

FACTORS ANGIOGÈNICS EN LA RETINOPATIA DIABÈTICA PROLIFERATIVA

MARTA GARCIA-RAMÍREZ, CRISTINA HERNÁNDEZ, ESTHER CARRASCO I RAFAEL SIMÓ

*Unitat de Recerca en Diabetis i Metabolisme, Institut de Recerca Hospital Universitari
Vall d'Hebron. Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Rafael Simó. Unitat de Recerca en Diabetis i Metabolisme,
Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron.

Pg. Vall d'Hebron, 119-129. 08035 Barcelona. Adreça electrònica: rsimo@ir.vhebron.net.

RESUM

La retinopatia diabètica és la causa principal de ceguesa en els individus en edat laboral. Entre les primeres troballes histològiques, tenim el dany neuroretinià, l'engruiximent de la membrana basal dels capillars i la pèrdua dels pericits i de les cèl·lules endotelials. La neovascularització, punt clau en la retinopatia diabètica proliferativa (PDR), succeeix en els estadis avançats i és la causa principal de ceguesa en la diabetis tipus 1. L'edema macular és una altra complicació de la diabetis i que és responsable principal de la pèrdua de visió, principalment en els casos de diabetis tipus 2. L'extravasació del contingut vascular, com a conseqüència del trencament de la barrera hematoretinal, és el fet principal present en la seva patogènesi. Llevat dels controls repetits de glucèmia i de tensió arterial, el tractament per fotocoagulació per làser és l'única eina útil contra la progressió de la retinopatia diabètica. Per tant, diversos nous tractaments farmacològics, basats en la comprensió dels mecanismes patofisiològics de la retinopatia diabètica, han estat desenvolupats en els darrers anys.

Hi ha una creixent evidència que suggereix que diversos factors angiogènics duen a terme una funció crucial en el desenvolupament de la PDR. Entre aquests, el factor de creixement endotelial vascular (VEGF) és el més rellevant. Altres factors de creixement o citocines, com són el factor de creixement semblant a la insulina de tipus 1 (IGF-I), el factor de creixement del hepatòcits (HGF), el factor de creixement bàsic dels fibroblasts (b-FGF), el factor de creixement derivat de les plaquetes (PDGF), les citocines proinflamàtores i les angiopoetines, també estan implicats en la patogènesi de la PDR.

Paraules clau: retinopatia diabètica, factors angiogènics, humor vitri.

SUMMARY

Diabetic retinopathy is the leading cause of legal blindness among working-aged individuals.

Neuroretinal damage, thickening of the capillary basement membrane and a loss of pericytes and endothelial cells are among the earliest histological features. Neovascularization, the hallmark of proliferative diabetic retinopathy (PDR), occurs in the advanced stages and is the main cause of blindness in type 1 diabetes. Macular edema is another retinal complication of diabetes that is responsible for a major part of vision loss, particularly in type 2 diabetes. Vascular leakage, as a consequence of a breakdown in the blood retinal barrier, is the main event involved in its pathogenesis. Apart from controlling blood glucose and blood pressure, laser photocoagulation treatment is the only tool in the current armamentarium against diabetic retinopathy progression. Therefore, new pharmacological treatments, based on an understanding of the patho-physiological mechanisms of diabetic retinopathy, have been developed in recent years.

There is mounting evidence to suggest that angiogenic factors play a crucial role in PDR development, with vascular endothelial growth factor (VEGF) being the most relevant. Other growth factors or cytokines, such as insulin-like growth factor I (IGF-1), hepatocyte growth factor (HGF), basic fibroblast growth factor (b-FGF), platelet derived growth factor (PDGF), pro-inflammatory cytokines and angiopoietins, are also involved in the pathogenesis of PDR.

Keywords: diabetic retinopathy, angiogenic factors, vitreous.

Abreviacions

AGE advanced glycosylation end-products (productes finals de la glicosilació avançada)
 ARMD degeneració macular relacionada amb l'edat (age-related macular degeneration)
 BREC cèl·lula de l'endoteli microvascular de la retina bovina (bovine retinal microvascular endothelial cell)
 CTGF factor de creixement del teixit connectiu (connective tissue growth factor)
 bFGF factor de creixement bàsic del fibroblast (basic fibroblast growth factor)
 GH hormona del creixement (growth hormone)
 HGF factor de creixement de l'hepatòcit (hepatocyte growth factor)
 HIF-1 factor 1 induïble de la hipòxia (hypoxia-inducible factor 1)
 HREC cèl·lula de l'endoteli de la retina humana (human retinal endothelial cell)
 HSPG proteoglicà heparan sulfat (heparan sulfate proteoglycan)
 IGF factor de creixement semblant a la insulina (insulin-like growth factor)
 IGFBP proteïna d'unió a IGF (IGF binding protein)
 MMP metal·loproteasa de matriu (matrix metalloproteinase)
 NO òxid nítric (nitric oxide)
 OIR retinopatia induïda per oxigen (oxygen-induced retinopathy)
 PDR retinopatia diabètica proliferativa (proliferative diabetic retinopathy)
 PKC proteïna-cinasa C (protein kinase C)
 PIGF factor de creixement placentari (placental growth factor)

PDGF factor de creixement derivat de plaquetes (platelet-derived growth factor)
 PEDF factor pigmentari derivat de l'epiteli (pigment epithelium-derived factor)
 PVR vitreoretinopatia proliferativa (proliferative vitreoretinopathy)
 SDF-1 factor 1 derivat de cèl·lules de l'estroma (stromal cell-derived factor-1)
 SS somatostatina (somatostatin)
 RPE epiteli pigmentari de la retina (retinal pigment epithelium)
 TGF factor de creixement transformador (transforming growth factor)
 TIMP inhibidor histològic de metal·loproteases (tissue inhibitor of metalloproteinase)
 TSP trombospondina (thrombospondin)
 VCAM-1 molècula 1 d'adhesió vascular (vascular adhesion molecule 1)
 VEGF factor de creixement de l'endoteli vascular (vascular endothelial growth factor)

INTRODUCCIÓ

La retinopatia diabètica continua sent la causa principal de ceguesa en individus en edat laboral en països desenvolupats (Moss i Klein, 1998). L'edema macular, un esdeveniment important que apareix tal com progressa la retinopatia, és més freqüent en diabetes ti-

pus 2. Encara que l'edema macular diabètic no ocasiona la ceguesa total, porta amb freqüència a una pèrdua severa de la visió central. En un estudi ampli de població, la incidència d'edema macular durant un període de deu anys fou del 20,1 % en pacients amb diabetis tipus 1, mentre que la taxa fou gairebé del 40 % en pacients amb diabetis tipus 2 (Tong *et al.*, 2001). A més, la maculopatia és gairebé sempre present quan es detecta la malaltia proliferativa en pacients amb diabetis tipus 2 (Klein *et al.*, 1984).

Un control més estret dels nivells de glucosa en sang (UK Prospective Diabetes Study Group, 1998a) i de la hipertensió (UK Prospective Diabetes Study Group, 1998b) és essencial en la prevenció o l'aturada de la progressió de la malaltia ocular diabètica. Un tractament oportú de fotocoagulació amb làser de la retina, poc després del començament de la PDR, redueix la incidència de la pèrdua severa de visió en els ulls afectats d'un 50 % en cinc anys a un 5 % (Fine i Patz, 1987). Tanmateix, quasi sempre se sobrepassa el moment òptim per al tractament amb làser i, a més, no es té un èxit uniforme en l'aturada de la pèrdua visual. També, la fotocoagulació té efectes collaterals, que sovint inclouen una pèrdua de camp de visió i un deteriorament de l'adaptació a la foscor o de la visió en color. La cirurgia vitreo-retiniana és un tractament car i complicat que només hauria de ser practicat per especialistes amb experiència en aquest tema, i normalment es reserva per a fases avançades de la PDR, tal com l'hemorràgia severa vítria o desprendiment secundari de retina. Cal notar que una fotocoagulació adequada i oportuna farà innecessàries la majoria de les vitrectomies. A més, la cirurgia vitreo-retiniana no restableix la visió útil en almenys el 30 % dels casos amb retinopatia diabètica avançada (Barry, 1997).

Per totes aquestes raons, es necessiten tractaments farmacològics nous, basats en la comprensió dels mecanismes fisiopatològics de la retinopatia diabètica. En els darrers anys, s'ha incrementat el coneixement sobre el pa-

per dels factors angiogènics en la patogènesi de la retinopatia diabètica (Mitamura *et al.*, 2005). A més, cal esmentar que no solament els factors angiogènics, sinó també els anti-angiogènics, són crucials per a determinar la progressió de la retinopatia diabètica. Tanmateix, aquesta revisió se centra en el paper dels factors angiogènics en el desenvolupament de la retinopatia diabètica i en les implicacions terapèutiques que se'n deriven.

