

Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Medicina

Aproximación a la fisiopatología de la retinopatía diabética. Estudio de la fosforilación y nitrosilación de tirosinas de proteínas y péptidos inflamatorios y angiogénicos del humor vítreo

Jeroni Nadal Reus

Barcelona 2011

Aproximación a la fisiopatología de la retinopatía diabética. Estudio de la fosforilación y nitrosilación de tirosinas de proteínas y péptidos inflamatorios y angiogénicos del humor vítreo

Memoria presentada por

Jeroni Nadal Reus

Para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Trabajo realizado bajo la dirección de

Julio de la Cámara Hermoso y Jordi Lluís Reverter Calatayud

UAB

Universitat Autònoma
de Barcelona

Contenido

Agradecimientos	5
1. PRESENTACIÓN DE LA TESIS	6
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1 Epidemiología de la retinopatía diabética	7
2.1.1 Diabetes mellitus	7
2.1.1.1 Retinopatía diabética	8
2.1.1.2 Prevalencia	9
2.1.1.3 Bibliografía	11
2.2 Fisiopatología de la retinopatía diabética	12
2.2.1 Diabetes mellitus y retinopatía diabética	12
2.2.2 Factores de riesgo	13
2.2.3 Fisiopatología	16
2.2.4 Cambios bioquímicos	17
2.2.5 La activación de la proteinquinasa C	19
2.2.6 Cambios hematológicos	20
2.2.7 Modificaciones anatómicas	20
2.2.8 Cambios fisiológicos	21
2.2.9 Oclusión microvascular	23
2.2.10 Neurodegeneración	23
2.2.11 Angiogénesis	25
2.2.12 Bibliografía	27
2.3 Clasificación de la retinopatía diabética	32
2.3.1 Niveles de gravedad para retinopatía diabética	33
2.3.2 Edema macular diabético	35
2.2.3 Bibliografía	37
2.4 Presentación clínica de la retinopatía diabética proliferativa	38
2.4.1 Definición	38
2.4.2 Etiopatogenia	38
2.4.3 Neovascularización	41
2.4.4 Proliferación fibrosa y contracción vítrea	48

2.4.5 Hemorragias	50
2.4.6 Desprendimiento de retina.....	52
2.4.7 Rubeosis.....	55
2.4.8 Retinopatía diabética involutiva	56
2.4.9 Tratamiento quirúrgico	56
2.4.10 Bibliografía	60
2.5 Retinopatía diabética e inflamación. Papel de la inflamación en las primeras etapas de la retinopatía diabética.	64
2.5.1 Estudios en animales	64
2.5.2 Cambios en la retina.....	70
2.5.3 Inflamación en la retinopatía diabética en humanos.....	71
2.5.4 Conclusiones	72
2.5.5 Bibliografía	73
2.6 Proteómica	80
2.6.1 Retinopatía diabética y biomarcadores	80
3. INVESTIGACIONES Y RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS PUBLICADOS	83
3.1 Hipótesis	83
3.2 Objetivos	83
3.3 Artículo 1	84
3.4 Artículo 2.....	91
4. CONCLUSIONES.....	99

Agradecimientos

Al Profesor Joaquín Barraquer por su apoyo demostrado en todo momento.

Al Dr. Jordi Reverter codirector de la tesis por haber confiado en mí en este proyecto.

Al Dr. Julio de la Cámara director de la tesis por su ayuda.

Al Dr. Joan Enric Rodríguez-Gil por su indispensable aportación en el estudio experimental de estos trabajos.

A los Dres. Santiago Abengoechea, Joan Ballester, Javier Elizalde, Josep Maria Fernández-Novell, Joan J. Guinovart, Laura Ramió-Lluch, Montserrat Rivera, Joan Enrique Rodríguez coautores de estos trabajos, por su ayuda en la realización de los mismos.

A mis compañeros del Centro de Oftalmología Barraquer sin excepción porque de todos ellos he aprendido algo.

Al Departamento de Fotografía del Centro de Oftalmología Barraquer, especialmente a Alex Barrios por su inestimable ayuda.

A mi mujer Maribel y a mis hijos Cristina, Bernat y Víctor.

