se publicó el primer ensayo clínico en fase I con 28 pacientes con DMAE neovascular avanzada donde se probó la transferencia genética de PEDF mediante inyección intra-vítrea de un vector adenoasociado a distintas dosis y se reportaron mejoras en cuanto a tamaño de lesiones en las dosis más altas sin eventos adversos graves pero con inflamación intraocular moderada transitoria en algunos casos (Campochiaro *et al.*, 2006). Sin embargo, menos avances se han realizado en el campo de la terapia génica no viral. Por otro lado, en el caso de la SST no existen publicaciones previas donde se haya probado la sobre-expresión este péptido mediante ningún tipo de terapia génica en ojo.

A pesar de que los vectores virales han sido ampliamente utilizados como portadores de genes para el tratamiento de retinopatías (revisado por Buch *et al.*, 2008), las preocupaciones sobre su seguridad han suscitado el interés de la comunidad científica para invertir en las estrategias no virales de transferencia génica. Sin embargo, el campo de la terapia génica no viral aún está en fases de estudio, requiriéndose un trabajo intensivo en la síntesis de nuevos vectores para mejorar su eficiencia y viabilidad de transfección.

D4.1. El vector plasmídico

El diseño del vector plasmídico es un punto clave en el desarrollo de un sistema eficiente de terapia génica no viral. Éste debe ser capaz de provocar una expresión suficientemente elevada del gen terapéutico, pero no tanto como para inducir toxicidad; el plásmido debe ser capaz de mantenerse estable en un estado episomal (sin integrarse en el genoma de las células huésped) y debe evitar los sistemas de silenciamiento intrínsecos de las células frente a ADN exógeno. Todas estas características pueden obtenerse mediante la manipulación de la secuencia genética del plásmido e introduciendo secuencias reguladoras específicas.

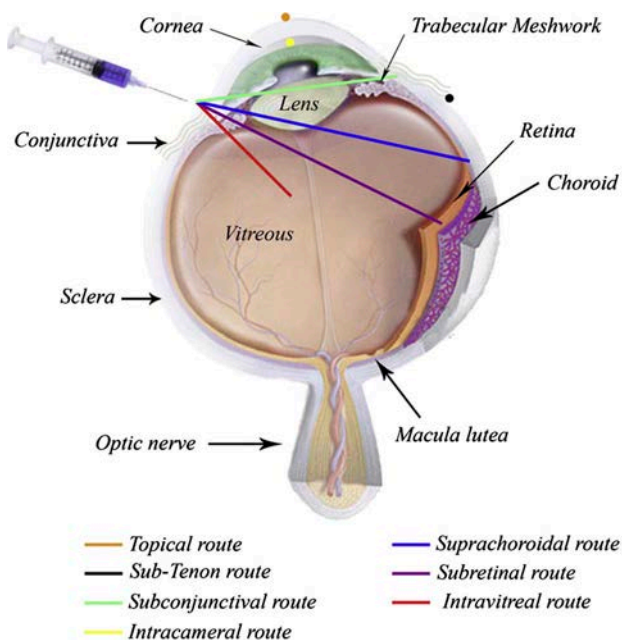
El diseño de nuestros vectores plasmídicos de expresión se basó, por una parte, en el uso de la tecnología de minicírculos (Kay *et al.*, 2010), mediante la cual se elimina todo el ADN de origen bacteriano del plásmido. La secuencia bacteriana es necesaria para las etapas de producción de plásmido, pero es contraproducente en la transfección en células eucariotas, ya que puede contener secuencias que pueden provocar una baja eficiencia de expresión del transgén, como son las resistencias a antibióticos y la presencia de islas CpG (Valera *et al.*, 1994; Darquet *et al.*, 1997). Este tipo de plásmidos han sido usados por varios autores en ensayos de expresión *in vivo*, observando elevados niveles de expresión en piel, músculo, corazón e hígado (Chen *et al.*, 2003; Stenler *et al.*, 2009; Argyros *et al.*, 2011; Dietz *et al.*, 2013; Gracey Maniar *et al.*, 2013)

Por otra parte, se eligió la secuencia promotora del gen humano VMD-2 (promotor VMD2), que se expresa preferencialmente en el EPR, y al contrario que los promotores de origen vírico (CMV), no es tan susceptible a silenciamiento ni provoca una sobre-expresión tan desmedida (Esumi *et al.*, 2004). Finalmente también se integró una secuencia S/MAR o región de unión a matriz (*scaffold/matrix attachment region*). Estas son unas secuencias endógenas ricas en A/T y aumentan la expresión del transgén facilitando el acceso de factores de transcripción a las regiones reguladoras, así como aportando estabilidad mitótica mediante la unión del ADN a la matriz nuclear de la células para su segregación (Argyros *et al.*, 2011). La integración de todas estas secuencias reguladoras en un vector minicírculo junto con los genes del PEDF y la SST producidos por vectores independientes de expresión. Estos plásmidos fueron testados en cultivos celulares de células de epitelio pigmentado de retina mediante experimentos de transfección y se comprobó su capacidad de expresión tanto de SST como de PEDF *in vitro*.

Figura D-01: Esquema de las diferentes rutas de administración ocular de vectores (Zou et al., 2014).

D4.2. Técnica de inyección sub-retiniana para la administración de la terapia génica

Existen distintas vías posibles de administración ocular de terapia génica, cada una de las cuales puede ser más o menos apropiada dependiendo de las células o el tejido diana y de las características del vector utilizado (figura D-01, extraída de Solinís *et al.*, 2014).



En nuestro caso, el objetivo es administrar compuestos de terapia génica (nanopartículas asociadas a vectores plasmídicos) para que estos sean captados por las células del epitelio pigmentado de la retina, ya que son células altamente fagocitarias, capaces de integrar distintos tipos de nanopartículas. Para poder llegar a estas células, la vía de administración más directa es la inyección

sub-retiniana. Esta es una técnica que precisa de un elevadísimo grado de práctica y material quirúrgico de alta precisión, más cuando se pretende aplicar a ojos de rata y ratón, que tienen el inconveniente del pequeño tamaño del globo ocular y el gran tamaño en proporción del cristalino, que ocupa prácticamente toda la cavidad vítrea.

Existen principalmente dos aproximaciones posibles para administrar un compuesto en el espacio sub-retiniano. Una de ellas es la aproximación anterior, que se basa en la punción de la córnea y la penetración en el globo ocular a través de la cápsula anterior, sorteando el iris y el cristalino hasta llegar a la retina. Esta técnica, descrita por Timmers *et al.*, implica varias complicaciones como traumas en córnea, iris y retina, y más importante, trauma en la lente que suele derivar en catarata (Timmers *et al.*, 2001). En nuestro estudio se optó por aplicar la segunda aproximación, por la cual el compuesto es administrado vía trans-escleral mediante esclerotomía (Dureau *et al.*, 2000). Esta técnica, en contrapunto a la aproximación anterior, ofrece menos probabilidades de causar catarata y no provoca alteraciones en ninguna estructura del polo anterior del ojo. Sin embargo, esta técnica presentó como desventaja la necesidad de introducir a ciegas la aguja de inyección, aproximación que inevitablemente aumenta la probabilidad de fallo en el acceso al espacio sub-retiniano. De un total de 26 ojos inyectados durante el desarrollo del modelo de administración sub-retiniana de terapia génica, sólo en el 61,5% de ellos se obtuvo una correcta inyección, observándose desprendimiento de retina con el fluido administrado acumulado en el espacio sub-retiniano, sin aparición de hemorragia o punción del cristalino. En el resto de ojos inyectados, o se provocó hemorragia por punción de un capilar de la retina o coroides, o no se generó desprendimiento de retina, indicativo de administración en el vítreo. Estos resultados reflejan la complejidad de la técnica y marcaron la necesidad de incrementar el número de animales utilizados en futuros experimentos.

Paralelamente a la optimización de la técnica de inyección sub-retiniana, también evaluamos los posibles efectos tóxicos derivados de la administración de un fluido exógeno en la retina de los animales. Aunque no se detectó apoptosis en ninguna capa de las retinas inyectadas con el vehículo (PBS), sí que se detectó activación glial, indicando estrés retiniano. Esta inmunoreactividad provocada por la inyección podría influir negativamente en la capacidad transfectiva de los sistemas de terapia génica (Prow *et al.*, 2008).

Para el correcto estudio de nuevos sistemas de terapia génica no viral, requeríamos de un control positivo de transfección, que nos asegurara que éramos capaces de llegar a las células del EPR e introducir un plásmido en su interior que se expresara correctamente. Con este fin, se realizó un experimento de transfección *in vivo* mediante inyección sub-retiniana de complejos con plásmido de expresión de la proteína fluorescente roja tdTomato y el compuesto comercial Lipofectamina 2000[®]. La Lipofectamina se ha utilizado anteriormente para transfectar células de EPR de ratón con unos

resultados positivos de expresión del transgén pero con afectación en la función visual y adelgazamiento de la capa nuclear externa (Kachi *et al.*, 2005). En nuestro caso, observamos expresión de tdTomato en casi todos los ojos inyectados, aunque los niveles de expresión fueron más bajos de lo esperado y muy localizados a la zona de inyección. Estos resultados, en conjunto con las observaciones de Kachi *et al.* y otros autores de una elevada toxicidad de la Lipofectamina®, desaconsejan la utilización de este vehículo para terapia génica *in vivo*. Curiosamente, hay autores que han reportado unos porcentajes de transfección sustanciales inyectando simplemente ADN desnudo sin ningún vehículo (Koirala *et al.*, 2011 y 2013). Varios autores han descrito, que el ADN desnudo posee una capacidad muy limitada de transfectar células de mamífero, con excepción de las células de músculo, si no es asistido por ningún método químico o físico (Andrieu-Soler *et al.*, 2006a,b). No obstante, decidimos hacer pruebas de transfección con el ADN desnudo, pero no se obtuvo ningún resultado positivo (datos no mostrados), confirmando lo que varios autores han reportado sobre la nula transfección de ADN plasmídico desnudo en tejido ocular (Dezawa *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2009a,b).