EL FACTOR DE CREIXEMENT ENDOTELIAL VASCULAR

El factor de creixement endotelial vascular (VEGF) és un mitogen potent per a cèl·lules endotelials microvasculars i macrovasculars, i té un paper clau en l'angiogènesi fisiològica i patològica (Ferrara i Davis-Smyth, 1997). El VEGF el poden sintetitzar nombrosos tipus cel·lulars de la retina, incloent-hi les cèl·lules pigmentàries retinals (RPE), els pericits, les cèl·lules endotelials, les cèl·lules gials, els fibroblasts coroidals, les cèl·lules de Müller i les cèl·lules ganglionars (Adamis *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1994; Aiello *et al.*, 1995; Pierce *et al.*, 1995; Thieme *et al.*, 1995). Hi ha treballs importants que mostren la participació crítica del VEGF en el desenvolupament vascular de la retina i la seva supervivència, i s'ha suggerit que el VEGF manté la integritat de les cèl·lules endotelials mitjançant la senyalització antiapoptòtica (Murata *et al.*, 1996).

S'han mostrat diversos mecanismes de participació en la regulació de l'expressió gènica del VEGF, un del més importants dels quals és la hipòxia. L'activació transcripcional, que porta a l'increment de VEGF en resposta a la hipòxia, és mitjançat sobretot pel factor 1 induïble per hipòxia (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) (Wuang *et al.*, 1995). Fent servir el model de ratolí d'OIR, Ozaki *et al.* (1999) van mostrar que els nivells incrementats de HIF-1 α tenien una correlació espacial i temporal amb l'expressió augmentada del VEGF.

Aquesta troballa era consistent amb la hipòtesi que l'HIF-1 pot tenir un paper en la regulació de VEGF en la retina isquèmica. Recentment, hem notat la presència de HIF-1 α en l'humor vitri de pacients diabètics amb PDR, però no en individus control. A més, es va detectar una relació clara entre l'HIF-1 α intravitri i el VEGF (dades per publicar) (vegeu la figura 1).

La concentració de glucosa és un altre factor important involucrat en l'expressió del VEGF. En aquest aspecte, tant els nivells alts de glucosa a llarg termini com la privació aguda de glucosa poden incrementar el VEGF en cèl·lules bovines cultivades amb RPE (Sone *et al.*, 1996). La producció d'AGE pot ser un dels mecanismes pels quals la hiperglucèmia crònica és capaç d'estimular l'expressió de l'mRNA del VEGF i, inversament, pot explicar les propietats angiogèniques dels AGE (Lu *et al.*, 1998; Treins *et al.*, 2001). Tot pensant això, s'ha informat que la injecció intravítrea d'AGEs en rates i conills incrementava els nivells de l'mRNA del VEGF en la capa de cèl·lules ganglionars, la capa nuclear interna i la del RPE de la retina. Aquest efecte era dependent de dosi i del temps, additiu amb hipòxia, i es podia blocar fent servir anticossos anti-VEGF. A més l'activació de l'HIF-1 α mitjançant AGE, a través d'una ruta dependent d'ERK regulada extracel·lularment, pot estar involucrada en l'expressió del VEGF mitjançada per AGE. Finalment, s'ha observat la relació entre AGE i VEGF en l'humor vitri (Matsumoto *et al.*, 2001) i en retines de pacients diabètics (Murata *et al.*, 1997). A més de la hipòxia i els AGE, tot un conjunt de factors de creixement, incloent-hi el factor de creixement semblant a la insulina (IGF-1), FGF i els factors de creixement derivats de plaquetes, poden incrementar l'expressió de l'mRNA del VEGF; i tal com aquests factors de creixement, les citocines inflamatòries (és a dir, IL-1 α , IL-6) i diverses hormones i oncogens, poden també incrementar l'expressió de l'mRNA del VEGF (Ferrara, 2004). Tanmateix, en el context d'aquesta re-

visió, és important notar la relació, observada per diversos investigadors, entre la insulina i l'expressió del VEGF. Lu *et al.* (1999) van informar que la insulina incrementava l'mRNA del VEGF i els nivells de proteïna en cèl·lules de l'RPE mitjançant la transcripció millorada del gen del VEGF. A més, Poulaki *et al.* (2002) van demostrar que la teràpia aguda intensiva amb insulina produïa un empitjorament transitori de la disrupció de la barrera hemato-retinal, a través d'un increment mitjançat per l'HIF-1 α en l'expressió del VEGF retinal. Conjuntament, aquestes troballes poden contribuir a la comprensió de l'empitjorament transitori de la retinopatia diabètica, que pot succeir després de la implantació d'una teràpia d'insulina intensiva.

El VEGF exerceix la seva acció, fonamentalment, mitjançant dos receptors de tirosinacinasas d'alta afinitat (vegeu la figura 2). Hi ha moltes proves que suggereixen que els VEGFR s'expressen en la retina; sembla que el VEGFR-1 és el receptor predominant en els petits vasos de la retina humana normal, mentre que l'expressió del VEGFR-2 s'incrementa durant el desenvolupament de la retinopatia diabètica (Smith *et al.*, 1999). Recentment, l'ús de ribozims de VEGFR-1 i VEGFR-2 injectats intravítrealment en el ratolí model d'OIR, ha mostrat que el VEGFR-2 és més important que el VEGFR-1 en la proliferació de la retina (Grant *et al.*, 2004).

S'ha informat a bastament que el VEGF i els seus receptors augmenten en les retines dels models animals de retinopatia isquèmica (Suzuma *et al.*, 1998) o diabetis (Ellis *et al.*, 2000), i també en les retines de pacients diabètics (Boulton *et al.*, 1998). A més, no hi ha dubte que el VEGF és crític en la patogènesi de la PDR i l'edema macular. S'ha vist que la concentració de VEGF és molt superior en l'humor vitri de pacients amb PDR que en els individus control sense diabetis, i es relaciona amb l'activitat de la retinopatia (Aiello *et al.*, 1994; Burgos *et al.*, 1997; Simó *et al.*, 2002). Cal notar que els nivells intravítreis de VEGF de-

tectats en pacients amb PDR estan en el mateix rang que els que indueixen neovascularització *in vitro*. En conseqüència, l'acumulació vítria de VEGF, derivada de l'àmplia producció d'aquest factor per la retina isquèmica, pot contribuir significativament a la neovascularització intraocular.

Els mecanismes pels quals el VEGF indueix la neovascularització en la PDR són multifactorials. Òbviament, l'increment en el nivell de VEGF induït per la hipòxia i els AGE, i també l'increment de VEGFR, poden ser crucials pel seu efecte angiogènic. A part de l'efecte mitogènic, el VEGF té altres propietats que contribueixen a la neovascularització. El VEGF indueix l'expressió de proteases i fa minvar significativament els inhibidors de les metalloproteïnases TIMP-1 i TIMP-2 en les cèl·lules endotelials (Lamoreaux *et al.*, 1998). Un altre mecanisme pel qual el VEGF podria promoure l'angiogènesi seria mitjançant l'increment de la molècula d'adhesió vascular 1 (VCAM-1). En aquest sentit, hem comunicat l'existència de correlació directa entre el VCAM-1 i el VEGF en l'humor vitri de pacients diabètics amb PDR (Hernández *et al.*, 2001).

També se sap que el VEGF és un factor de permeabilitat vascular (VPF), a causa de la seva habilitat per a induir vessament vascular. En algunes capes vasculars aquest efecte està associat amb el desenvolupament de fenestracions en l'endoteli de vècules petites o capil·lars. El mecanisme principal pel qual el VEGF indueix el vessament vascular en la retina és mitjançant la davallada del nivell i l'activitat d'*occludens* i *zonula occludens* 1 (ZO-1), dues proteïnes essencials per a la integritat de les unions hermètiques (*tight junctions*) (Antonetti *et al.*, 1999), o també mitjançant l'augment del transport vesicular (Hofman *et al.*, 2000). Diversos estudis han subratllat el paper crític del NO en la permeabilitat vascular induïda pel VEGF, i també en l'angiogènesi (Parenti *et al.*, 1998; Fukumura *et al.*, 2001).