1. PRESENTACIÓN DE LA TESIS

Esta tesis es presentada en la forma de compendio de publicaciones según la normativa aprobada por la Comisión de Doctorado de la Universitat Autònoma de Barcelona.

El núcleo principal se basa en artículos originales publicados en revistas indexadas en los que el doctorando figura como segundo autor especificando en las publicaciones que tanto el primer autor como el doctorando han contribuido equitativamente en la realización de los trabajos publicados.

Los trabajos se basan en la evaluación de los niveles de fosforilación y nitrosilación de tirosinas de las interleuquinas del vítreo de pacientes afectos de retinopatía diabética, para ello se han analizado muestras de vítreo provenientes de pacientes afectos de retinopatía diabética proliferativa comparándolas con muestras de pacientes no diabéticos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Epidemiología de la retinopatía diabética

2.1.1 Diabetes mellitus

Sin duda, la Diabetes Mellitus (DM) es una de las enfermedades mejor documentadas en la historia de la Medicina. El término «diabetes» data del siglo II a. C.; los síntomas de esta enfermedad se habían descrito mucho tiempo antes, ya que se dispone de información encontrada en Egipto que data de más de 3.500 años. De allí en adelante, ha habido múltiples avances en el conocimiento de la enfermedad y en su tratamiento hasta 1921, cuando Banting y Best lograron aislar la insulina e identificarla como la sustancia cuya carencia provocaba diabetes.

En 1922 la insulina pudo ser utilizada en la clínica humana, produciendo una verdadera revolución en el curso de la enfermedad, cambiando radicalmente su pronóstico y aumentando así la esperanza de vida de los pacientes (1). La diabetes continúa siendo una enfermedad grave, que engloba diferentes entidades nosológicas que comparten la hiperglicemia y sus complicaciones como característica común. Se trata de una enfermedad crónica de base genética, caracterizada por un síndrome metabólico con hiperglicemia y alteraciones en el metabolismo de los lípidos y de las proteínas como consecuencia de un déficit absoluto o relativo de insulina o de una resistencia en los tejidos periféricos a la misma y de un síndrome vascular, macro y/o microangiopático, que da lugar a formas específicas de enfermedad cardiovascular, renal, neurológica y ocular (1, 2).

La diabetes es una de las enfermedades más frecuentes en la clínica, se estima que su prevalencia ha aumentado significativamente en las últimas décadas y se calcula que en los EEUU y en la mayoría de los países europeos sería de aproximadamente un 5%, existiendo diferencias en este porcentaje que van del 1,5% hasta un 7% entre diferentes áreas geográficas y etnias, su incidencia ha registrado un gran aumento en los últimos años. Este aumento en las cifras de prevalencia e incidencia de la diabetes podría explicarse por

diversos motivos, entre los cuales estarían el aumento en la expectativa de vida de la población general, el aumento de la longevidad del paciente diabético, la mayor fecundidad actual de las diabéticas, el aumento de la obesidad y el incremento en el consumo de azúcares refinados entre otros factores (1,3).

Debemos distinguir entre dos tipos de diabetes: la de inicio juvenil, de aparición antes de los 30 años de edad, también llamada Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (DMID) o tipo 1; y la del adulto, de aparición a partir de los 30 años de edad, llamada Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente (DMNID) o tipo 2. Debemos destacar que estos rangos diferenciales no siempre se cumplen, por lo que se pueden dar casos de DMID de inicio a los 30 años o formas de DMNID en pacientes jóvenes. De todas formas, las complicaciones mencionadas son altamente frecuentes y comunes a ambos tipos de diabetes. La gran mayoría de pacientes se integran en el grupo de DMNID, constituyendo aproximadamente un 85% de los casos de diabetes, mientras que el 15% restante corresponde a pacientes afectados de DMID (1,2). El aumento de los casos de diabetes y de sus complicaciones ha hecho de esta enfermedad un importante y creciente problema sanitario tanto en los aspectos clínicos como en el social y económico, que ha motivado un gran número de estudios epidemiológicos y clínicos.