D4.3. Estudio de dos nanopartículas poliméricas como sistemas de transferencia no viral en retina

Cuando se pretende evaluar estrategias de terapia génica basadas en nanopartículas no virales (NPs), a menudo se empieza por una discusión comparando las NPs con los sistemas virales. Esto se debe en gran parte al éxito de los estudios de terapia génica de los vectores virales adenoasociados (AAV), como por ejemplo la primera aplicación clínica exitosa de la terapia génica con AAV en retina para el tratamiento de la amaurosis congénita de Leber en 2008 (Maguire *et al.*, 2008; Bainbridge *et al.*, 2008). Como resultado de esto, las terapias basadas en AAV se han convertido en el punto de referencia. Sin embargo, esta estrategia acarrea varios inconvenientes, como la limitada capacidad de carga genética (Wu *et al.*, 2010), los problemas de seguridad y el potencial de inserción mutagénica (Rosas *et al.*, 2012). En este sentido, las NPs aparecen como una alternativa mucho más segura y capaz de incorporar material genético de gran tamaño (Conley y Naash, 2010). En contrapunto, las eficiencias de transfección asociadas a estas nanopartículas siempre han sido muy bajas debido a su tendencia a quedarse atrapadas en los endosomas, mientras que los vectores virales, gracias a sus mecanismos intrínsecos especializados en el escape endosomal y el transporte del ADN hasta el núcleo, exhiben eficiencias de transfección mucho mayores. Sin embargo, los sistemas de NPs y ADN plasmídico también han avanzado significativamente en la pasada década para mejorar la eficacia de transfección, existiendo algunos estudios de prueba de concepto que

demuestran su efectividad en la vehiculización de genes en retina de ratón comparable a la de los sistemas AAV (Han *et al.*, 2012)

En los últimos años se han diseñado y probado nanopartículas de composición, carga y eficacia muy variadas para determinar su capacidad para administrar fármacos y genes a varias células (Zhou *et al.*, 2013; Adijanto y Naash, 2015; Mitra *et al.*, 2016). En nuestros estudios se ha optado por trabajar con nanopartículas poliméricas de distinta composición, por un lado las NPs proteicas R9-GFP-H6 y por otro lado las NPs de quitosano O15. El trabajo realizado en esta tesis doctoral se ha basado en la caracterización de la capacidad de unión de ADN de estas NPs y la realización de estudios de eficiencia de transfección *in vitro* e *in vivo*.

D4.3.1. Nanopartículas proteicas R9-GFP-H6 como sistemas de transferencia genética no viral en retina

Las nanopartículas proteicas R9-GFP-H6 (R9GFPH6-NPs), basadas en una proteína de fusión compuesta de proteína GFP unida a una cola de 6 histidinas y funcionalizada con un péptido de 9 argininas, había sido desarrollada anteriormente por el grupo del Dr. Villaverde (Universidad Autónoma de Barcelona, España). Esta proteína tiene la capacidad de auto-ensamblaje formando nanopartículas de 20 nm con forma de nanodiscos, que son capaces de unir y condensar ADN gracias a la interacción de éste con el péptido R9, y ser internalizadas eficientemente por las células (Vázquez *et al.*, 2010a,b). Las R9GFPH6-NPs se produjeron eficientemente en un único paso desde extractos crudos de bacterias productoras. Posteriormente, éstas fueron dializadas para la suspensión en búferes adecuados para su uso en experimentos de transfección y, contradiciendo los resultados publicados anteriormente (Vázquez *et al.*, 2010a), éstas sólo mostraron una solubilidad aceptable en buffer Tris-NaCl. Las R9GFPH6-NPs mostraron capacidad de unión de ADN pero los niveles de transfección obtenidos en cultivos celulares y en los experimento de transfección *in vivo* mediante inyección sub-retiniana en rata fueron muy bajos. La causa de esta baja eficiencia en la vehiculización del ADN plasmídico para su expresión en células en cultivo, si bien su capacidad de penetración en las células y tránsito hasta el núcleo ha sido demostrado anteriormente (Vázquez *et al.*, 2010b), parece ser debida a la carga de ADN bacteriano residual que arrastran las NPs desde su purificación, como se observó en el gel de agarosa, problema que también podría estar relacionado con su solubilidad. Sin embargo, más estudios deben realizarse en este sentido para identificar posibles problemas en los procedimientos de purificación. Uno de los posibles mecanismos para eliminar el ADN bacteriano residual podría ser el tratamiento de las NPs con DNasa y RNasa previamente al paso de purificación por FPLC, como describe Unzueta *et al.* en sus estudios, donde determina la presencia de ADN contaminante en los extractos de proteínas recombinantes producidas en E.coli y la mejora

en las capacidades de transfección cuando estas son tratadas con un cóctel de DNasa y RNasa (Unzueta *et al.*, 2013). Los experimentos de transfección ocular *in vivo*, tomados como una primera aproximación, también presentaron bajos niveles de expresión en células del epitelio pigmentado, aunque se demostró por primera vez que las R9GFPH6-NPs son capaces de llegar al tejido diana y internalizarse en las células del EPR *in vivo*, provocando una cierta expresión de la proteína transgénica.

En conclusión, aunque las R9GFPH6-NPs se presentaban como unos vehículos muy prometedores según los resultados publicados por Vázquez *et al.*, más esfuerzos en la optimización de los procesos de producción y purificación serían necesarios para asegurar la obtención de unas NPs limpias y eficientes, antes de realizar más experimentos de transfección ocular en modelos animales. En este sentido, en los últimos años se han realizado varios estudios de optimización de las condiciones de producción y ensamblamiento de las nanopartículas proteicas, ajustando condiciones como el pH y las secuencias proteicas para mejorar la estabilidad, el empaquetamiento de ADN y la capacidad de internalización y expresión en las células diana, mostrando una cierta mejora en las eficiencias de transfección *in vitro* (Unzueta *et al.*, 2012; Unzueta *et al.*, 2014).

D4.3.2. Nanopartículas poliméricas de quitosano O15 como sistemas de transferencia genética no viral en retina

Los quitosanos han sido estudiados históricamente como vehículos para terapia génica no viral debido a su naturaleza catiónica, que favorece la interacción con las moléculas de ADN y también con la superficie celular cargada negativamente, facilitando por tanto la captación celular y permitiendo así la transfección (Yue *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2012). La habilidad de los quitosanos O15 en particular de condensar plásmidos y transfectar tejidos oculares ha sido estudiada anteriormente (Klausner *et al.*, 2010; Puras *et al.*, 2013). Sin embargo, varios estudios apuntan a la gran influencia del pH del medio y de la concentración de sales en la estabilidad y los niveles de transfección de estas nanopartículas (Nimesh *et al.*, 2010; Aguirre *et al.*, 2015a,b). En nuestros experimentos los quitosanos O15 mostraron una correcta unión al ADN plasmídico, provocando su retardo electroforético dependiente del ratio nanopartícula/plásmido (N/P). El elevado ratio N/P necesario para empaquetar totalmente el ADN plasmídico se puede explicar por el pequeño tamaño molecular del quitosano O15, en concordancia con resultados publicados anteriormente (Aguirre *et al.*, 2015a). Sin embargo, los niveles de transfección obtenidos en los experimentos de transfección *in vitro* fueron muy bajos, consiguiendo un máximo del 5% de las células transfectadas con el ratio N/P más bajo y a pH ácido (7,1), resultados parecidos a los publicados anteriormente (Aguirre *et al.*, 2015b). La baja eficiencia de transfección y expresión de tdTomato a elevados ratios N/P se podría explicar

por las fuertes interacciones electroestáticas entre el polímero y el plásmido, que podrían impedir la liberación del ADN del vector (Strand *et al.*, 2010). Además, se ha descrito que los quitosanos, aunque son catiónicos, no exhiben una capacidad de buffer endosomal demasiado fuerte comparado con otros polímeros catiónicos y por tanto no son eficientes escapando del endosoma (Moreira *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2010). En este sentido, se ha demostrado que introduciendo grupos amino al quitosano mediante modificación de grupos funcionales en la glucosamina con ácido acético-4-imidazol mejora la liberación de ADN y siRNA en tejidos de pulmón e hígado (Ghosn *et al.*, 2008; Ghosn *et al.*, 2010). En terapia génica para retina, Mitra *et al.* evaluaron la capacidad de transfección de quitosanos modificados con polietilenglicol y demostraron una solubilidad mejor y una mejora en los niveles de transfección de las células del EPR en ratón (Mitra *et al.*, 2014). Por tanto, este tipo de modificaciones podría suponer una aproximación válida para mejorar las eficiencias de transfección en tejido ocular de los quitosanos.

Dejando de lado los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* y basándonos en las asunciones que, por un lado, cada línea celular requiere diferentes condiciones para ser eficientemente transfectada (Luo *et al.*, 2000), y por otro lado, que la capacidad de penetración y tráfico intracelular de los poliplexos puede diferir entre las condiciones *in vitro* e *in vivo* (Conley *et al.*, 2010), decidimos de realizar unas primeras pruebas de administración de poliplexos quitosano/ADN mediante inyección sub-retiniana en ojo de rata. En esta primera aproximación descubrimos que los poliplexos administrados a ratio N/P 10 producían la expresión del gen GFP en la capa del EPR en la zona de inyección, pero no aparecía señal en zonas de la retina alejadas, en concordancia con resultados obtenidos por otros grupos (Puras *et al.*, 2013). Sin embargo, la retina en la zona expuesta al quitosano aparecía desestructurada, indicando una posible toxicidad de los poliplexos. En este sentido, aunque estudios anteriores reportan ausencia de toxicidad de los quitosanos O15 en retina (Puras *et al.*, 2013), más estudios serían necesarios para confirmar los efectos de la transfección con estos poliplexos en el tejido ocular y corroborar los niveles de transfección.