El paper essencial del VEGF en la neovas-

cularització retinal ha impulsat el desenvolupament d'inhibidors del VEGF en estudis experimentals. Per tal d'evitar els efectes col·laterals sistèmics, s'ha fet servir l'administració intravítrea d'agents anti-VEGF, en lloc de l'administració sistèmica. Hi ha hagut diversos estudis preclínic, en els quals s'han fet servir diverses estratègies, tals com la neutralització mitjançant anticossos monoclonals (Adams *et al.*, 1996), l'ús d'oligonucleòtids antisentit per a inhibir l'expressió del VEGF (Robinson *et al.*, 1996), o el blocatge dels receptors del VEGF mitjançant proteïnes receptores quimèriques (Aiello *et al.*, 1995). Per tal com la PKC- β és especialment elevada en la diabetis i està involucrada en la transducció de senyals dels receptors del VEGF, hi ha hagut intents d'inhibir la neovascularització retinal mitjançant inhibidors de la PKC- β en models animals (Danis *et al.*, 1998; Seo *et al.*, 1999; Saishin *et al.*, 2003). Els resultats d'un assaig clínic en què es va fer servir ruboxistaurina van mostrar l'efectivitat d'aquest inhibidor de la PKC- β (Eli Lilly) en la reducció de la pèrdua visual (Milton *et al.*, 2003).

A més de la ruboxistaurina, actualment tenim dos agents anti-VEGF sota investigació clínica: el ranibizumab (un anticòs monoclonal anti-VEGF humanitzat i recombinant) i el pegaptanib (un aptàmer anti-VEGF pegilat). El ranibizumab (rhu-Fab V2, Lucentis, Genentech, Inc., San Francisco, CA) uneix les quatre isoformes del VEGF i n'inhibeix la permeabilitat vascular i l'angiogènesi. Actualment es duen a terme les proves clíniques en fase III, amb la utilització de l'administració intravítrea en la degeneració macular relacionada amb l'edat (*age-related macular degeneration*, ARMD) amb neovascularització coroidal. El pegaptanib (Macugen, Eyetec Pharmaceuticals, Inc, Nova York) uneix i bloca l'activitat de la isoforma VEGF-165, i recentment s'ha informat de l'efectivitat de l'administració intravítrea per a l'ARMD neovascular (Gragoudas *et al.*, 2004). A més, la inclusió per a les proves clíniques en fase IIb pel tractament de l'edema

macular diabètic va acabar el juliol de 2003; i les dades preliminars són prometedores. Tanmateix, i pel que coneixem, no hi ha cap estudi en marxa pel tractament o la prevenció de la PDR.

Per acabar, cal tenir en compte que l'ús de la teràpia gènica intravítrea ha obert noves vies per al tractament de la PDR. De fet, la teràpia gènica ofereix certs avantatges: 1) l'ull és accessible, i es tracta d'un lloc immunoprivilegiat; 2) el lliurament intravítrea de vectors vírics, que codifiquen agents antiangiogènics, en permet la producció local al llarg d'un període prolongat de temps, i d'aquesta manera es redueix la freqüència de les injeccions intravítrees o parenterals; 3) es pot avaluar l'efectivitat del tractament de manera no invasiva i 4) s'eliminen la toxicitat sistèmica i els efectes collaterals que resulten de la inhibició de l'angiogènesi sistèmica durant un període llarg de temps. En aquest punt, s'han dut a terme amb èxit estudis experimentals amb vectors vírics que codificaven receptors solubles del VEGF, per bloquejar-ne l'activitat.

EL FACTOR DE CREIXEMENT SEMBLANT A LA INSULINA

El factor de creixement semblant a la insulina (*Insulin-like growth factor 1*, IGF-1) estimula el creixement, la diferenciació i el metabolisme de diferents tipus cel·lulars, i té un paper important en el creixement embrionari i postnatal. A més, els seus nivells sistèmics regulen la secreció de l'hormona del creixement (GH) mitjançant retroalimentació negativa (Le Roith *et al.*, 2001). L'IGF-1 se sintetitza en el fetge i, en menor mesura, en teixits no hepàtics. Diversos estudis *in vitro* han mostrat l'expressió de l'IGF-1 en cèl·lules endotelials microvasculars, pericits i cèl·lules epitelials pigmentàries de la retina (*retinal pigment epithelial cells*, RPE). A més, s'ha trobat expressió de l'IGFR-1 en cultius de cèl·lules endotelials de retina humana (*human retinal endothelial*

cells, HREC) i RPE (Ocrant *et al.*, 1991). També, les IGFBP són sintetitzades per cèl·lules de la retina (Giannini *et al.*, 1997). Aquests descobriments suggereixen que el complex IGF-1/IGF-1R/IGFBP participa en esdeveniments fisiològics que tenen lloc a la retina. De fet, l'IGF-1 i els seus anàlegs allarguen la supervivència de les cèl·lules neuroretinals i de les HREC sota condicions d'hipòxia, privació de sèrum o concentracions altes de glucosa (Seigel *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2001). Recentment, Hellström *et al.* (1999) van examinar la morfologia de vasos de la retina mitjançant l'anàlisi digital de fotografies del fundus ocular preses de pacients amb defectes genètics en l'eix GH/IGF-I i nivells baixos d'IGF-I. Van demostrar que els pacients tenien una vascularització de la retina significativament menor i, així van provar que l'IGF-I era crític per a la vascularització normal de la retina humana. En aquest punt, vam trobar que la contribució de l'IGF-I lliure en l'IGF-I total en l'humor vítreu era del 42% en els controls no diabètics. Aquest percentatge sobrepassava en gran mesura el que s'havia obtingut en sèrum (< 1%) i, per tant, suggeria no solament que una quantitat significativa de l'IGF-1 lliure es produïa intraocularment, sinó que també tenia un paper important en l'homeòstasi de la retina (Simó *et al.*, 2003).

Encara que s'ha insistit molt en el paper accelerador de l'IGF-1 sèric en el desenvolupament de la retinopatia diabètica, els resultats dels estudis clínics han estat controvertits, i el concepte no ha estat recolzat per estudis clínics d'intervenció (Janssen *et al.*, 2000). Més important que els nivells circulants de l'IGF-1 és la producció intraocular. Diversos tipus de cèl·lules de la retina, com ara les endotelials o les RPE, expressen a la vegada l'IGF-1 i el seu receptor, i aquesta expressió és independent dels nivells de GH. S'ha vist que l'IGF-1 injectat per via intravítrea induïx la neovascularització de la retina en conills (Grant *et al.*, 1993) i en porcs (Danis *et al.*, 1997), i que també induïx el col·lapse de la barrera hemato-retinal

en rates (Poulaki *et al.*, 2004). Recentment, Ruberte *et al.* (2004) van demostrar que uns ratolins transgènics que sobreexpressaven l'IGF-1 en la retina desenvolupaven la majoria de les alteracions observades en la malaltia de l'ull diabètic humà, i que la neovascularització era conseqüent amb la inducció incrementada per l'IGF-1 de l'expressió del VEGF en les cèl·lules glials de la retina. Tanmateix, s'ha de tenir en compte que en tots aquests estudis l'IGF-1 va ser administrat en dosis suprafisiològiques i en models animals no diabètics. Diversos autors, de fet, no han observat efectes mitogènics quan l'IGF-1 s'afegia en concentracions fisiològiques a cèl·lules endotelials de la retina cultivades. Mc Bain *et al.* (2003) van examinar els efectes de la concentració de glucosa en la resposta de les BREC a l'IGF-1, i van trobar que l'IGF-1 fa pujar significativament el creixement cel·lular en les BREC exposades a baixos nivells de glucosa (5 mmol/l), però no en les que eren exposades a alts nivells (20 mmol/l). A més, s'ha demostrat en rates que tant la hipòxia (Averbukh *et al.*, 1998) com la diabetis (Lowe *et al.*, 1995) produïen una devallada significativa en els nivells de l'mRNA de l'IGF-1 de la retina; també s'ha vist que tant la proteïna immunoreactiva com l'mRNA de l'IGF-1 es reduïen en casos de HREC d'origen diabètic, en comparació amb cultius no diabètics de HREC (Spoerri *et al.*, 1998). Gerhardinger *et al.* (2001) van informar d'una disminució tres vegades superior en els nivells de mRNA de l'IGF-1 en retines obtingudes *post mortem* de donants humans diabètics, amb, suposadament, només una microangiopatia retinal incipient, comparat amb retines de donants no diabètics, emparellats pel que fa a l'edat. A més, encara que es van trobar nivells elevats d'IGF-1 en l'humor vitri de pacients diabètics amb PDR, vàrem demostrar que la difusió sèrica era el factor principal que justificava aquest increment (Burgos *et al.*, 2000; Simó *et al.*, 2003) i que hi havia un dèficit d'IGF-1 lliure en l'humor vitri dels pacients amb PDR, comparat amb els pacients control,

no diabètics. Aquests descobriments suggereixen que en pacients amb PDR hi ha una producció més baixa d'IGF-1 lliure per part de la retina (Simó *et al.*, 2003). A més, no es va observar cap relació entre l'IGF-1 lliure intravitri i l'activitat de la PDR o el VEGF intravitri (Simó *et al.*, 2002). Recentment Kondo *et al.* (2003), fent servir el model OIR, han demostrat que els ratolins amb una genoanul·lació específica en cèl·lules de l'endoteli vascular pel receptor de l'IGF-1 (VENIFARKO) només mostraven un 34 % de reducció en la neovascularització, comparat amb el ratolí salvatge, i mostraven una reducció molt lleu en el VEGF, eNOS i l'endotelina 1. Aquests resultats, presos en conjunt, suggereixen que, encara que l'IGF-1 participa en la patogènesi de la retinopatia diabètica, no és l'efector principal de la neovascularització ocular, i el seu paper concret encara s'ha d'establir.