2.1.1.1 Retinopatía diabética

La retinopatía diabética (RD) constituye una complicación microangiopática de la diabetes y es la principal causa de ceguera en los países industrializados, en pacientes entre los 20 y 64 años de edad, siendo responsable de un 10% de nuevos casos de ceguera cada año. El riesgo de ceguera en pacientes diabéticos sería aproximadamente 25 veces superior al resto de la población (3). A pesar del desarrollo de sofisticadas modalidades para su diagnóstico y tratamiento, la RD continúa siendo una importante causa de pérdida de agudeza visual. La causa exacta de esta enfermedad microvascular es aún desconocida.

Se han descrito numerosas anomalías hematológicas y bioquímicas relacionadas a la retinopatía, pero su papel en la patogénesis de la enfermedad

está aún por definir (4,5). La RD se asocia a varios factores de riesgo, algunos de ellos modificables y su conocimiento constituye la base para el trabajo de la prevención del desarrollo y progresión de esta enfermedad. Numerosos estudios epidemiológicos se han realizado tratando de conocer que pacientes tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad y qué factores podrían modificar ese riesgo. Estos estudios han contribuido también a elaborar numerosas hipótesis acerca de la patogenia de la RD (6). Las cifras aportadas por estos estudios son variables y eso se debe a la diferente metodología empleada y a las diferentes selecciones de muestras.

2.1.1.2 Prevalencia

La prevalencia de la RD ha sido motivo de múltiples estudios; uno de ellos, el Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy (WESDR), encontró una prevalencia de 20,5% de retinopatía en una población de diabéticos adultos (entre 51 y 72 años de edad), siendo mayor el porcentaje en los pacientes de raza negra (27,7%) que en los de raza blanca (16,7%) (7). En el United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS), se estudió la prevalencia de retinopatía en pacientes con DMNID de reciente diagnóstico, hallando valores de 39% y 35% en hombres y mujeres respectivamente (8). Los pacientes tratados con insulina también presentan una mayor tasa de retinopatía que los pacientes que no requieren de tratamiento insulínico (55,6% y 18,5% respectivamente) (9). El Australian Diabetes Obesity and Lifestyle Study estudió 2.177 pacientes diabéticos, de los cuales un 15,3% presentó signos de retinopatía, la prevalencia fue del 21,9% en pacientes con DMNID y de 6,2% en pacientes con diabetes de reciente diagnóstico (10). En el Barbados Eye Studies (BES), se estudiaron 410 pacientes de raza negra y su evolución en cuatro años, un 30,1% desarrollaron retinopatía, mostrando una incidencia de 31,9% en pacientes con diabetes ya diagnosticada y de 20,9% en pacientes con diabetes de reciente diagnóstico (11). El Blue Mountains Eye Study estudió un total de 3.654 personas mayores de 49 años de edad provenientes de una zona urbana del Oeste de Sydney, encontrando una prevalencia de diabetes del 7% de la población y signos de retinopatía en

32,4% de los participantes con diabetes ya diagnosticada y recientemente diagnosticada. La frecuencia más alta de retinopatía (75%), fue hallada en pacientes con DMID, mientras que en los pacientes con DMNID ya diagnosticada la frecuencia fue de 35,7% y en los de reciente diagnóstico esta cifra fue de 15,8%. No existieron diferencias significativas entre los sexos, siendo de 33,5% y 31,2% para mujeres y hombres respectivamente (12).

El IDDM Complications Study, estudió 3.250 pacientes diabéticos insulino dependientes entre 15 y 60 años de edad, con una duración media de diabetes de 14,7 años, provenientes de 31 centros europeos de diabetes. La prevalencia de retinopatía en este estudio varió considerablemente entre distintos centros, encontrándose entre 25 y 60%, sin patrones geográficos aparentes, en cuanto a la severidad de retinopatía, un 25,8% presentó una retinopatía no proliferativa (RNP) leve, mientras que un 9,8% mostró un grado moderado a severo y un 10,6% mostró una retinopatía proliferativa (RDP) (13).