D5. ÚLTIMOS APUNTES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El trabajo realizado en esta tesis doctoral parte de un proyecto muy ambicioso en el que se planteó el desarrollo una terapia génica no viral para la sobre-expresión de los factores PEDF y SST en retina como terapia para retinopatía diabética y degeneración macular asociada a la edad. Este proyecto se inició en 2011, liderado por el grupo de Oftalmología y en colaboración con el grupo CIBBIM-Nanomedicina del VHIR, y supuso el inicio de la actividad investigadora en el laboratorio básico de Oftalmología. En otras palabras, se empezó desde cero. Es por eso que la mayoría del trabajo

realizado en esta tesis se ha basado en la puesta a punto de todas las técnicas de investigación y análisis, así como el desarrollo de los modelos celulares y animales.

Por tanto, consideramos que se han podido obtener varios resultados provechosos, dirigidos a la obtención de la terapia planteada en el proyecto inicial: se han obtenido y caracterizado dos modelos animales válidos de RD y DMAE, se ha desarrollado y optimizado la técnica de administración de compuestos en el espacio sub-retiniano, así como varias técnicas de análisis oftalmológico en roedores, se ha obtenido una batería de vectores plasmídicos optimizados para la expresión de PEDF y SST en tejido ocular y se han desarrollado ensayos *in vitro* para la caracterización de las funciones anti-angiogénicas del PEDF y la SST. El punto que ha sufrido más contratiempos ha estado la obtención de un buen sistema de vehiculización de ADN no viral para la transfección del epitelio pigmentado de la retina. Este punto del proyecto ha sido fuente de varias colaboraciones con grupos especializados en nanopartículas que han participado en la búsqueda de este vehículo ideal. Sin embargo, las opciones que se han planteado en este trabajo (nanopartículas proteicas y quitosanos) no han dado los resultados esperados y queda aún mucho trabajo por hacer en la caracterización y optimización de estos sistemas. Actualmente se están planteando nuevas colaboraciones con grupos que trabajan en sistemas de terapia génica no viral específicamente diseñados para retina, como es el grupo de la Dra. Naash, que en los últimos años ha desarrollado las nanopartículas poliméricas CK30PEG10k (un péptido de poli-lisina catiónica 30-mer conjugado con PEG de 10 kDa) y han demostrado que transfectan eficientemente células de EPR de ratón, provocando una expresión elevada y persistente de los transgenes (Farjo *et al.*, 2006; Koirala *et al.*, 2011). Estos sistemas ya han sido probados en el tratamiento de patologías retinianas como son la Retinosis Pigmentaria y la Amaurosis Congénita de Leber, induciendo la expresión del gen curativo y revertiendo los efectos de la neurodegeneración (Koirala *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2015).

Otra alternativa que se podría plantear es la administración de PEDF y SST en el ojo en forma proteica en vez de génica. Esta aproximación, sin embargo, acarrea una principal desventaja que es el corto tiempo de vida medio de los péptidos (Amaral *et al.*, 2005; Pawlikowski *et al.*, 2004). Esta inconveniente se podría solventar mediante el uso de la nanotecnología para vehiculizar la proteína en un sistema de liberación sostenida, garantizando la protección del fármaco y una aportación del péptido terapéutico durante un período prolongado con una sola administración. En este sentido, se han realizado varios estudios en el campo de la oftalmología usando nanopartículas y nanoinjertos (revisado por Shen *et al.*, 2015; Campos *et al.*, 2017; Kamaledin, 2017), existiendo en la actualidad diversos ensayos clínicos con microimplantes para RD y DMAE (I-vation, CT nº NCT00692614; Implante intravítreo de Brimonidina, CT nº NCT00658619), algunos ya aprobados por la FDA (OzurdexTM, Allergan; ILUVIENTM, Alimera Sciences; TethadurTMb, Alimera Sciences). Sin embargo, existen ún en este campo preguntas por resolver en cuanto a temas de toxicidad neuronal y en este

sentido creemos que, en comparación, las estrategias de terapia génica pueden ofrecer muchas más ventajas.

En conclusión, aunque las primeras pruebas de testado de sistemas no virales de transferencia génica no han generado los resultados esperados y aún queda mucho trabajo por hacer en la optimización y caracterización de estos sistemas, nuestro grupo sigue apostando por la obtención de una terapia génica no viral válida que nos permita la transfección eficiente de las células del epitelio pigmentado de la retina, y espera poder avanzar y evaluar finalmente la aplicación de esta terapia con los vectores de expresión de PEDF y SST en los modelos animales de RD y DMAE, en la búsqueda de una cura para las principales retinopatías vasoproliferativas.

CONCLUSIONES

Sobre el PEDF y la SST como terapia génica anti-angiogénica:

1. Tanto el PEDF como la SST exhiben una potente acción anti-angiogénica inhibiendo la proliferación, migración y formación tubular de células endoteliales inducidas por VEGF *in vitro*, cuando son aplicados a concentraciones 10 nM y 100 μ M respectivamente.
2. Los plásmidos minicírculos conteniendo los genes del PEDF y la SST, bajo la regulación del promotor VMD2 y las secuencias S/MAR, son capaces de provocar una sobre-expresión razonable de PEDF y SST en células de epitelio pigmentado de retina.

Sobre los modelos animales de RD y DMAE:

3. El modelo de retinopatía diabética inducida con STZ en rata Long Evans se caracteriza por un deterioro de la función visual reflejado en la disminución de la amplitud y el retardo de la señal electroretinográfica, una disminución en los grosores de las capas nuclear interna y plexiforme externa de la retina y una hiperreactividad glial focal a partir de 1 mes post-inducción, pero no experimenta una respuesta inflamatoria en retina ni exhibe alteraciones angiográficas detectables por AF.
4. El modelo de NVC inducida con láser en ratón se caracteriza por una respuesta inflamatoria inicial entre los días 1 – 3 post-láser y posteriormente la aparición de neovascularización en la zona de la lesión y fluido sub-retiniano a partir del día 5. La lesión neovascular llega a su tamaño máximo en el séptimo día, provocando alteraciones en la función visual de la retina adyacente, y posteriormente sufre una regresión. Sin embargo, no aparece sobre-expresión de factores relacionados con la angiogénesis en retina total, sino sólo una leve sobre-expresión de VEGF en la zona de la lesión en las células endoteliales emergentes.

Sobre los sistemas de terapia génica no viral para retina:

5. La inyección sub-retiniana de plásmido minicírculo conteniendo el gen tdTomato unido a Lipofectamina, en ojos de rata provoca la transfección de las células del epitelio pigmentado de la retina y la expresión del transgen por estas células.

6. Las nanopartículas peptídicas R9-GFP-H6, solubilizadas en buffer Tris-NaCl, son capaces de unir y empaquetar ADN plasmídico. La presencia de la cola de 9 argininas les permite internalizarse en las células diana y provocar la expresión del transgén, sin embargo tienen una baja eficiencia de transfección en células del EPR tanto *in vitro* como *in vivo*.
7. Las nanopartículas de quitosano O15, debido a su carga neta positiva, son capaces de unir ADN plasmídico y empaquetarlo. Sin embargo, los complejos O15:ADN no son capaces de inducir una expresión sustancial del transgén cuando son aplicados sobre células de EPR en cultivo y, aunque su eficiencia de transfección mejora cuando son aplicadas *in vivo* en el espacio sub-retiniano de ratas, provocan toxicidad en el tejido diana.

BIBLIOGRAFÍA

- 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. *American journal of ophthalmology*; 118:445–450.
- Adamis AP, Berman AJ. (2008). Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Seminars in Immunopathology*, 30(2), 65–84.
- Adijanto J, Naash MI. (2015). Nanoparticle-based technologies for retinal gene therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*; 95(Pt B):353-67.
- Age-Related Eye Disease Study Research Group. (2001). A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Archives of ophthalmology*; 119(10):1417-36.
- Agirre, M., Zarate, J., Ojeda, E., Puras, G., Desbrieres, J., & Pedraz, J. L. (2014). Low molecular weight chitosan (LMWC)-based polyplexes for pDNA delivery: From bench to bedside. *Polymers*; 6(6):1727-1755.
- Agirre M, Zarate J, Puras G, Ojeda E, Pedraz JL. (2015a). Improving transfection efficiency of ultrapure oligochitosan/DNA polyplexes by medium acidification. *Drug Delivery*; 22(1):100-10.
- Agirre M, Zarate J, Ojeda E, Puras G, Rojas LA, Alemany R, Pedraz JL. (2015b). Delivery of an adenovirus vector plasmid by ultrapure oligochitosan based polyplexes. *International journal of pharmaceutics*; 479(2):312-319.
- 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. *The New England journal of medicine*; 331:1480-1487.
- Aiello JP, Clermont A, Arora V, Davis MD, Sheetz MJ, Bursell SE. (2006). Inhibition of PKC β by oral administration of ruboxistaurin is well tolerated and ameliorates diabetes-induced retinal hemodynamic abnormalities in patients. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 47(1):86-92.
- Alder VA, Su EN, Yu DY, Cringle S, Yu P. (1998). Overview of studies on metabolic and vascular regulatory changes in early diabetic retinopathy. *Ophthalmology*; 26(3):267.
- Amano S, Yamagishi SI, Inagaki Y, Nakamura K, Takeuchi M, Inoue H, Imaizumi T, (2005). Pigment epithelium-derived factor inhibits oxidative stress-induced apoptosis and dysfunction of cultured retinal pericytes. *Microvascular research*; 69:45-55.
- Amaral J, Fariss RN, Campos MM, Robison WG Jr, Kim H, Lutz R, Becerra SP. (2005). Transscleral-RPE permeability of PEDF and ovalbumin proteins: implications for subconjunctival protein delivery. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 46(12):4383-92.
- Ambati J, Fowler BJ. (2012). Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron*; 75(1):26-39.
- Amung MH, Kim MK, Olson DE, Thule PM, Pardue MT. (2013). Early Visual Deficits in Streptozotocin-Induced Diabetic Long Evans Rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 54, 2, 1370-1377.
- Andrieu-Soler C, Bejjani RA, de Bizemont T, et al. (2006a). Ocular gene therapy: a review of nonviral strategies. *Molecular vision*; 12:1334-1347.
- Andrieu-Soler C, Doat M, Halhal M., et al. (2006b). Enhanced oligonucleotide delivery to mouse retinal cells using iontophoresis. *Molecular vision*; 12:1098-1107.
- Antonetti DA, Barber A J, Bronson SK, Freeman WM, Gardner TW, Jefferson LS, Kester M, Kimball SR, Krad, JK, LaNoue KF, Norbury CC, Quinn PG, Sandirasegarane L, Simpson IA. (2006). Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes*, 55(9):2401–11.
- Argyros O, Wong SP, Fedonidis C, Tolmachov O, Waddington SN, Howe SJ, Niceta M, Coutelle C, Harbottle RP. (2011). Development of S/MAR minicircles for enhanced and persistent transgene expression in the mouse liver. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*; 89(5):515-29.