Estudis pilot recents que fan servir anàlegs de SS en pacients amb RDP inicial o retinopatia diabètica severa no proliferativa revelen una incidència disminuïda de la progressió a PDR que necessita tractament de làser panretinal o cirurgia vitreoretinal (Boehm *et al.*, 2001). Actualment es porta a terme un gran assaig clínic multicèntric amb un anàleg de SS de llarga durada (Sandostatin LARÒ, Novartis Pharmaceutical), i sembla que els resultats podrien encetar una estratègia nova en el tractament de la retinopatia diabètica. Tanmateix, el mecanisme principal que justificués la utilitat potencial dels anàlegs de SS en el tractament de la retinopatia diabètica podria estar relacionat amb les seves propietats antiangiogèniques, més que amb la seva capacitat de disminuir els nivells d'IGF-1 en circulació.

EL FACTOR DE CREIXEMENT DERIVAT DE LES PLAQUETES

El factor de creixement derivat de les plaquetes (*Platelet-derived growth factor*, PDGF), una proteïna purificada originàriament a par-

tir de plaquetes humanes, és sintetitzat per molts tipus cel·lulars diferents, incloent-hi la retina (Heldin *et al.*, 1999). Juntament amb els VEGF, els PDGF formen una família de factors de creixement amb un domini de factor de creixement altament conservat, l'anomenat *domini d'homologia PEDGF/VEGF*. Les isoformes PDGF produeixen els seus efectes en cèl·lules diana mitjançant l'activació de dos receptors tirosina-cinasa proteínics relacionats estructuralment (receptors α i β) (Matsui *et al.*, 1989).

El PDGF ha estat implicat en la PDR, i també en la vitreoretinopatia proliferativa (PVR). S'ha vist que el PDGF actua com un factor de creixement paracrí per a cèl·lules RPE en cultiu, que n'estimula la proliferació i la quimiotaxi (Campochiario *et al.*, 1994), i que mitjança la contractió del teixit fibrovascular que produeix el desprendiment de retina (Carrington *et al.*, 2000). A més, el PDGF-B indueix l'expressió de l'endotelina 1 en pericits cultivats de retina bovina. A part, l'expressió de l'endotelina 1, induïda pel PDGF-B en ratolins diabètics, és inhibida per inhibidors de PKC (Yokota *et al.*, 2003). Diversos estudis immunocitoquímics han mostrat la presència de PDGF i els seus receptors en les membranes epiretinals en casos de retinopatia diabètica (Robbins *et al.*, 1994). També, s'han descrit nivells incrementats de PDGF en l'humor vitri de pacients amb PVR i PDR (Freyberger *et al.*, 2000). En ratolins diabètics, no s'ha trobat que l'expressió retinal de l'mRNA del PDGF-B estigui incrementada, i un tractament amb l'inhibidor específic de la isoforma PKC- β (LY333531) va normalitzar l'expressió del PDGF-B (Yokota *et al.*, 2003). Tanmateix, altres autors han trobat una reducció en els nivells de l'mRNA del PDGF-B en la retina de ratolins diabètics (Cox *et al.*, 2003).

La hipòxia i la hiperglucèmia incrementen la producció de PDGF en cèl·lules endotelials vasculares humanes i pericits bovins cultivats (Mizutani *et al.*, 1995). El PDGF-B és un factor de supervivència potent per a la microvasculatura retinal, en general i per als pericits,

en particular. De fet, quan s'indueix la diabetis en ratolins transgènics amb només un allel funcional per al PDGF, hi ha una pèrdua major de pericits retinals, en comparació amb els controls salvatges diabètics, que afavoreixen el desenvolupament de vasos sanguinis nous (Hammes *et al.*, 2002). La inhibició del PDGF en un model de ROP promou la pèrdua de pericits i incrementa l'expressió retinal del VEGF i el VEGF-2 (Wilkinson-Berka *et al.*, 2004). Però també, la sobreexpressió del PDGF-A en la retina condueix a una proliferació no vascular de les cèl·lules gials, semblant al que ocorre amb la PVR humana (Mori *et al.*, 2002). A més, els ratolins transgènics que mostren sobreexpressió del PDGF-B desenvolupen una proliferació de cèl·lules entoteliales, pericits i cèl·lules gials que menen a un desprendiment de retina de tracció, tal com es veu en els estadis finals de la retinopatia diabètica. Tanmateix, sembla que el PDGF actua com factor de supervivència, i és necessari per a la vascularització normal de la retina; la sobreexpressió, però, pot ser deletèria i, en conseqüència, pot ser un mitjancer clau en la patogènesi de la PDR. Ikuno *et al.* (2002), han mostrat recentment l'atenuació significativa de la PVR en un ratolí model, amb l'expressió d'un retrovirus d'un receptor α PDGF negatiu dominant (una versió truncada del receptor).

EL FACTOR DE CREIXEMENT BÀSIC DEL FIBROBLAST

El factor de creixement bàsic del fibroblast (*Basic fibroblast growth factor*, bFGF), o FGF-2 és el membre prototip de la família dels FGF, que conté més de vint proteïnes d'unió heparina relacionades estructuralment i, tal com el VEGF, és un dels inductors més potents de l'angiogènesi (Bikfalvi *et al.*, 1997). En la retina, s'ha informat de l'expressió de l'FGF-2 en les capes nuclears interna i externa del gangli, les membranes basals de les cèl·lules de Müller, vasos sanguinis i cèl·lules RPE (Ohsa-

to *et al.*, 1997). Els receptors de l'FGF estan distribuïts àmpliament al llarg de la neuroretina, i els fotoreceptors són les cèl·lules en les quals l'expressió és més abundant (Cornish *et al.*, 2004). Rousseau *et al.* (2003) han informat recentment que es van inhibir l'angiogènesi coroidal i la vascularització retinal en ratolins que sobreexpressaven un FGFR-1 truncat i això, per tant, suggereix que la senyalització de l'FGF-2 havia participat en la vascularització fisiològica de la retina. Tanmateix, hi poca informació relativa al paper de l'FGF en la retinopatia diabètica. La informació sobre els nivells intravítries de FGF és discutida (Sivalingam *et al.*, 1990; Cassidy *et al.*, 1998). En el seu estudi amb ratolins genoanulats per a l'FGF-2 i ratolins transgènics que sobreexpressaven l'FGF-2, Ozaki *et al.* (1998) van mostrar que l'FGF-2 no era necessari ni suficient per al desenvolupament de la neovascularització retinal. Tobe *et al.* (1998) també van demostrar que l'eliminació del gen de l'FGF no prevenia la neovascularització coroidal després de la ruptura induïda per làser de la membrana de Bruch en un model murí. A més, s'ha vist que el paper de l'FGF en el procés angiogènic és altament dependent de la coexpressió d'altres factors de creixement, com el VEGF. A part, sembla que l'FGF-2 només és angiogènic quan està acompanyat de dany celular que supera els mecanismes de segrestament celular (Yamada, 2000). Com que el dany celular existeix realment en la retina diabètica, es pot postular que està garantida la participació de l'FGF-2 en la patogènesi de la PDR.

FACTOR DE CREIXEMENT DE L'HEPATÒCIT

El factor de creixement de l'hepatòcit (*Hepatocyte growth factor*, HGF), també anomenat *scatter factor*, és una citocina multipotencial, sintetitzada principalment pel fetge. Regula el creixement i la motilitat celular i la morfogènesi de diversos tipus cel·lulars, i també és

un factor angiogènic potent (Grierson *et al.*, 2000). L'HGF assenyala i té com a dianes cèl·lules epitelials i endotelials de manera paracrina, mitjançant el seu receptor de superfície c-Met amb alta afinitat, un receptor tirosinacinas. Les cèl·lules endotelials vasculares, els fibroblasts, les cèl·lules glials i les cèl·lules RPE tenen l'habilitat de produir i alliberar HGF (Grierson *et al.*, 2000). Tanmateix, el paper de l'HGF, tant en l'ull sa com en el malalt, encara comença només a esbrinar-se.