2.1.1.3 Bibliografía

1. Farreras P., Rozman C. Medicina interna. Vol 11. Duodécima edición. Ediciones Doyma. Barcelona, España, 1992.
2. Quiróz-Mercado H. Retina. Diagnóstico y tratamiento. Me Graw Hill Interamericana, 1996.
3. De María C, Antes A. Retinopatía diabética. 1ª edición. Oficina del Libro AEM, Montevideo, 1994.
4. Tasman and Jaeger. Duane's Ophthalmology. Diabetes mellitus and the eye. Lippincott Raven. 1997.
5. Bonafonte S, García C. Retinopatía diabética. Harcourt Brace. Ryan S. Retina. Second Edition.
6. Retinal vascular diseases. Mosby Year Book Inc. 1994.
7. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy: XVII. The 14 year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type I diabetes. Ophthalmology 1998; 105: 1801-1815.
8. United Kingdom Prospective Diabetes Study Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type II diabetes. UKPDS 38. Br. Med. J. 1998; 317: 703-713.
9. Kohner E, Aldington S, Stratton 1, et al. United Kingdom Prospective Study, 30. Archives of Ophthalmology; Mar 1998; 116: 297-303.
10. Tapp R, Shaw J, Harper A, et al. The prevalence of and factors associated with diabetic retinopathy in the Australian population. Diabetes Care 2003; 26: 1731-1737
11. Leske C, SuhYuh Wu, Hennis A, et al. Incidence of diabetic retinopathy in the Barbados Eye Studies. Ophthalmology May 2003; 110 (5): 941-947.
12. The Blue Mountains Eye Study. Prevalence of diabetic retinopathy in an older community. Ophthalmology 1998; 105: 406-411
13. Klein A, Moss SE, et al. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy 11. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. Arch. Ophthalmol. 1984; 102: 520-526.

2.2 Fisiopatología de la retinopatía diabética

2.2.1 Diabetes mellitus y retinopatía diabética

La Diabetes Mellitus (DM) es la enfermedad plurimetabólica más frecuente en humanos. Está ocasionada por un déficit en la secreción de insulina o por un defecto en la captación celular de la glucosa, lo que produce un trastorno en el metabolismo de los hidratos de carbono con aumento de la concentración de glucosa en sangre y en los tejidos intersticiales.

En función de los procesos patogénicos involucrados en el desarrollo de la enfermedad se distinguen dos tipos de Diabetes Mellitus:

Tipo 1: Diabetes insulino dependiente (DMID) o diabetes juvenil. La causa es la deficiencia absoluta en la secreción de insulina, por destrucción autoinmune o idiopática de las células beta pancreáticas. Su diagnóstico generalmente se realiza antes de los 30 años.

Tipo 2: Diabetes no insulino dependiente (DMNID) o diabetes del adulto más prevalente que la tipo 1. La causa es una resistencia a la acción de la insulina, generalmente asociada a la obesidad y a una inadecuada respuesta secretora de la misma.

La diabetes es una enfermedad que puede producir complicaciones de forma aguda o crónica. Como alteraciones metabólicas agudas puede producir, cetoacidosis diabética, coma hiperglucémico hiperosmolar no cetósico e hipoglucemia y como complicaciones vasculares tardías, puede afectar a arterias de mediano y gran calibre (macroangiopatía por aterosclerosis), resultando en cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular periférica o bien puede afectar a pequeños vasos (microangiopatía) y conducir al desarrollo de una retinopatía entre otras (1).

La Retinopatía Diabética (RD) es por tanto una de las complicaciones microvasculares crónicas de la DM y en los países industrializados se ha convertido en la principal causa de deficiencia visual y ceguera en adultos entre los 25 y 74 años de edad (2,3). Se distinguen dos tipos fundamentales de RD:

La RD no proliferativa (RDNP) con una serie de características clínicas derivadas de las alteraciones en los vasos de la retina. Su clínica viene determinada por el aumento de la permeabilidad vascular y la oclusión capilar y arteriolar, su lesión más típica es la aparición de un edema macular. La RD proliferativa (RDP) caracterizada por la formación de nuevos vasos anormales y tejido fibroso a nivel retiniano, más grave y de peor pronóstico visual. Esta última entidad, la RDP, junto con el edema macular diabético (EMD), son las dos entidades clínicas que marcan el pronóstico visual de los pacientes con RD ya que pueden conducir a una pérdida de visión significativa; así en la RDP no tratada la neovascularización y la fibrosis pueden producir hemorragia vítrea y desprendimiento de retina con la consiguiente pérdida visual severa.