- Argyros O, Wong SP, Harbottle RP. (2011). Non-viral episomal modification of cells using S/MAR elements. *Expert Opinion on Biological Therapy*; 11(9):1177–91.
- Aung MH, Kim MK, Olson DE, Thule PM, Pardue MT. (2013). Early visual deficits in streptozotocin-induced diabetic long evans rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 54(2):1370-1377.
- 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, Ali RR. (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine*; 358:2231-2239.
- Bakri SJ, Pulido JS, Mukherjee P, Marler RJ, Mukhopadhyay, D. (2008). Absence of histologic retinal toxicity of intravitreal nanogold in a rabbit model. *Retina*; 28:147-149.
- Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. (1998). Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes: early onset and effect of insulin. *The Journal of Clinical Investigation*; 102(4):783-791.
- Barnstable CJ, Tombran-Tink J. (2004). Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential. *Progress in Retinal and Eye Research*; 23(5):561-77.
- Beatty S, Boulton M, Henson D, Koh HH, Murray IJ. (1999). Macular pigment and age related macular degeneration. *British Journal of Ophthalmology*; 83 (7):867-877.
- Becerra EM, Morescalch, F, Gandolfo F, Danzi P, Nascimbeni G, Arcidiacono B, Semeraro F. (2011). Clinical evidence of intravitreal triamcinolone acetonide in the management of age-related macular degeneration. *Current drug targets*; 12:149-172.
- Becerra SP. (1997). Structure–function studies on PEDF: A non-inhibitory serpin with neurotrophic activity. *Advances in experimental medicine and biology*; 425, 223-237
- Becerra SP. (2006). Focus on molecules: Pigment epithelium-derived factor (PEDF). *Experimental Eye Research*; 82(5):739-740.
- Ben-Mahmud BM, Mann GE, Datti A, Orlacchio A, Kohner EM, Chibber. (2004) Tumor necrosis factor-alpha in diabetic plasma increases the activity of core 2 GlcNAc-T and adherence of human leukocytes to retinal endothelial cells: significance of core 2 GlcNAc-T in diabetic retinopathy. *Diabetes*; 53:2968–2976
- Bhagat N, Grigorian RA, Tutela A, Zarbin MA. (2009) Diabetic macular edema: pathogenesis and treatment. *Survey of ophthalmology*; 54:1–32.
- Bloquel C, Bourges JL, Touchard E, Berdugo M, BenEzra D, Behar-Cohen F. (2006). Non-viral ocular gene therapy: potential ocular therapeutic avenues. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 58(11):1224–42.
- Bocci G, Culler MD, Fioravanti A, Orlandi P, Fasciani A, Colucci R, Taylor JE, Sadat D, Danesi R, Del Tacca M. (2007). In vitro antiangiogenic activity of selective somatostatin subtype-1 receptor agonists. *Eur J Clin.*; 37:700–708.
- Boehm BO, Lang GK, Jehle PM, Feldman B, Lang GE. (2001). Octreotide reduces vitreous hemorrhage and loss of visual acuity risk in patients with high-risk proliferative diabetic retinopathy. *Hormone and metabolic research*; 33(5):300-306.
- Bora NS, Kaliappan S, Jha P, Xu Q, Sohn JH, Dhaulakhandi DB, Kaplan HJ, Bora PS. (2006). Complement activation via alternative pathway is critical in the development of laser-induced choroidal neovascularization: role of factor B and factor H. *Journal of immunology*; 177(3):1872-8.
- Bora NS, Kaliappan S, Jha P, Xu Q, Sivasankar B, Harris CL, Morgan BP, Bora PS. (2007). CD59, a complement regulatory protein, controls choroidal neovascularization in a mouse model of wet-type age-related macular degeneration. *Journal of immunology*; 178:1783-1790.
- Bora PS, Sohn JH, Cruz JM, Jha P, Nishihori H, Wang Y, Kaliappan S, Kaplan HJ, Bora NS. (2005). Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularization. *Journal of immunology*; 174(1):491-7.

- Brazeau P, Vale WW, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. (1973). Hypothalamic peptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*; 179:77-79.
- Bresnick GH, Korth K, Groo A, Palta M. (1984). Electroretinographic oscillatory potentials predict progression of diabetic retinopathy. Preliminary report. *Archives of ophthalmology*; 102:1307-11.
- Buch PK, Bainbridge JW, Ali RR. (2008). AAV-mediated gene therapy for retinal disorders: from mouse to man. *Gene Therapy*; 15(11):849-857.
- Cai X, Conley SM, Nash Z, Fliesler SJ, Cooper MJ, Naash MI. (2009a). Gene delivery to mitotic and postmitotic photoreceptors via compacted DNA nanoparticles results in improved phenotype in a mouse model of retinitis pigmentosa. *FASEB Journal*; 24(4):1178-91.
- Cai X, Nash Z, Conley SM, Fliesler SJ, Cooper MJ, Naash MI. (2009b). A partial structural and functional rescue of a retinitis pigmentosa model with compacted DNA nanoparticles. *PLoS One*; 4(4):e5290.
- Cai J, Jiang WG, Grant MB, Boulton M. (2006). Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor-1. *The Journal of biological chemistry*; 281:3604-3613.
- Caicedo A, Espinosa-Heidmann DG, Pina Y, Hernandez EP, Cousins SW. (2005). Blood-derived macrophages infiltrate the retina and activate Muller glial cells under experimental choroidal neovascularization. *Experimental Eye Research*; 81:38-47.
- Campa C, Costagliola C, Incorvaia C, et al. (2010). Inflammatory mediators and angiogenic factors in choroidal neovascularization: pathogenetic interactions and therapeutic implications. *Mediators of inflammation*; 2010:pii:546826
- van Lookeren Campagne M, LeCouter J, Yaspan BL, Ye W. (2014). Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities. *The journal of pathology*; 232(2):151-64.
- Campochiaro Pa; C99-PKC412-003 study group. (2004). Reduction of diabetic macular edema by oral administration of the kinase inhibitor PKC412. *Investigative ophthalmology & visual science*; 45(3):922 -931.
- Campochiaro P, Nguyen QD, Shah SM, Klein ML, Holz E, Frank RN, Saperstein DA, Gupta A, Stout JT, Macko J, DiBartolomeo R, Wei LL. (2006). Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration: results of a phase I clinical trial. *Human Gene Therapy*; 17(2):167-76.
- Campos EJ, Campos A, Martins J, Ambrósio AF. (2017). Opening eyes to nanomedicine: Where we are, challenges and expectations on nanotherapy for diabetic retinopathy. *Nanomedicine*; pii: S1549-9634(17)30069-2.
- Cao W, Tombran-Tink J, Chen W, Mrzcek D, Elias R, McGinnis JF. (1999). Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *Journal of neuroscience research*; 57:789-800.
- Carmeliet P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*; 6:389-395.
- Carrasco E, Hernández C, Miralles A, Hugue, P, Farrés J, Simó R. (2007). Lower somatostatin expression is an early event in diabetic retinopathy and is associated with retinal neurodegeneration. *Diabetes Care*; 30:2902-2908.
- Cayouette M, Smith SB, Becerra SP, Gravel C. (1999). Pigment epithelium-derived factor delays the death of photoreceptors in mouse models of inherited retinal degenerations. *Neurobiology of disease*; 6, 523-532.
- Cervia D, Casini G, Bagnoli P. (2008). Physiology and pathology of somatostatin in the mammalian retina: a current view. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 286(1-2), 112-22.
- Cervia D, Catalani E, Dal Monte M, Casini G. (2012). Vascular endothelial growth factor in the ischemic retina and its regulation by somatostatin. *Journal of Neurochemistry*; 120(5):818-29.
- Checchin D, Sennlaub F, Levavasseur E, Leduc M, Chemtob S. (2006). Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*; 47:3595-3602.
- Chen ZY, He CY, Ehrhardt A, Kay MA. (2003). Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-

level transgene expression in vivo. *Molecular Therapy*; 8(3):495-500.

Cheung N, Wong IY, Wong TY. (2014). Ocular Anti-VEGF Therapy for Diabetic Retinopathy: Overview of Clinical Efficacy and Evolving Applications. *Diabetes Care*; 37(4):900-905.

Conley SM, Naash MI. (2010). Nanoparticles for retinal gene therapy. *Progress in retinal and eye research*; 29(5):376-397.

Crawford SE, Stellmach V, Ranalli M, Huang X, Huang L, Volpert O, De Vries GH, Abramson L.P, Bouck N. (2001). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity. *Journal of cell science*; 114:4421-4428.

Cuevas-Ramos D, Fleseriu M. (2016). Pasireotide: a novel treatment for patients with acromegaly. *Drug Design, Development and Therapy*; 10:227-39.

Dal Monte M, Petrucci C, Cozzi A, Allen JP, Bagnoli P. (2003). Somatostatin inhibits potassium-evoked glutamate release by activation of the sst(2) somatostatin receptor in the mouse retina. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*; 367:188-192.

Dal Monte M, Cammalleri M, Martini D, Casini G, Bagnoli P. (2007). Antiangiogenic role of somatostatin receptor 2 in a model of hypoxia-induced neovascularization in the retina: results from transgenic mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 48(8):3480-9.