Diversos autors han informat de nivells elevats de HGF en l'humor vitri de pacients amb PDR (Katsura *et al.*, 1998; Nishimura *et al.*, 1999; Umeda *et al.*, 2002). Vam trobar nivells de HGF vint-i-cinc vegades més alts en l'humor vitri que en el sèrum en pacients amb PDR, i no es va trobar cap relació entre les concentracions intravítria i sèrica (Cantón *et al.*, 2000). Aquests descobriments suggereixen que la síntesi intraocular pot ser un factor que contribueix significativament als nivells intravítris elevats de HGF observats en pacients amb PDR.

Tanmateix, hem de recalcar que també vam detectar uns nivells de HGF 8,5 vegades més grans en l'humor vitri que en el sèrum d'individus control no diabètics (Cantón *et al.*, 2000). Ja que l'HGF és essencial en el guariment de les ferides, els nivells elevats de HGF intravítri detectats en el grup control probablement reflectien la participació de l'HGF en la regeneració histològica i la reparació de malalties oculars, sense neovascularització retinal. A més, Briggs *et al.* (2000) van informar de grans quantitats de HGF en les mostres vítries obtingudes d'ulls després de la mort dels donants, amb un nivell mitjà més de tres cops superior al nivell del sèrum del nostre estudi. A part, sembla que l'HGF participa en l'homeòstasi retinal. En aquest punt, cal tenir en compte que l'HGF pot actuar com un factor antiapoptòtic per a cèl·lules endotelials i pot prevenir la mort de la cèl·lula endotelial induïda tant per la privació de sèrum (Yo *et al.*, 1998), per concentracions altes de glucosa (Morishita *et al.*,

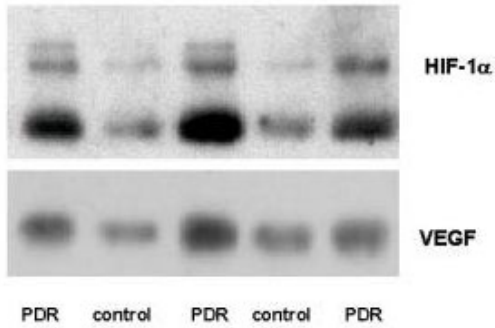


FIGURA 1. Transferències Western representatives que mostren l'expressió diferencial de HIF- α i VEGF en l'humor vitri ($30 \mu\text{g}$ de vitri homogenitzat) de pacients diabètics amb PDR i individus control no diabètics.

1997), o per hipòxia (Yamamoto *et al.*, 2001). A més, s'ha vist que les injeccions intravítrees de HGF recombinant humà (rhHGF) són neuroprotectores en un model murí de lesió retinal per isquèmia-reperfusió. Per tant, l'HGF es pot considerar com un factor neurotròfic que és sintetitzat fisiològicament per la retina.

Recentment, hem trobat que els nivells de HGF per mg de proteïnes intravítrees eren més baixos en pacients diabètics que en individus no diabètics, i no s'ha trobat relació entre els nivells intravítrees de HGF i l'activitat de la retinopatia (Simó *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2004). A més, encara que es va veure que els nivells elevats de HGF estaven relacionats amb VCAM-1, no es va trobar cap relació entre els nivells intravítrees de HGF i el VEGF. En aquest punt, cal tenir present que, a diferència del VEGF, tant la concentració de glucosa (Taniyama *et al.*, 2001) com la hipòxia (Hayashi *et al.*, 1999) disminueixen l'expressió de l'HGF en cèl·lules endotelials. En relació amb aquests descobriments, Matsumoto *et al.* (2002) van trobar l'expressió de l'mRNA de l'HGF significativament minvada en els vasos sanguinis de rates diabètiques induïdes amb estreptozocina, comparat amb l'expressió en rates no diabètiques. Per acabar, no hem trobat cap diferència en l'expressió del receptor de HGF (c-Met) en les membranes epiretinals de paci-

ents amb PDR, comparat amb les membranes epiretinals idiopàtiques (Simó *et al.*, 2005). Tot això ens mena a creure que el paper de l'HGF podria ser més important en el procés de guariment de les ferides que en la mateixa neovascularització.

Hi ha pocs estudis pel que fa a les estratègies anti-HGF en el tractament de la PDR. Tanmateix, un estudi recent (Nakabayashi *et al.*, 2003), que fa servir com a model l'assaig *micro-pocket* de còrnia en conill, va mostrar que l'HGF/NK4, un antagonista específic de l'HGF, redueix significativament l'angiogènesi induïda pel VEGF.

ANGIOPOETINES

Les angiopoetines i els receptors de TIE-2 (tirosina-cinasa que conté bucles *immunoglobulin-like* i dominis semblants al factor de creixement epidèrmic) constitueixen un altre sistema receptor-lligand específic de cèl·lules endotelials recentment identificat, que és crucial no solament per al desenvolupament vascular, sinó també per a l'angiogènesi postnatal (Maisonpierre *et al.*, 1997; Jousseaume *et al.*, 2001).

L'administració d'angiopoetina 1 intravítrea normalitza els nivells de VEGF i de la molècula d'adhesió intercel·lular 1, cosa que condueix a una reducció en l'adhesió leucocitària, el dany cel·lular endotelial i la disrupció de la barrera hematoretinal (Jousseaume *et al.*, 2001). El PDGF, el factor de creixement epidèrmic, el TGF- β i la hipòxia disminueixen els nivells de l'mRNA de l'angiopoetina *in vitro* (Enholm *et al.*, 1997).

En presència de VEGF, l'angiopoetina-2 té un paper proangiogènic. En contrast amb això, l'angiopoetina-2 promou la mort de les cèl·lules endotelials i la regressió vascular en absència de VEGF (Lobov *et al.*, 2002). S'ha vist que el VEGF incrementa l'expressió de l'angiopoetina-2 en les BREC (Oh *et al.*, 1999). I, a més, el VEGF i l'angiopoetina-2 s'han trobat localitzats en membranes epiretinals (Takagi

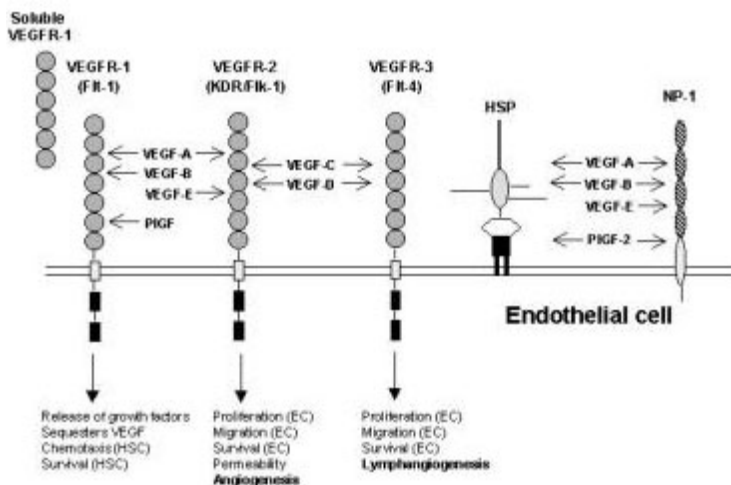


FIGURA 2. Isoformes del VEGF i la seva interacció amb VEGFR. Els receptors tirosina-cinasa del VEGF consisteixen en set dominis d'immunoglobulina extracel·lulars, una regió transmembranosa i un domini tirosina-cinasa intracel·lular interromput per un domini d'inserció de cinasa. El VEGFR-1 s'uneix amb el VEGFA, i el VEGF-B amb PlGF. El VEGFR-1 té una forma soluble alternativa empalmada que segresta el VEGF i n'inhibeix l'activitat. El VEGFR-1 pot no ser el receptor primari que transmet els senyals mitogènics, sinó que pot ser, més aviat, un receptor «parany». El VEGFR-1 té un paper en el segrestament dels progenitors endotelials. El VEGFR-2 uneix VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i VEGF-E, i és responsable de l'angiogènesi, i també dels efectes de permeabilitat del VEGF. El VEGFR-3 uneix VEGF-C i VEGF-D, i la seva expressió esdevé restringida primàriament a l'endoteli limfàtic de teixits adults. Els HSPG (*heparan sulphate proteoglycans*) mitjancen l'emmagatzemament i l'alliberament del VEGF-A en resposta al dany histològic. La NP-1 (neuropilina-1), un receptor de semaforines, té un paper important en la senyalització del VEGF mitjançant la unió a VEGF-A, i n'incrementa la unió al VEGFR-2. EC: cèl·lules endotelials; HSC: cèl·lules mare hematopoètiques.

et al., 2003). La diabetis també incrementa l'expressió de l'angiopoetina en la capa de cèl·lules ganglionars en la retina de rates diabètiques induïdes amb estreptozotocina (Ohashi *et al.*, 2004). Hammes *et al.* (2004) van demostrar que l'increment d'angiopoetina-2 tenia un paper crític en la pèrdua de pericits en la retina diabètica.