2.2.2 Factores de riesgo

El principal trastorno metabólico que se produce en la diabetes es el aumento de la concentración de glucosa en sangre, esta hiperglucemia mantenida en el tiempo, es la responsable de que se desarrollen las complicaciones microvasculares de esta enfermedad, entre ellas la retinopatía.

La aparición y progresión de la retinopatía va ligada por tanto a la hiperglucemia mantenida, pero también a otros factores sistémicos. Los factores de riesgo más importantes para la aparición y evolución de la RD son el tipo de diabetes y el tiempo de evolución de la misma de forma que después de 20 años de evolución de la enfermedad el 98% de los diabéticos tipo 1 y entre un 60%-85% de los pacientes diabéticos tipo 2, sufren RD en alguno de sus grados (2,3) .El deficiente control de la glucemia es uno de los factores desencadenantes de la enfermedad habiéndose demostrado que el tratamiento optimizado con insulina retrasa la aparición y progresión de todas las complicaciones microvasculares en ambos tipos de diabetes (4-8), las cifras elevadas de tensión arterial son también un factor de riesgo (7-9). La pubertad o el embarazo, pueden acelerar el desarrollo de la retinopatía debido probablemente, entre otros factores, a los cambios hormonales que se producen en estas etapas de la vida (10,11). Otros factores como, las

concentraciones elevadas de lípidos en suero se asocian con una mayor frecuencia de exudados duros a nivel macular (12-14), la existencia de microalbuminuria (15,16), la anemia severa (16,17) y factores genéticos también han sido relacionados con el desarrollo y progresión de la RD. (18)

En el Ensayo de Complicaciones y Control de la Diabetes (DCCT) (4-6), el objetivo principal es combatir las complicaciones crónicas de los pacientes con diabetes tipo 1. Se estudian los efectos que tiene el tratamiento intensivo frente al tratamiento convencional de estos pacientes sobre el desarrollo y progresión de la retinopatía, nefropatía, neuropatía y enfermedad cardiovascular. En este ensayo se establecen dos cohortes de estudio; uno con diagnóstico reciente de diabetes (1-5 años) y sin evidencia de RD (grupo de prevención primaria) y otro, con más años de evolución de la diabetes (1-15 años) y con una RD leve o moderada (grupo de prevención secundaria); en ambos grupos, se asigna de forma aleatorizada, a unos, terapia intensiva basada en 3-4 inyecciones de insulina o con bombas de infusión subcutánea continua de insulina para conseguir hemoglobinas glicosiladas < 6-7% (La HbA1c es el parámetro más fiable para establecer el grado de control glucémico) .En el primer grupo (prevención primaria) la hipótesis consiste en que si el control intensivo u optimizado de la glucemia retrasa la aparición de RD y en el segundo (prevención secundaria) si la terapia optimizada podría enlentecer la progresión de la RD. Se comparan en ambos grupos la incidencia y progresión de otras complicaciones microvasculares entre los pacientes que reciben terapia intensiva y los que reciben tratamiento convencional. Se llega a la conclusión de que todas las complicaciones microvasculares pueden disminuir significativamente y la progresión de las mismas puede retrasarse en los pacientes que siguen un tratamiento intensivo y un control glucémico optimizado. Así, en los pacientes tratados con terapia intensiva, disminuyó significativamente la tasa de nuevos casos de retinopatía, la progresión continua de la retinopatía, la progresión hacia una retinopatía no proliferativa severa, el desarrollo de una RDP, el riesgo de desarrollar un EM y la necesidad de un tratamiento con láser para el edema macular o la retinopatía proliferativa en comparación con los pacientes que seguían un tratamiento convencional. El tratamiento optimizado con insulina se tradujo en un mayor beneficio cuando se

inició de forma temprana en el curso de la diabetes, pero fue beneficioso en todos los niveles de reducción de hemoglobina glicosilada, independientemente del tiempo de evolución de la enfermedad.