Dal Monte M, Ristori C, Cammalleri M, Bagnoli P. (2009). Effects of somatostatin analogues on retinal angiogenesis in a mouse model of oxygen-induced retinopathy: involvement of the somatostatin receptor subtype 2. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 50(8):3596-606.

Dal Monte M, Martini D, Ristori C, Azara D, Armani C, Balbarini A, Bagnoli P. (2011). Hypoxia effects on proangiogenic factors in human umbilical vein endothelial cells: functional role of the peptide somatostatin. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*; 383(6):593-612.

Dal Monte M, Latina V, Cupisti E, Bagnoli P. (2012). Protective role of somatostatin receptor 2 against retinal degeneration in response to hypoxia. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*; 385(5):481-94.

Danesi R, Del Tacca M. (1996). The effects of the somatostatin analog octreotide on angiogenesis in vitro. *Metabolism: Clinical and Experimental*; 45(8 Suppl 1):49-50.

Darquet AM, Cameron B, Wils P, Scherman D, Crouzet J. (1997). A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Ther.*; 4(12):1341-1349.

Dasgupta P. (2004). Somatostatin analogues: multiple roles in cellular proliferation, neoplasia, and angiogenesis. *Pharmacology & therapeutics*. 102:61-85

Davis MI, Wilson SH, Grant MB. (2001). The therapeutic problem of proliferative diabetic retinopathy: targeting somatostatin receptors. *Hormone and metabolic research*; 33:295-299

Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP. (1999). Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*; 285:245-248

De Schaepdrijver L, Simoens P, Lauwers H, De Geest JP. (1989). Retinal vascular patterns in domestic animals. *Research in Veterinary Science*; 47(1):34-42.

DeCoster MA, Schabelman E, Tombran-Tink J, Bazan NG. (1999). Neuroprotection by pigment epithelial-derived factor against glutamate toxicity in developing primary hippocampal neurons. *Journal of neuroscience research*; 56:604-610.

Deering TG, Gehlbach PL, Okoye G, Callahan K, Hauswirth WW, Campochiaro PA. (2003). Retinal Function 10 Months After Intraocular or Periocular Injection of AAV-CBA-PEDF. *Investigative ophthalmology & visual science*; 44(13):3586.

del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Solinís MA, Gascón AR, Pedraz JL. (2008). Solid lipid nanoparticles for retinal gene therapy: transfection and intracellular trafficking in RPE cells. *International Journal of Pharmaceutics*; 360(1-2):177-83.

Delgado D, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MÁ, Avilés-Triqueros M, Weber BH, Fernández E, Gascón AR. (2012). Dextran and

protamine-based solid lipid nanoparticles as potential vectors for the treatment of X linked juvenile retinoschisis. *Human Gene Therapy*; 355:345–355.

Demircan N, Safran BG, Soyul M, Ozcan AA, Sizmaz S. (2006) Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye (London)*; 20:1366–1369.

Dezawa M, Takano M, Negishi H, Mo X, Oshitari T, Sawada H. (2002). Gene transfer into retinal ganglion cells by in vivo electroporation: a new approach. *Micron*; 33:1-6.

Dietz WM, Skinner NE, Hamilton SE, Jund MD, Heitfeld SM, Litterman AJ, Hwu P, Chen ZY, Salazar AM, Ohlfest JR, Blazar BR, Pennell CA, Osborn MJ. (2013). Minicircle DNA is superior to plasmid DNA in eliciting antigen-specific CD8+ T-cell responses. *Molecular therapy*; 21(8):1526-35

Dobi ET, Puliafito CA, Destro M. (1989). A new model of experimental choroidal neovascularization in the rat. *Archives of ophthalmology*; 107(2):264–269.

Duh EJ, Yang HS, Suzuma I, Miyagi M, Youngman E, Mori K, Katai M, Yan L, Suzuma K, West K, Davarya S, Tong P, Gehlbach P, Pearlman J, Crabb JW, Aiello LP, Campochiaro PA, Zack DJ. (2002). Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. *Investigative ophthalmology & visual science*; 43:821-829.

Duncan R, Gaspar R. (2011). Nanomedicine(s) under the microscope. *Molecular pharmaceuticals*; 8:2101–2141.

Dureau P, Legat L, Neuner-Jehle M, Bonnel S, Pecqueur S, Abitbol M, Dufier JL. (2000). Quantitative analysis of subretinal injections in the rat. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*; 238(7):608-14.

Edelman JL, Castro MR. (2000). Quantitative image analysis of laser-induced choroidal neovascularization in rat. *Experimental Eye Research*; 71(5):523–533.

Elayappan B, Ravinarayanan H, Pasha SPBS, Lee K, Gurunathan S. (2009). PEDF inhibits VEGF- and EPO-induced angiogenesis in retinal endothelial cells through interruption of PI3K/Akt phosphorylation. *Angiogenesis*; 12(4), 313–24.

Esumi N, Oshima Y, Li Y, Campochiaro, PA, Zack DJ. (2004). Analysis of the VMD2 promoter and implication of E-box binding factors in its regulation. *The Journal of Biological Chemistry*; 279(18):19064–73.

Farjo R, Skaggs J, Quiambao AB, Cooper MJ, Naash MI. (2006). Efficient non-viral ocular gene transfer with compacted DNA nanoparticles. *PLoS One*; 20(1):38.

Ferrara N. (2010). Role of myeloid cells in vascular endothelial growth factor- independent tumor angiogenesis. *Current opinion in hematology*; 17, 219–224.

Frydkjaer-Olsen U, Soegaard Hansen R, Simó R, Cunha-Vaz J, Peto T, Grauslund J. EUROCONDOR. (2016). Correlation between Retinal Vessel Calibre and Neurodegeneration in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus in the European Consortium for the Early Treatment of Diabetic Retinopathy (EUROCONDOR). *Ophthalmic research*; 56(1):10-6.

Gandorfer A, Kampik A. (2000). Pars plana vitrectomy in diabetic retinopathy. From pathogenetic principle to surgical strategy. *Ophthalmology*; 97(5):325-30.

Gardiner TA, Stitt AW, Anderson HR, Archer DB. (1994). Selective loss of vascular smooth muscle cells in the retinal microcirculation of diabetic dogs. *The British journal of ophthalmology*; 78:54-60.

Ghosn B1, Kasturi SP, Roy K. (2008). Enhancing polysaccharide-mediated delivery of nucleic acids through functionalization with secondary and tertiary amines. *Current topics in medicinal chemistry*; 8(4):331-40.

Ghosn B1, Singh A, Li M, Vlassov AV, Burnett C, Puri N, Roy K. (2010). Efficient gene silencing in lungs and liver using imidazole-modified chitosan as a nanocarrier for small interfering RNA. *Oligonucleotides*; 20(3):163-72.

Giani A, Thanos A, Roh MI, Connolly E, Trichonas G, Kim I, Gragoudas E, Vavvas D, Miller JW. (2011). In vivo evaluation of laser-induced choroidal neovascularization using spectral-domain optical coherence tomography. *Investigative ophthalmology & visual science*; 52(6):3880–3887.

- Gologorsky, D., Thanos, A., & Vavvas, D. (2012). Therapeutic interventions against inflammatory and angiogenic mediators in proliferative diabetic retinopathy. *Mediators of Inflammation*; 2012:629452.
- Gong Y, Li J, Sun Y, Fu Z, Liu CH, Evans L, Tian K, Saba N, Fredrick T, Morss P, Chen J, Smith LE. (2015). Optimization of an Image-Guided Laser-Induced Choroidal Neovascularization Model in Mice. *PLoS One*; 10(7):e0132643.
- Gracey Maniar LE, Maniar JM, Chen ZY, Lu J, Fire AZ, Kay MA. (2013). Minicircle DNA vectors achieve sustained expression reflected by active chromatin and transcriptional level. *Molecular therapy*; 21(1):131-8.
- Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C, Hazariwala KM, Cooper-DeHoff R, Caballero S, Estes KS. (2000). The efficacy of octreotide in the therapy of severe nonproliferative and early proliferative diabetic retinopathy: a randomised controlled study. *Diabetes Care*; 23(4):504 -509.
- Green DG, Kapousta-Bruneau NV. (1999). A dissection of the electroretinogram from the isolated rat retina with microelectrodes and drugs. *Visual Neuroscience*; 16(4):727-741.
- Grossniklaus HE, Ling JX, Wallace TM, Dithmar S, Lawson DH, Cohen C, Elnor VM, Elnor SG, and Sternberg P Jr. (2002). Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Molecular Vision*. 8:119–126.
- Grossniklaus HE, Kang SJ, Berglin L. (2010). Animal models of choroidal and retinal neovascularization. *Progress in Retinal and Eye Research*, 29(6), 500–19. *Cochrane Database Syst Rev*. (1)
- Han Z, Conley SM, Makkia R, Guo J, Cooper MJ, Naash MI. (2012). Comparative analysis of DNA nanoparticles and AAVs for ocular gene delivery. *PLoS One*; 7(12):e52189.
- Han Z, Banworth MJ, Makkia R, Conley SM, Al-Ubaidi MR, Cooper MJ, Naash MI. (2015). Genomic DNA nanoparticles rescue rhodopsin-associated retinitis pigmentosa phenotype. *FASEB J*. 2015:1-10.
- Hatchell DL, Toth CA, Barden CA, Saloupis P. (1995). Diabetic retinopathy in a cat. *Experimental Eye Research*; 60:591-593
- Haurigot V, Villacampa P, Ribera A, Bosch A, Ramos D, Ruberte J, Bosch F. (2012). Long-term retinal PEDF overexpression prevents neovascularization in a murine adult model of retinopathy. *PLoS One*; 7(7):e41511.
- Hayashi A, Naseri A, Pennesi ME, de Juan Jr. E. (2009). Subretinal delivery of immunoglobulin G with gold nanoparticles in the rabbit eye. *Japanese journal of ophthalmology*; 53:249–256.
- Hernández C, Carrasco E, Casamitjana R, Deulofeu R, García-Arumí J, Simó R. (2005). Somatostatin molecular variants in the vitreous fluid: a comparative study between diabetic patients with proliferative diabetic retinopathy and nondiabetic control subjects. *Diabetes Care*; 28(8):1941-7.
- Hjelmeland LM, Cristofolo VJ, Funk W, Rakoczy E, Katz ML. (1999). Senescence of the retinal pigment epithelium. *Molecular Vision*; 5:33.
- Holekamp NM, Bouck N, Volpert O. (2002). Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology*; 134(2):220-7.
- Holopigian K, Greenstein VC, Seiple W, Hood DC, Carr RE. (1997). Evidence for photoreceptor changes in patients with diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*; 38:2355–2365.
- Houenou LJ, D'Costa AP, Li L, Turgeon VL, Enyadike C, Alberdi E, Becerra SP. (1999). Pigment epithelium-derived factor promotes the survival and differentiation of developing spinal motor neurons. *The Journal of comparative neurology*; 412:506–514.
- Huang M, Fong CW, Khor E, Lim LY. (2005). Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. *Journal of controlled release*; 106:391-406.
- Ibrahim AS, El-Shishtawy MM, Peña Jr. A, Liou GI. (2010). Genistein attenuates retinal inflammation associated with diabetes by targeting of microglial activation. *Molecular Vision*; 16:2033-2042.
- Joussen AM, Murata T, Tsujikawa A, Kirchhof B, Bursell SE, Adamis AP. (2001). Leukocyte-mediated endothelial cell injury