Takagy *et al.* (2003) van trobar que l'angiopoetina-2 i el TIE-2 estaven expressades més notablement en les membranes epiretinals en alteracions retinals isquèmiques humanes, com la PDR, més que no pas en les malalties retinals no isquèmiques. A més, van demostrar que la inhibició de TIE-2, quan es combinava amb la inhibició del VEGF, su-

primia l'angiogènesi retinal de manera més eficient que la sola inhibició del VEGF, i això suggeria que la senyalització de TIE-2 i VEGF podia tenir un paper potencial en l'angiogènesi retinal induïda per isquèmia. De manera semblant, Das *et al.* (2003) van informar de la inhibició de la neovascularització retinal induïda experimentalment en ratolins nous, amb la utilització de l'antagonista de TIE-2 *muTek delta Fc*, i de la seva inhibició en correlació amb l'expressió de l'MMP-9.

ALTRES FACTORS ANGIOGÈNICS INVOLUCRATS EN LA PATOGÈNESI DE LA PDR

A part dels factors angiogènics esmentats més amunt, n'hi ha molts altres que participen en la patogènesi de la retinopatia diabètica.

El factor de creixement del teixit connectiu (*connective tissue growth factor*, CTGF), una citocina que estimula la proliferació de fibroblasts, l'adhesió cel·lular i la producció de matriu extracel·lular, ha estat també identificada com a factor angiogènic (Shimo *et al.*, 1999), i sembla que està implicada en la patogènesi de la retinopatia diabètica. S'ha vist que els nivells de mRNA del CTGF i de proteïna s'incrementaven en la retina de rata després d'una diabetis induïda amb estreptozotocina, i aquest increment es podia atenuar amb l'inhibidor d'ACE, el perindopril (Tikellis *et al.*, 2004). L'mRNA del CTGF s'expressa a alts nivells en les cèl·lules endotelials vasculares de la retina (Wunderlich *et al.*, 2000), i s'ha trobat en les membranes epiretinals obtingudes de pacients amb PDR (Hinton *et al.*, 2002). A més, el contingut en fragments NH₂-terminals de CTGF s'incrementa en l'humor vítri en pacients amb PDR activa (Hinton *et al.*, 2004).

El factor 1 derivat de cèl·lules de l'estrroma (SDF-1), la quimiocina principal que mobilitza les HSC i les EPC (*circulating endothelial progenitor cells*) (Ceradini *et al.*, 2004), s'ha vist que està involucrat en el desenvolupament de la retinopatia diabètica. L'SDF-1 actua conjuntament amb el VEGF i produeix el segrestament de progenitors endotelials de llocs apartats, tals com la medulla òssia i la retina isquèmica (Grant *et al.*, 2004). Butler *et al.* (2005) van mostrar que els nivells de SDF-1 intravítrics s'incrementaven en pacients diabètics amb edema macular o PDR. A més, en el model murí de retinopatia diabètica, les injeccions intravítries d'anticossos bloquejadors de l'SDF-1 prevenien la neovascularització retinal, fins i tot en presència de VEGF. Finalment, el mateix grup d'investiga-

dors va trobar una devallada dràstica en els nivells intravítrics tant de SDR-1 com de VEGF després de la injecció intravítrica de triamcinolona (Butler *et al.*, 2005). Agafades en conjunt, aquestes dades demostren que l'SDF-1 té un paper principal en la PDR i pot ser un objectiu ideal amb vista a la seva prevenció.

Altres factors angiogènics, com l'angiogenina (Ozaki *et al.*, 1996) i les citocines proinflamàtores, també tenen un paper essencial en la patogènesi de la retinopatia diabètica (Joussen *et al.*, 2001; Joussen *et al.*, 2000). Recentment hem proporcionat proves de l'increment en les citocines proinflamàtores IL-8 i MCP-1 en l'humor vítri de pacients diabètics amb PDR, sense un increment en la citocina antiinflamatòria IL-10 (Hernández *et al.*, 2005). Aquests resultats subratllen la participació de la inflamació en els esdeveniments patològics que condueixen a la PDR. Tanmateix, calen estudis futurs que explorin els canvis potencials en les citocines proinflamàtores després de la injecció intravítrica de fàrmacs antiinflamatoris esteroïdeus.

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat finançat gràcies a una beca de Novo Nordisk Pharma SA, Novartis Pharma SA, el Ministeri de Ciència i Tecnologia (SAF2003-00550), i l'Institut de Salut Carlos III (G03/212 i C03/08).

BIBLIOGRAFIA

- ADAMIS, A. [et al.] (1993). «Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 193: 631-638.
- (1996). «Inhibition of VEGF prevents ocular neovascularization in a non-human primate». *Arch. Ophthalmol.*, 114: 66-71.
- AIELLO, L. [et al.] (1994). «Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders». *N. Engl. J. Med.*, 331: 1480-1487.

- (1995a). «Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells». *Arch. Ophthalmol.*, 113: 1538-1544.
- (1995b). «Suppression of retinal neovascularization *in vivo* by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 10457-10461.
- ANTONETTI, D. [et al.] (1999). «Vascular Endothelial Growth Factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and Zonula Occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors». *J. Bio. Chem.*, 274: 23463-23467.
- AVERBUKH, E. [et al.] (1998). «Gene expression of insulin-like growth factor-1, its receptor and binding proteins in retina under hypoxic conditions». *Metabolism*, 47: 1331-1336.
- BARRY, P. (1997). «The management of diabetic eye disease». A: PICKUP, J.; WILLIAMS, G. [ed.]. *Textbook of diabetes*. Oxford: Blackwell Science, P. 47.
- BOEHM, B. O. [et al.] (2001). «Octreotide reduces vitreous hemorrhage and loss of visual acuity risk in patients with high-risk proliferative diabetic retinopathy». *Horm. Metab. Res.*, 33: 300-306.
- BOULTON, M. (1998). «VEGF localisation in diabetic retinopathy». *Br. J. Ophthalmol.*, 82: 561-568.
- BRIGGS, M. C. (2000). «Active Scatter Factor (HGF/SF) in proliferative vitreoretinal disease». *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41: 3085-30894.
- BIKFALVI, A. (1997). «Biological roles of fibroblast growth factor-2». *Endocr. Rev.*, 18: 26-45.
- BURGOS, R. [et al.] (2002). «Vitreous levels of IGF-1, IGF binding protein 1, and IGF binding protein 3 in proliferative diabetic retinopathy. A case-control study». *Diabetes Care*, 23: 80-83.
- BURGOS, R. [et al.] (1997). «Vitreous levels of vascular endothelial growth factor are not influenced by its serum concentration in diabetic retinopathy». *Diabetologia*, 40: 1107-1109.
- BUTLER, J. M. [et al.] (2005). «SDF-1 is both necessary and sufficient to promote proliferative retinopathy». *J. Clin. Invest.*, 115: 86-93.
- CAMPOCHIARO, P. A. [et al.] (1994). «Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells». *J. Cell Sci.*, 107: 2459-2469.
- CANTÓN, A. [et al.] (2000). «Hepatocyte growth factor in vitreous and serum from patients with proliferative diabetic retinopathy». *Br. J. Ophthalmol.*, 84: 732-735.
- CARRINGTON, L. (2000). «IL-10 and antibodies to TGF-beta2 and PDGF inhibit RPE-mediated retinal contraction». *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41: 1210-1216.
- CASSIDY, L. [et al.] (1998). «Platelet derived growth factor and fibroblast growth factor basic levels in the vitreous of patients with vitreoretinal disorders». *Br. J. Ophthalmol.*, 82: 181-185.
- CERADINI, D. J. [et al.] (2004). «Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1». *Nat. Med.*, 10: 858-864.
- CORNISH, E. E. [et al.] (2004). «Differential distribution of fibroblast growth factor receptors (FGFRs) on foveal cones: FGFR-4 is an early marker of cone photoreceptors». *Mol. Vis.*, 10: 1-14.
- COX, O. T. [et al.] (2003). «Sources of PDGF expression in murine retina and the effect of short-term diabetes». *Molecular Vision*, 9: 665-672.
- DANIS, R. P.; BINGAMAN, D. P. (1997). «Insulin-like growth factor-1 retinal microangiopathy in the pig eye». *Ophthalmology*, 104: 1661-1669.
- DANIS, R. P. [et al.] (1998). «Inhibition of intraocular neovascularization caused by retinal ischemia in pigs by PKCbeta inhibition with LY333531». *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 39: 171-179.
- DAS, A. [et al.] (2003). «Angiopoietin/Tek interactions regulate MMP-9 expression and retinal neovascularization». *Lab. Invest.*, 83: 1637-1645.
- ELLIS, E. A. (2000). «Increased H₂O₂, vascular endothelial growth factor and receptors in the retina of the BBZ/Wor diabetic rat». *Free. Radic. Biol. Med.*, 28: 91-101.
- ENHOLM, B. [et al.] (1997). «Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia». *Oncogene*, 14: 2475-2483.
- FERRARA, N. (2004). «Vascular endothelial growth factor: Basis science and clinical progress». *Endocr. Rev.*, 25: 581-611.
- FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. (1997). «The biology of vascular endothelial growth factor». *Endocr. Rev.*, 18: 4-25.
- FINE, S. L.; PATZ, A. (1987). «Ten years after Diabetic Retinopathy Study». *Ophthalmology*, 94: 739-740.
- FREYBERGER, H. [et al.] (2000). «Increased levels of platelet-derived growth factor in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy». *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 108: 106-109.
- FUKUMURA, D. [et al.] (2001). «Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 2604-2609.
- GERHARDINGER, C. [et al.] (2001). «IGF-I mRNA and signaling in the diabetic retina». *Diabetes*, 50: 175-183.
- GIANNINI, S. [et al.] (1997). «Insulin-like growth factor binding protein production in bovine retinal endothelial cells». *Metabolism*, 46: 1367-1379.
- GRAGOUHAS, E. S. [et al.] (2004). «VEGF. Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration». *N. Engl. J. Med.*, 351: 2805-2816.
- GRANT, M. [et al.] (2004). «The role of growth factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy». *Expert. Opin. Invest. Drugs*, 13: 1275-1293.
- GRANT, M. B. (1993). «Inhibition of IGF-1 and b-FGF stimulated growth of human retinal endothelial cells by the somatostatin analogue, octreotide: a potential treatment for ocular neovascularization». *Reg. Peptides*, 48: 267-278.
- GRIERSON, I. [et al.] (2000). «Hepatocyte growth fac-