El Estudio prospectivo de la Diabetes del Reino Unido (UKPDS) (7,8), es similar al DCCT, pero realizado en pacientes diabéticos tipo 2. En este estudio también se observa el beneficio que el tratamiento optimizado con insulina en estos pacientes tiene para disminuir el riesgo de desarrollo y progresión de las complicaciones microvasculares. El control optimizado de la glucemia (HbA1c < 7%) en los diabéticos tipo 2 con RD se tradujo en una disminución del riesgo de progresión de la RD, de padecer una hemorragia vítrea, de tener ceguera legal, de precisar cirugía de la catarata y de la necesidad de una fotocoagulación con láser. Este ensayo clínico mostró también el efecto beneficioso que el control de otros factores como la hiperlipemia o la hipertensión arterial (HTA), pueden tener para reducir la progresión de la RD y el edema macular en estos pacientes.

En el Estudio epidemiológico de la RD en Wisconsin (WESDR) (2,3,12,15,19-22), se incluyen a diabéticos, diagnosticados antes de los 30 años (tipo 1) y diagnosticados después de los 30 años (tipo 2), y nos ha ayudado a conocer, qué pacientes diabéticos y en función de qué tienen riesgo de desarrollar RD o de que progrese la misma. Los hallazgos principales del WESDR, avalados también por otros estudios evidenciaron que la RD severa era rara en los primeros cinco años del diagnóstico de la diabetes y que el riesgo de progresión a una RD severa aumentaba sustancialmente con la duración de la enfermedad; además, en el WESDR se identifican también otros factores de riesgo para la RD en los pacientes con diabetes, como las mayores cifras de hemoglobina glicosilada (HbA1c), la hipertensión arterial (HTA) o los niveles elevados de microalbuminuria. Así, pacientes diabéticos con cifras elevadas de HbA1c o en los que existe microalbuminuria, se observa que tienen tres veces más riesgo de presentar RD, que aquellos en los que el control glucémico es mejor (cifras más bajas de HbA1c) o en los que no existe afectación renal. Se trata de un estudio con un seguimiento a 4, 10 ó 14 años, que nos ha permitido ir conociendo aspectos importantes en la historia natural de la RD, como su progresión, la incidencia a largo plazo de EM y su relación con determinados

factores sistémicos. Las conclusiones a las que han llegado estos estudios clínicos, así como otras investigaciones realizadas al respecto dejan claro que la aparición y el desarrollo de la retinopatía así como de la retinopatía proliferativa y del edema macular van a ser dependientes de una serie de factores de riesgo. Sobre algunos de estos factores no podremos influir, tal es el caso de la edad, la duración y el tipo de diabetes o los factores genéticos, pero otros factores si son modificables y sobre ellos debemos actuar para prevenir el desarrollo y progresión de la enfermedad ocular en los pacientes diabéticos. En este sentido y siguiendo las recomendaciones del European Diabetes Policy Group, se debe intentar que el paciente diabético mantenga cifras adecuadas de HbA1c y de presión arterial, que reciba un tratamiento adecuado si tiene una anemia o una nefropatía y que mantenga controlados sus niveles de lípidos plasmáticos (23,24). El control óptimo de todos estos factores ayudará a mejorar la salud sistémica y ocular de los pacientes con diabetes y un abordaje multifactorial será beneficioso para reducir las complicaciones derivadas de la enfermedad en la población diabética.

Los tratamientos aplicados a los enfermos diabéticos, ya sean oculares, cardiovasculares, etc., muestran su eficacia real cuando se realizan en el contexto de un buen control glucémico y de otros factores de riesgo sistémicos.

2.2.3 Fisiopatología

Aunque la causa exacta de la retinopatía diabética es aún desconocida, la hipótesis más probable es que el estado de hiperglucemia mantenida sea el principal responsable junto con el aumento de la concentración de glucosa en sangre, otros factores de riesgo sistémicos, como la HTA, la hiperlipidemia y probablemente factores genéticos también podrían colaborar en su desarrollo. En esta enfermedad microvascular se lesionan los pequeños vasos retinianos como arteriolas, capilares y vénulas precapilares retinianas y el daño endotelial de estos vasos parece ser el principal responsable del desarrollo de la microangiopatía (25). La hiperglucemia es el factor fundamental, aunque también los otros factores mencionados previamente, a través de cambios a

nivel bioquímico, hematológico, anatómico y fisiológico, producen este daño endotelial y también lesionan las neuronas de la retina (26).