and death in the diabetic retina. *The American journal of pathology*; 158(1):147–152.

Joussen AM, Poulaki V, Qin W, Kirchhof B, Mitsiades N, Wiegand SJ, Rudge J, Yancopoulos GD, Adamis AP. (2002). Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion in vivo. *The American journal of pathology*; 160:501–509.

Juen S, Kieselbach GF. (1990). Electrophysiological changes in juvenile diabetics without retinopathy. *Archives of ophthalmology*; 108: 372-5.

Kachi S, Oshima Y, Esumi N, Kachi M, Rogers B, Zack DJ, Campochiaro P. (2005). Nonviral ocular gene transfer. *Gene Therapy*; 12(10):843–51.

Kamaleddin MA. (2017). Nano-ophthalmology: Applications and considerations. *Nanomedicine*; 13(4):1459-1472.

Kaneko H, Dridi S, Tarallo V, Gelfand BD, Fowler BJ, Cho WG, Kleinman ME, Ponicsan SL, Hauswirth WW, Chiodo VA, Karikó K, Yoo JW, Lee DK, Hadziahmetovic M, Song Y, Misra S, Chaudhuri G, Buaas FW, Braun RE, Hinton DR, Zhang Q, Grossniklaus HE, Provis JM, Madigan MC, Milam AH, Justice NL, Albuquerque RJ, Blandford AD, Bogdanovich S, Hirano Y, Witta J, Fuchs E, Littman DR, Ambati BK, Rudin CM, Chong MM, Provost P, Kugel JF, Goodrich JA, Dunaief JL, Baffi JZ, Ambati J. (2011). DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature*; 471:325-330.

Kang HC, Samsonova O, Kang S, Bae YH. (2012). The effect of environmental pH on polymeric transfection efficiency. *Biomaterials*; 33:1651–1662.

Karwoski CJ, Xu X. (1999). Current source-density analysis of light-evoked field potentials in rabbit retina. *Visual Neuroscience*; 16(2):369-377.

Kaufman PL, Alm A. (2003). Fisiología del ojo: aplicación clínica. *Elsevier España*; Décima edición.

Kay Ma, He CY, Chen ZY. (2010). A robust system for production of minicircle DNA vectors. *Nature Biotechnology*; 28(12):1287–9.

Kern TS. (2007). Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Experimental diabetes research*; 95103.

Kim SY, Johnson MA, McLeod DS, Alexander T, Otsuji T, Steidl SM, Hansen BC, Luty GA. (2004). Retinopathy in monkeys with spontaneous type 2 diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science*; 45:4543-4553.

Kim TH, Jiang HL, Jere D, Park IK, Cho MH, Nah JW, et al. (2007). Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo. *Progress in polymer science*; 32:726-753.

Kirwin SJ, Kanaly ST, Linke NA, Edelman JL. (2009). Strain-dependent increases in retinal inflammatory proteins and photoreceptor FGF-2 expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*; 50(11):5396-404.

Kirwin SJ, Kanaly ST, Hansen CR, Cairns BJ, Ren M, Edelman JL. (2011). Retinal gene expression and visually evoked behavior in diabetic long evans rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*; 52(10):7654-63.

Klausner EA, Zhang Z, Chapman RL, Multack RF, Volin MV. (2010). Ultrapure chitosan oligomers as carriers for corneal gene transfer. *Biomaterials*; 31:1814-1820.

Klausner EA, Chapman RL, Volin MV, Harbottle RP. (2012). Corneal gene delivery : chitosan oligomer as a carrier of CpG rich, CpG free or S/MAR plasmid DNA. *The Journal Of Gene Medicine*; 14:100-108.

Kohzaki K, Vingrys AJ, Bui BV. (2008). Early inner retinal dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 49(8):3595-3604.

Koirala A, Makkia RS, Cooper MJ, Naash MI. (2011). Nanoparticle-mediated gene transfer specific to retinal pigment epithelial cells. *Biomaterials*; 32(35):9483-9493.

Koirala A, Makkia RS, Conley SM, Cooper MJ, Naash MI. (2013). S/MAR-containing DNA nanoparticles promote persistent RPE gene expression and improvement in RPE65-associated LCA. *Human Molecular Genetics*; 22(8):1632-1642.

- Kollias AN, Ulbig MW. (2010). Diabetic retinopathy: Early diagnosis and effective treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*; 107(5):75-83.
- Konat Zorzi G, Contreras-Ruiz L, Parraga JE, Lopez-Garcia A, Romero Bello R, Diebold Y, Seijo B, Sanchez A. (2011). Expression of MUC5AC in ocular surface epithelial cells using cationized gelatin nanoparticles. *Molecular pharmaceuticals*; 8:1783–1788.
- Köping-Höggård M, Vårum KM, Issa M, Danielsen S, Christensen BE, Stokke BT, Artursson P. (2004). Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Therapy*; 11:1441-52.
- Kouvidi E, Papadopoulou-Daifoti Z, Thermos K. (2006). Somatostatin modulates dopamine release in rat retina. *Neuroscience letters*; 391:82-86.
- Kumar-singh R. (2008). Barriers for Retinal Gene Therapy: Separating Fact from Fiction. *Vision Research*; 48(16):1671–1680.
- Kur J, Newman EA, Chan-Ling T. (2012). Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina choroid in health disease. *Progress in Retinal and Eye Research*; 31(5):377–406.
- Kusari J, Zhou S, Padillo E, Clarke KG, Gil DW. (2007). Effect of memantine on neuroretinal function and retinal vascular changes of strepto- zotocin-induced diabetic rats. *Investigative ophthalmology & visual science*; 48(11):5152–5159.
- Lawnicka H, Stepień H, Wyczółkowska J, Kolago B, Kunert-Radek J, Komorowski J. (2000). Effect of somatostatin and octreotide on proliferation and vascular endothelial growth factor secretion from murine endothelial cell line (HECa10) culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 268(2):567–571.
- Lee SE, Ma W, Rattigan EM, Aleshin A, Chen L, Johnson LL, D'Agati VD, Schmidt AM, Barile GR. (2010). Ultrastructural features of retinal capillary basement membrane thickening in diabetic swine. *Ultrastructural pathology*; 34:35-41.
- Liao HW, Yau KW. (2007). In vivo gene delivery in the retina using polyethylenimine. *Biotechniques*; 42:285–288.
- Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY. (2012). Age-related macular degeneration. *Lancet*, 379(9827):1728–1738.
- Limb GA, Chignell AH, Green W, LeRoy F, Dumonde DC. (1996). Distribution of TNF alpha and its reactive vascular adhesion molecules in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy. *The British journal of ophthalmology*; 80:168–173
- Lin MT, Beal MF. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*; 443:787–795.
- Liu Y, Leo LF, McGregor C, Grivtishvili A, Barnstable CJ, Tombran-Tink J. (2012). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) peptide eye drops reduce inflammation, cell death and vascular leakage in diabetic retinopathy in Ins2(Akita) mice. *Molecular medicine*; 18:1387-1401.
- Longeras R, Farjo K, Ilnat M, Ma JX. (2012). A PEDF-derived peptide inhibits retinal neovascularization and blocks mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Experimental Diabetes Research*; 2012:518426.
- Luo D, Saltzman WM. (2000). Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface. *Nature biotechnology*; 18:893–895.
- Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh Jr. EN, 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. *The New England journal of medicine*; 358:2240–2248.
- Mao S, Sun W, Kissel T. (2010). Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Advanced drug delivery reviews*; 62(1):12-27.
- Maran, RJ, Toth I, Wimmer N, Brankov M, Rakoczy PE. (2005). Dendrimer delivery of an anti-VEGF oligonucleotide into the eye: a long-term study into inhibition of laser-induced CNV, distribution, uptake and toxicity. *Gene Therapy*. 12:1544-1550.