- tor/scatter factor in the eye». *Prog. Retin. Eye. Res.*, 19: 779-802.
- HAMMES, H. P. [et al.] (2002). «Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy». *Diabetes*, 51: 3107-3112.
- (2004). «Angiotensin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy». *Diabetes*, 53: 1104-1110.
- HAYASHI, S. [et al.] (1999). «Potential role of hepatocyte growth factor, a novel angiogenic growth factor, in peripheral arterial disease: downregulation of HGF in response to hypoxia in vascular cells». *Circulation*, 100: II301-308.
- HELDIN, C. H. (1999). «Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor». *Physiol. Rev.*, 79: 1283-1316.
- HELLSTRÖM, A. [et al.] (1999). «Reduced retinal vascularization in children with growth hormone deficiency». *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84: 795-798.
- HERNÁNDEZ, C. [et al.] (2001). «Vitreous levels of vascular adhesion molecule and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy». *Diabetes Care*, 24: 516-21.
- (2004). «Intravitreal levels of hepatocyte growth factor/scatter factor and vascular cell adhesion molecule-1 in the vitreous fluid of diabetic patients with proliferative retinopathy». *Diabetes Metab.*, 30: 341-346.
- (2005). «Interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-10 in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy». *Diabet. Med.*, 22: 719-722.
- HINTON, D. R. [et al.] (2002). «Novel growth factors involved in the pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy». *Eye*, 16: 422-428.
- HOFMAN, P. [et al.] (2000). «VEGF-A induced hyperpermeability of blood-retinal barrier endothelium in vivo is predominantly associated with pinocytotic vesicular transport and not with formation of fenestrations. Vascular endothelial growth factor-A». *Curr. Eye Res.*, 21: 637-645.
- IKUNO, Y.; KAZLAUKAS, A. (2002). «An in vivo gene therapy approach for experimental proliferative vitreoretinopathy using the truncated platelet-derived growth factor alpha receptor». *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43: 2406-2411.
- JANSSEN, J.; LAMBERTS, S. (2000). «Circulating IGF-1 and its protective role in the pathogenesis of diabetic angiopathy». *Clin. Endocrinol.*, 52: 1-9.
- JOUSSEN, A. M. [et al.] (2001). «Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina». *Am. J. Pathol.*, 158: 147-152.
- (2002). «Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression». *FASEB J.*, 16: 438-440.
- (2001). «Vascular plasticity—the role of the angiotensins in modulating ocular angiogenesis». *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 239: 972-975.
- KATSURA, Y. [et al.] (1998). «Hepatocyte growth factor in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy and other retinal disorders». *Diabetes Care*, 21: 1759-1763.
- KLEIN, R. [et al.] (1984). «The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years». *Arch. Ophthalmol.*, 102: 527-532.
- KONDO, T. [et al.] (2003). «Knockout of insulin and IGF-1 receptors on vascular endothelial cells protects against retinal neovascularization». *J. Clin. Invest.*, 113: 1835-1842.
- LAMOREAUX, W. [et al.] (1998). «Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro». *Microvascular Res.*, 55: 29-42.
- LE ROITH, D. [et al.] (2001). «The somatomedin hypothesis». *Endocr. Rev.*, 22: 53-74.
- LOBOV, I. B. A. (2002). «Angiotensin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 11205-11210.
- LOWE, W. L. [et al.] (1995). «Regulation of growth factor mRNA levels in eyes of diabetic rats». *Metabolism*, 44: 1038-1045.
- LU, M. [et al.] (1990). «Insulin-induced vascular endothelial growth factor expression in retina». *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 40: 3281-326.
- LU, M. [et al.] (1998). «Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression». *J. Clin. Invest.*, 101: 1219-1224.
- MC BAIN, V. A. [et al.] (2003). «High glucose concentrations decreased insulin-like growth factor type 1-mediated mitogen-activated protein kinase activation in bovine retinal endothelial cells». *Metabolism*, 52: 547-551.
- MAISONPIERRE, P. C. [et al.] (1997). «Angiotensin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis». *Science*, 277: 55-60.
- MATSUI, T. [et al.] (1989). «Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes». *Science*, 243: 800-804.
- MATSUMOTO, K. [et al.] (2002). «Impaired endothelial dysfunction in diabetes mellitus rats was restored by oral administration of prostaglandin 12 analogue». *J. Endocrinology*, 175: 217-223.
- (2001). «Relationship between glycoxidation and cytokines in the vitreous of eyes with diabetic retinopathy». *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 105: 435-441.
- MILTON, R. [et al.] (2003). «Initial results of the Protein Kinase-C Diabetic Retinopathy Study (PKC-DRS)». *Diabetes*, 52: A127.
- MITAMURA, Y. [et al.] (2005). «Role of cytokines and trophic factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy». *Current Diabetes Review.*, 1: 73-81.
- MIZUTANI, M. [et al.] (1995). «High glucose increases platelet-derived growth factor production in cultured human vascular endothelial cells and preventive effects of eicosapentaenoic acids». *Life. Sci.*, 57: PL31-35.

- MORI, K. [et al.] (2002). «Retina-specific expression of PDGF-B versus PDGF-A: vascular versus nonvascular proliferative retinopathy». *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43: 2001-2006.
- MORISHITA, R. [et al.] (1997). «Potential role of an endothelium-specific growth factor, hepatocyte growth factor, on endothelial damage in diabetes». *Diabetes*, 46: 138-142.
- MOSS, S. E. (1998). «The 14-year incidence of visual loss in a diabetic population». *Ophthalmology*, 105: 998-1003.
- MURATA, T. [et al.] (1997). «The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas». *Diabetologia*, 40: 764-769.
- (1996). «The temporal and spatial vascular endothelial growth factor expression in retinal vasculogenesis of rat neonates». *Lab. Invest.*, 74: 68-77.14.
- NAKABAYASHI, M. [et al.] (2003). «HGF/NK4 inhibited VEGF-induced angiogenesis in in vitro cultured endothelial cells and in vivo rabbit model». *Diabetologia*, 46: 115-123
- NISHIMURA, M. [et al.] (1999). «Increased vitreous concentrations of human hepatocyte growth factor in proliferative diabetic retinopathy». *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84: 659-662
- OCRANT, I. (1991). «Expression of insulin and insulin-like growth factor receptors and binding proteins by retinal pigment epithelium». *Exp. Eye Res.*, 52: 581-59.
- OH, H. [et al.] (1999). «Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells». *J. Biol. Chem.*, 274: 15732-15739.
- OHASHI, H. [et al.] (2004). «Alterations in expression of angiopoietins and the Tie-2 receptor in the retina of streptozotocin induced diabetic rats». *Mol. Vision*, 10: 608-617.
- OHSATO, M. [et al.] (1997). «In situ localization of basic fibroblast growth factor protein and mRNA in the retina». *Ophthalmic. Res.*, 29: 24-30.
- OZAKI, H. (1996). «Angiogenin levels in the vitreous from patients with proliferative diabetic retinopathy». *Ophthalmic. Res.*, 8: 356-360.
- (1998). «Basic fibroblast growth factor is neither necessary nor sufficient for the development of retinal neovascularization». *Am. J. Pathol.*, 153: 757-765.
- (1999). «Hypoxia inducible factor-1 alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with vegf». *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 40: 182-189.
- PARENTI, A. [et al.] (1998). «Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in post-capillary endothelium». *J. Biol. Chem.*, 273: 4220-4226
- PIERCE, E. A. [et al.] (1995). «Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 905-909.
- POULAKI, V. [et al.] (2002). «Acute intensive insulin therapy exacerbates diabetic blood-retinal barrier breakdown via hypoxia-inducible factor-1a and VEGF». *J. Clin. Invest.*, 109: 805-815.
- (2004). «Insulin-like growth factor-I plays a pathogenetic role in diabetic retinopathy». *Am. J. Pathol.*, 165: 457-469.
- ROBBINS, S. G. [et al.] (1994). «Platelet-derived growth factor ligands and receptors immunolocalized in proliferative retinal diseases». *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 35: 3649-3663.
- ROBINSON, G. S. [et al.] (1996). «Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 4851-6.124.
- ROUSSEAU, B. [et al.] (2003). «Involvement of fibroblast growth factors in choroidal angiogenesis and retinal vascularization». *Exp. Eye Res.*, 77: 147-156.
- RUBERTE, J. [et al.] (2004). «Increased ocular levels of IGF-1 in transgenic mice lead to diabetes-like eye disease». *J. Clin. Invest.*, 113: 1149-1157.
- SAISHIN, Y. [et al.] (2003). «Periocular injection of microspheres containing PKC412 inhibits choroidal neovascularization in a porcine model». *Invest Ophthalmol Vis. Sci.*, 44: 4989-4893.
- SEIGEL, G. M. [et al.] (2000). «Inhibition of neuroretinal cell death by insulin-like growth factor-1 and its analogs». *Mol. Vis.*, 31: 157-163
- SEO, M. S. [et al.] (1999). «Dramatic inhibition of retinal and choroidal neovascularization by oral administration of a kinase inhibitor». *Am. J. Pathol.*, 154: 1743-1753.
- SHIBUKI, H. [et al.] (2002). «Expression and neuroprotective effect of hepatocyte growth factor in retinal ischemia-reperfusion injury». *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43: 528-536.
- SHIMO, T. [et al.] (1999). «Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells in vitro, and angiogenesis in vivo». *J. Biochem.*, 126: 137-145.
- SIMÓ, R. [et al.] (2002). «Free insulin growth factor-I and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy». *Am. J. Ophthalmol.*, 134: 376-382.
- (2003). «Free IGF-I in the vitreous fluid of diabetic patients with proliferative diabetic retinopathy. A case-control study». *Clin. Sci.*, 104: 223-230.
- (2004). «Hepatocyte growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative retinopathy: its relationship with vascular endothelial growth factor and retinopathy activity». *Diabetes Care*, 27: 287-288.
- (2005). «Intravitreal hepatocyte growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy». *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 16:
- SIVALINGAM, A. [et al.] (1990). «Basic Fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy». *Arch. Ophthalmol.*, 108: 869-872.
- SMITH, G. [et al.] (1999). «Immunolocalization of the VEGF receptors FLT-1, KDR and FLT-4 in diabetic retinopathy». *Br. J. Ophthalmol.*, 83: 486-494.
- SONE, H. [et al.] (1996). «Vascular endothelial growth fac-

- tor is induced by long-term high glucose concentration and up-regulated by acute glucose deprivation in cultured bovine retinal pigmented epithelial cells». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 221: 193-198.
- SPOERRI, P. E. [et al.] (1998). «Insulin-like growth factor: receptor and binding proteins in human retinal endothelial cell cultures of diabetic and non-diabetic origin». *Growth Hormone IGF Res.*, 8: 125-132.
- SUZUMA, K. [et al.] (1998). «Increased expression of KDR/Flk-1 (VEGFR-2) in murine model of ischemia-induced retinal neovascularization». *Microvasc. Res.*, 56: 183-191.
- (2002). «Characterization of protein kinase C β isoform's action on retinoblastoma protein phosphorylation, vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation, and retinal neovascularization». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 721-726.
- TAKAGI, H. [et al.] (2003). «Potential role of the angiopoietin/tie2 system in ischemia-induced retinal neovascularization». *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44: 393-402.
- TANIYAMA, Y. [et al.] (2001). «Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hind limb ischemia model: molecular mechanisms of delayed angiogenesis in diabetes». *Circulation*, 104: 2344-2350.
- THIEME, H. [et al.] (1995). «Comparative analysis of vascular endothelial growth factor receptors on retinal and aortic vascular endothelial cells». *Diabetes*, 44: 98-103.
- TIKELLIS, C. [et al.] (2004). «Connective Tissue Growth Factor is up-regulated in the diabetic retina: amelioration by angiotensin-converting enzyme inhibition». *Endocrinology*, 145: 860-866.
- TOBE, T. [et al.] (1998). «Targeted disruption of the FGF2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model». *Am. J. Pathol.*, 153: 1641-1646.
- TONG, L. [et al.] (2001). «Association of macular involvement with proliferative retinopathy in Type 2 diabetes». *Diabet. Med.*, 18: 388-394.
- TREINS, C. [et al.] (2001). «Regulation of vascular endothelial growth factor expression by advanced glycation end products». *J. Biol. Chem.*, 276: 43836-43841.
- UMEDA, N. [et al.] (2002). «Non-paralleled increase of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in the eyes with angiogenic and nonangiogenic fibroproliferation». *Ophthalmic. Res.*, 34: 43-47.
- UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKDPS) GROUP (1998a). «Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 Diabetes (UKDPS 33)». *Lancet*, 352: 837-853.
- (1998b). «Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes UKDPS 28». *Br. Med. J.*, 317: 703-713.
- WILKINSON-BERKA, J. L. [et al.] (2004). «Inhibition of platelet-derived growth factor promotes pericyte loss and angiogenesis in ischemic retinopathy». *Am. J. Pathol.*, 12: 63-73.
- WILSON, S. H. [et al.] (2001). «Modulation of retinal endothelial cell behaviour by insulin-like growth factor I and somatostatin analogues: implications for diabetic retinopathy». *Growth Horm. IGF Res.*, 11: S53-59.
- WUANG, G. [et al.] (1995). «Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-pas heterodimer regulated by cellular O₂ tension». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 5510-5514.
- WUNDERLICH, K. [et al.] (2000). «Regulation of connective tissue growth factor gene expression in retinal vascular endothelial cells by angiogenic growth factors». *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 238: 910-915.
- YAMADA, H. [et al.] (2000). «Cell injury unmasks a latent proangiogenic phenotype in mice with increased expression of FGF2 in the retina». *J. Cell. Physiol.*, 185: 135-142.
- YAMAMOTO, K. [et al.] (2001). «Contribution of Bcl-2, but not Bcl-xL and Bax, to antiapoptotic actions of Hepatocyte Growth Factor in Hypoxia-Conditioned Human Endothelial Cells». *Hypertension*, 37: 1341-1348.
- YANG, Q. (1994). «Purification and characterization of VEGF/VPF secreted by human retinal pigment epithelial cells». *Endothelium*, 2: 73-85.
- YO, Y. [et al.] (1998). «Potential role of hepatocyte growth factor in the maintenance of renal structure: anti-apoptotic action of HGF on epithelial cells». *Kidney Int.*, 54: 1128-1138.
- YOKOTA, T. [et al.] (2003). «Role of protein kinase C on the expression of platelet-derived growth factor and endothelin-1 in the retina of diabetic rats and cultured retinal capillary pericytes». *Diabetes*, 52: 838-845.