- Masuda I, Matsuo T, Yasuda T, Matsuo N. (1996) Gene transfer with liposomes to the intraocular tissues by different routes of administration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 37:1914–1920.
- Matsuda T, Cepko CL. (2004). Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 101:16–22.
- McLeod DS, Lefer DJ, Merges C, Lutty GA. (1995). Enhanced expression of intracellular adhesion molecule-1 and P-selectin in the diabetic human retina and choroid. *The American journal of pathology*; 147:642–653.
- Miller H, Miller B, Ryan SJ. (1986). The role of retinal pigment epithelium in the involution of subretinal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*; 27:1644–1652.
- Miller H, Miller B, Ishibashi T, Ryan SJ. (1990). Pathogenesis of laser-induced choroidal subretinal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*; 31(5):899–908.
- Mima A, Qi W, Yamamoto JH, Park K, Matsumoto M, Kitada M, Li Q, Mizutani K, Yu E, Shimada T, Lee J, Shoelson SE, Jobin C, Madsen CR, King GL. (2012). Retinal not systemic oxidative and inflammatory stress correlated with vegf expression in rodent models of insulin resistance and diabetes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 53(13):8424–8432.
- Mitra RN, Han Z, Merwin M, Al Taai M, Conley SM, Naash MI. (2014). Synthesis and characterization of glycol chitosan DNA nanoparticles for retinal gene delivery. *ChemMedChem*; 9(1):189–96.
- Mitra RN, Zheng M1, Han Z. (2016). Nanoparticle-motivated gene delivery for ophthalmic application. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*; 8(1):160–74.
- Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, Rohan R, Murata T, Clermont AC, Aiello LP, Ogura Y, Adamis AP. (1999). Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *PNAS USA*; 96:10836–10841
- Mo Y, Barnett ME, Takemoto D, Davidson H, Kompella UB. (2007). Human serum albumin nanoparticles for efficient delivery of Cu, Zn superoxide dismutase gene. *Molecular Vision*; 13:746–757.
- Moreira C, Oliveira H, Pires LR, Simões S, Barbosa MA, Pêgo AP. (2009) Improving chitosan-mediated gene transfer by the introduction of intracellular buffering moieties into the chitosan backbone. *Acta biomaterialia*; 5(8):2995–3006.
- Mori K, Duh E, Gehlbach P, Ando A, Takahashi K, Pearlman J, Mori K, Yang HS, Zack DJ, Etyreddy D, Brough DE, Wei LL, Campochiaro PA. (2001). Pigment epithelium-derived factor inhibits retinal and choroidal neovascularization. *Journal of Cellular Physiology*; 188(2):253–63.
- Mori K, Gehlbach P, Ando A, McVey D, Wei L, Campochiaro P. (2002a). Regression of ocular neovascularization in response to increased expression of pigment epithelium-derived factor. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43(7):2428–34.
- Mori K, Gehlbach P, Yamamoto S, Duh E, Zack DJ, Li Q, Berns KI, Raisler BJ, Hauswirth WW, Campochiaro PA. (2002b). AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 43(6):1994–2000.
- Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit JP. (2008). Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials*; 29:3477–96.
- Navarro JF, Mora-Fernandez C. (2006). The role of TNF-alpha in diabetic nephropathy: pathogenic and therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev*; 17:441–450.
- Nguyen-Legros J, Hicks D. (2000). Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *International Review of Cytology*, 196:245–313.
- Nimesh S, Thibault MM, Lavertu M, Buschmann MD. (2010). Enhanced gene delivery mediated by low molecular weight chitosan/DNA complexes: effect of pH and serum. *Molecular biotechnology*; 46:182–196.
- Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, Lambris JD, Chen Y, Zhang K, Ambati BK, Baffi JZ, Ambati J. (2006). Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 103:2328–

2333.

Ogata N, Wang L, Jo N, Tombran-Tink J, Takahashi K, Mrazek D, Matsumura M. (2001). Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. *Current Eye Research*; 22:245–252.

Ogata N, Nishikawa M, Nishimura T, Mitsuma Y, Matsumura M. (2002). Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium derived factor and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *American journal of ophthalmology*; 133:851–852

Palii SS, Caballero S Jr, Shapiro G, Grant MB. (2007). Medical treatment of diabetic retinopathy with somatostatin analogues. *Expert opinion on investigational drugs*; 16(1):73-82.

Park SH, Park JW, Park SJ, Kim KY, Chung JW, Chun MH, Oh SJ. (2003). Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia*; 46(9):1260-8.

Park K, Chen Y, Hu Y, Mayo AS, Kompella UB, Longeras R, Ma JX. (2009). Nanoparticle-mediated expression of an angiogenic inhibitor ameliorates ischemia-induced retinal neovascularization and diabetes-induced retinal vascular leakage. *Diabetes*, 58(8):1902–1913.

Pennesi ME, Neuringer M, Courtney RJ. (2013). Animal models of age related macular degeneration. *Molecular aspects of medicine*; 33(4):487-509.

Poor SH, Qiu Y, Fassbender ES, Shen S, Woolfenden A, Delpero A, Kim Y, Buchanan N, Gebuhr TC, Hanks SM, Meredith EL, Jaffee BD, Dryja TP. (2014). Reliability of the mouse model of choroidal neovascularization induced by laser photocoagulation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 55(10):6525-34.

Prow TW, Bhutto I, Kim SY, Grebe R, Merges C, McLeod DS, Uno K, Mennon M, Rodriguez L, Leong K, Luty GA. (2008). Ocular nanoparticle toxicity and transfection of the retina and retinal pigment epithelium. *Nanomedicine*; 4(4):340-9.

Puras G, Zarate J, Aceves M, Murua A, Díaz AR, Avilés-Triguero M, Fernández E, Pedraz JL. (2013). Low molecular weight oligochitosans for non-viral retinal gene therapy. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*; 83(2):131-140.

Qazi Y, Maddula S, Ambati BK. (2009). Mediators of ocular angiogenesis. *Journal of Genetics*; 88(4):495–515.

Rakic JM, Lambert V, Devy L, Luttun A, Carmeliet P, Claes C, Nguyen L, Foidart JM, Noël A, Munaut C. (2003). Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 44(7):3186-93.

Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A, Tang W, Yang X, Maguire AM, Bennett J, Tolentino MJ. (2003). Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Molecular Vision*; 9:210-6.

Reichlin S. (1983). Somatostatin. *The New England Journal of Medicine*; 309(24):1495-1501.

Ripps H, Witkovsky, P. (1985). Neuron-glia interaction in the brain and retina. *Progress in Retinal Research*. (Osborne, N. N. and Chader, G. J., Eds.); 4:181-219.

Robinson R, Barathi VA, Chaurasia SS, Wong TY, Kern TS. (2012). Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals. *Disease Models & Mechanisms*; 5:444–456.

Robson JG, Frishman LJ. (1998). Dissecting the dark-adapted electroretinogram. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*; 95:187–215.

Rosas LE, Grieves JL, Zaraspe K, La Perle KM, Fu H, McCarty DM. (2012). Patterns of scAAV vector insertion associated with oncogenic events in a mouse model for genotoxicity. *Molecular Therapy*; 20(11):2098-110.

Ryan SJ, Schachat AP, Wilkinson CP, Hinton DR, Sadda SR, Wiedemann P. (2013). Retina, 5th Edition. *Elsevier Publishing Group*.

Saari JC. (1987). Metabolism and photochemistry in the retina. *Adler's Physiology of the Eye Clinical Application*; p. 356-373.

Saishin Y, Saishin Y, Takahashi K, Lima e Silva R, Hylton D, Rudge JS, Wiegand SJ, Campochiaro PA. (2003). VEGF-TRAP(R1R2)

suppresses choroidal neovascularization and VEGF-induced breakdown of the blood-retinal barrier. *Journal of cellular physiology*; 195(2):241-8.

Sapieha P, Hamel D, Shao Z, Rivera JC, Zaniolo K, Joyal JS, Chemtob S. (2010). Proliferative retinopathies: angiogenesis that blinds. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; 42(1):5-12.

Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. (1994). STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*; 43(11):1326-1333.

Sergejeva O, Botov R, Liutkevičienė R, Kriaučiūnienė L. (2016). Genetic factors associated with the development of age-related macular degeneration. *Medicina (Kaunas)*; 52(2):79-88.

Shah RS, Soetikno BT, Yi J, Liu W, Skondra D, Zhang HF, Fawzi AA. (2016). Visible-light optical coherence tomography angiography for monitoring laser-induced choroidal neovascularization in mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 57(9):86-95.

Shaya FT, Aljawadi M. (2007). Diabetic retinopathy. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)*; 1(3):259-65.

Shen HH, Chan EC, Lee JH, Bee YS, Lin TW, Dusting GJ, Liu GS. (2015). Nanocarriers for treatment of ocular neovascularization in the back of the eye: new vehicles for ophthalmic drug delivery. *Nanomedicine (Lond.)*; 10(13):2093-107.

Shirao Y, Kawasaki K. (1998) Electrical responses from diabetic retina. *Progress in retinal and eye research*; 17:59-76.

Simó R, Carrasco E, Fonollosa A, García-Arumí J, Casamitjana R, Hernández C. (2007). Deficit of somatostatin in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema. *Diabetes Care*; 30(3):725-7.

Simó R, Villarroel M, Corraliza L, Hernández C, Garcia-Ramírez M. (2010). The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*; 2010:190724.

Simó R, Sundstrom JM, Antonetti DA. (2015). Ocular anti-VEGF for diabetic retinopathy: the role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*; 37:893-899.

Simó R, Hernández C. (2015). Novel approaches for treating diabetic retinopathy based on recent pathogenic evidence. *Progress in Retinal and Eye Research*; 48:160-180.

Simonovic M, Gettins PG, Volz K. (2001). Crystal structure of human PEDF, a potent anti-angiogenic and neurite growth-promoting factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 98(20):11131-5.

Simonsen SE. (1980). The value of the oscillatory potential in selecting juvenile diabetics at risk of developing proliferative retinopathy. *Acta ophthalmologica*; 58:865-78.

Solinís MÁ, del Pozo-Rodríguez A, Apaolaza PS, Rodríguez-Gascón A. (2014). Treatment of ocular disorders by gene therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*; 95(Pt B):331-42.

Sonoda S, Tachibana K, Uchino E, Okubo A, Yamamoto M, Sakoda K, Hisatomi T, Sonoda KH, Negishi Y, Izumi Y, Takao S, Sakamoto T. (2006). Gene transfer to corneal epithelium and keratocytes mediated by ultrasound with microbubbles. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 47:558-564.

Spranger J, Osterhoff M, Reimann M, Möhlig M, Ristow M, Francis MK, Cristofalo V, Hammes HP, Smith G, Boulton M, Pfeiffer AF. (2001). Loss of the anti-angiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease. *Diabetes*; 50:2641-2645.

Steinberg RH. (1985). Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Documenta Ophthalmologica*; 60(4):327-346.

Stenler S, Andersson A, Simonson OE, Lundin KE, Chen ZY, Kay MA, Smith CI, Sylvén C, Blomberg P. (2009). Gene transfer to mouse heart and skeletal muscles using a minicircle expressing human vascular endothelial growth factor. *Journal of cardiovascular pharmacology*; 53(1):18-23.

- Stitt AW, Curtis TM, Chen M, Medina RJ, McKay GJ, Jenkins A, Gardiner TA, Lyons TJ, Hammes HP, Simó R, Lois N. (2016). The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research*; 51:156–186.
- Strand SP, Lelu S, Reitan NK, De Lange Davies C, Artursson P, Vårum KM. (2010). Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking. *Biomaterials*; 31:975–987.
- Strauss O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews*; 85(3):845–881.
- Subramanian P, Locatelli-Hoops S, Kenealey J, DesJardin J, Notari L, Becerra SP. (2013). Pigment Epithelium-derived Factor (PEDF) Prevents Retinal Cell Death via PEDF Receptor (PEDF-R): Identification of a functional ligand binding site. *The Journal of Biological Chemistry*; 288(33):23928–23942.
- Sugino IK, Wang H, Zarbin MA. (2003). Age-related macular degeneration and retinal pigment epithelium wound healing. *Molecular Neurobiology*; 28:177–194.
- Tanelian DL, Barry MA, Johnston SA, Le T, Smith G. (1997). Controlled gene gun delivery and expression of DNA within the cornea. *Biotechniques*; 23:484–488.
- Tarallo V, Hirano Y, Gelfand BD, Dridi S, Kerur N, Kim Y, Cho WG, Kaneko H, Fowler BJ, Bogdanovich S, Albuquerque RJ, Hauswirth WW, Chiodo VA, Kugel JF, Goodrich JA, Ponicsan SL, Chaudhuri G, Murphy MP, Dunaief JL, Ambati BK, Ogura Y, Yoo JW, Lee DK, Provost P, Hinton DR, Núñez G, Baffi JZ, Kleinman ME, Ambati J. (2012). DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88. *Cell*; 149:847–859.
- Thermos K, Bagnoli P, Epelbaum J, Hoyer D. (2006). The somatostatin sst1 receptor: an autoreceptor for somatostatin in brain and retina. *Pharmacology & therapeutics*; 110:455–464.
- Timmers AM, Zhang H, Squitieri A, Gonzalez-Pola C. (2001). Subretinal injections in rodent eyes: effects on electrophysiology and histology of rat retina. *Molecular Vision*; 7:131-7.
- Tobe T, Ortega S, Luna JD, Ozaki H, Okamoto N, Derevjanić NL, Vinoses SA, Basilico C, Campochiaro PA. (1998). Targeted disruption of the FGF2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model. *The American journal of pathology*; 153(5):1641–1646.
- Tombran-Tink J, Johnson LV. (1989). Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 30:1700–1707.
- Tombran-Tink J, Barnstable CJ. (2003). PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. *Nature Reviews. Neuroscience*; 4(8):628–36.
- Tso MO, Kurosawa A, Benhamou E, Bauman A, Jeffrey J, Jonasson O. (1988). Microangiopathic retinopathy in experimental diabetic monkeys. *Transactions of the American Ophthalmological Society*; 86:389-421.
- Tyrber, M, Lindblad U, Melander A, Lövestam-Adrian M, Ponjavic V, Andréasson S. (2011). Electrophysiological studies in newly onset type 2 diabetes without visible vascular retinopathy. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*; 123:193–198.
- Tzeng TF, Liu WY, Liou SS, Hong TY, Liu IM. (2016). Antioxidant-Rich Extract from Plantaginis Semen Ameliorates Diabetic Retinal Injury in a Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Model. *Nutrients*; 8(9).
- Unzueta U, Ferrer-Mirallés N, Cedano J, Zikung X, Pesarrodonna M, Saccardo P, García-Fruitós E, Domingo-Espín J, Kumar P, Gupta KC, Mangués R, Villaverde A, Vázquez E. (2012). Non-amyloidogenic peptide tags for the regulatable self-assembly of protein-only nanoparticles. *Biomaterials*; 33(33):8714-22.
- Unzueta U, Saccardo P, Ferrer-Mirallés N, García-Fruitós E, Vázquez E, Villaverde A, Cortés F, Mangués R. (2013). Improved performance of protein-based recombinant gene therapy vehicles by tuning downstream procedures. *Biotechnology progress*; 29(6):1458-63.
- Unzueta U, Saccardo P, Domingo-Espín J, Cedano J, Conchillo-Solé O, García-Fruitós E, Céspedes MV, Corchero JL, Daura X, Mangués R, Ferrer-Mirallés N, Villaverde A, Vázquez E. (2014). Sheltering DNA in self-organizing, protein-only nano-shells as artificial viruses for gene delivery. *Nanomedicine*; 10(3):535-41.

- Valera A, Perales JC, Hatzoglou M, Bosch F. (1994). Expression of neomycin-resistance (neo) gene induces alterations in gene expression and metabolism. *Human gene therapy*; 5:449–456.
- Vázquez E, Roldán M, Diez-Gil C, Unzueta U, Domingo-Espín J, Cedano J, Conchillo O, Ratera I, Veciana J, Daura X, Ferrer-Mirallas N, Villaverde A. (2010a). Protein nanodisk assembling and intracellular trafficking powered by an arginine-rich (R9) peptide. *Nanomedicine*; 5(2):259-268.
- Vázquez E, Cubarsi R, Unzueta U, Roldán M, Domingo-Espín J, Ferrer-Mirallas N, Villaverde A. (2010b). Internalization and kinetics of nuclear migration of protein-only, arginine-rich nanoparticles. *Biomaterials*; 31(35):9333-9339.
- Verteporfin In Photodynamic Therapy Study Group. (2001). Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: two-year results of a randomized clinical trial including lesions with occult with no classic choroidal neovascularization—verteporfin in photodynamic therapy report 2. *American Journal of Ophthalmology*; 131(5):541-560.
- Virgili G, Parravano M, Menchini F, Evans JR. (2014). Anti-vascular endothelial growth factor for diabetic macular oedema. *The Cochrane database of systematic reviews*; 10:CD007419.
- Vitiello L, Chonn A, Wasserman JD, Duff C, Worton RG. (1996). Condensation of plasmid DNA with polylysine improves liposome-mediated gene transfer into established and primary muscle cells. *Gene Therapy*; 3:396-404.
- Wachtmeister L. (1998). Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Progress in Retinal Eye Research*; 17:485-521.
- Wegewitz U, Göhring I, Spranger J. (2005). Novel approaches in the treatment of angiogenic eye disease. *Current Pharmaceutical Design*; 11(18):2311–30.
- Winkler BS, Boulton ME, Gottsch JD, Sternberg P. (1999). Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Molecular Vision*; 5:32.
- Woltering EA. (2003). Development of targeted somatostatin-based antiangiogenic therapy: a review and future perspectives. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*; 18:601–609.
- Wu Z, Yang H, Colosi P. (2010). Effect of genome size on AAV vector packaging. *Molecular therapy*; 18:80–86.
- Wu Q, Blakeley LR, Cornwall MC, Crouch RK, Wiggert BN, Koutalos Y. (2007). Interphotoreceptor retinoid-binding protein is the physiologically relevant carrier that removes retinol from rod photoreceptor outer segments. *Biochemistry*; 46(29):8669-8679.
- Xu J, Zhu D, Sonoda S, He S, Spee C, Ryan SJ, Hinton DR. (2012). Over-expression of BMP4 inhibits experimental choroidal neovascularization by modulating VEGF and MMP-9. *Angiogenesis*; 15(2):213-27.
- Xu KP, Yu FS. (2007). Cross talk between c-Met and epidermal growth factor receptor during retinal pigment epithelial wound healing. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 48:2242–2248.
- Yu H, Chen L, Jiang J. (2010). Administration of pigment epithelium-derived factor delivered by adeno-associated virus inhibits blood–retinal barrier breakdown in diabetic rats. *Molecular Vision*; 16:2384-94..
- Yue Z, Wei W, Lv P, Yue H, Wang L, Su Z, Ma G. (2011). Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules*; 12:2440–2446.
- Zhang C, Wang YS, Wu H, Zhang ZX, Cai Y, Hou HY, Zhao W, Yang XM, Ma JX. (2010) Inhibitory efficacy of hypoxia-inducible factor 1alpha short hairpin RNA plasmid DNA-loaded poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles on choroidal neovascularization in a laser-induced rat model. *Gene Therapy*; 17:338–351.
- Zhang SX, Ma JX, Sima J, Chen Y, Hu MS, Ottlecz A, Lambrou GN. (2005). Genetic difference in susceptibility to the blood-retina barrier breakdown in diabetes and oxygen-induced retinopathy. *The American journal of pathology*; 166(1):313–321.
- Zhang SX, Wang JJ, Gao G, Parke K, Ma J. (2006a). Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *Journal of Molecular*

Endocrinology; 37(1), 1–12.

Zhang SX, Wang JJ, Gao G, Shao C, Mott R, Ma J. (2006b). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous antiinflammatory factor. *The FASEB Journal*; 20(2):323–5.

Zhou HY, Hao JL, Wang S, Zheng Y, Zhang WS. (2013). Nanoparticles in the ocular drug delivery. *International journal of ophthalmology*; 6(3):390-6.

Zhou J, Pham L, Zhang N, He S, Gamulescu MA, Spee C, Ryan SJ, Hinton DR. (2005). Neutrophils promote experimental choroidal neovascularization. *Molecular Vision*; 11:414-24.

Zhu X, Zou H. (2012). PEDF in diabetic retinopathy: a protective effect of oxidative stress. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*; 2012:580687.