Las lesiones que observamos clínicamente en los pacientes afectados de RD y que caracterizan los distintos estadios de la retinopatía son secundarias a esta microangiopatía. La microangiopatía diabética se traduce en un aumento de la permeabilidad de los vasos con extravasación del contenido intravascular al espacio retiniano con formación de edema y en ocasiones asociados a fenómenos de oclusión vascular conducen a la isquemia del tejido retiniano. Las distintas células neurosensoriales de la retina también se alteran, lo que contribuye a las disfunciones visuales y electrofisiológicas observadas en los pacientes diabéticos.

2.2.4 Cambios bioquímicos

Los principales cambios bioquímicos, inducidos por la hiperglucemia, implicados en la patogenia de la RD incluyen, el aumento de flujo a través de la vía de los polioles, la generación de los productos finales de la glicación, la generación de radicales libres y la activación de la vía de la proteinquinasa C (PKC) (27,28).

La vía de los polioles o vía del sorbitol, es una de las vías que utiliza la glucosa para metabolizarse en personas diabéticas con hiperglucemia. Cuando la concentración de glucosa en sangre aumenta y se sobrepasa la capacidad de la vía glucolítica y de las pentosas, el exceso de glucosa se metaboliza por esta vía. En la vía del sorbitol actúan dos enzimas: la aldosa reductasa y la sorbitol deshidrogenasa. La aldosa reductasa, presente en las células endoteliales de la retina, reduce los aldehidos producidos por los radicales libres a alcoholes inactivos y la glucosa a sorbitol y requiere NAOPH como cofactor. El sorbitol se oxida muy lentamente en fructosa por medio de la sorbitol deshidrogenasa (SOH). Al estimularse, en situaciones de hiperglucemia la vía de los polioles, las células en las que la actividad de la aldosa reductasa es importante, se deplecionan de NAOPH y de glutatión, que es un antioxidante protector del

endotelio contra los radicales libres, por lo que el estrés oxidativo aumenta (29). Además, el sorbitol formado por esta vía, que atraviesa mal las membranas celulares, aumenta su concentración intracelular, produciendo un aumento de la presión osmótica y favoreciendo la difusión de agua al interior de la célula con el consiguiente edema intracelular. El estrés osmótico inducido por esta vía hace que en las células microvasculares lesionadas se altere la permeabilidad y el balance electrolítico (salida de K⁺ y entrada de Na⁺) con aumento de la hipoxia tisular. Sin embargo y a pesar de la aparente implicación del aumento de las concentraciones de sorbitol en la patogenia de la RD estudios clínicos realizados en humanos, con inhibidores de la aldosa reductasa, han observado que el tratamiento con este inhibidor no altera el curso de la RD (30).

Los cambios observados en la RD se han relacionado también con la glicación no enzimática de las proteínas. La glucosa puede reaccionar de forma no enzimática con los residuos de lisina de las proteínas en lo que se conoce como glicosilación y tras una serie de reacciones bioquímicas dar lugar a los llamados “productos finales de glicación”. La glicación va a ser dependiente de los niveles de glucemia o hiperglucemia presentes en el organismo y una hiperproducción de estos productos produce disfunción endotelial y otras acciones directas. Estas vías son generadoras de radicales libres (31) y se han relacionado entre otros con el engrosamiento de la membrana basal, la pérdida de pericitos y las alteraciones de la permeabilidad vascular que se observan en la diabetes (32,33). La unión de estos productos a sus receptores específicos en la membrana de las células endoteliales, altera la coagulación y favorece los fenómenos de microtrombosis (34). Algunos estudios han encontrado una relación entre los niveles elevados en suero de estos productos y los estadios más avanzados de la RD y el edema macular en diabéticos tipo II (35)

Estudios en ratas diabéticas tratadas con aminoguanidina (un inhibidor de la formación de los productos finales de la glicación), (36,37), han demostrado una disminución en la pérdida de pericitos, en la proliferación de células endoteliales en los capilares retinianos y en la formación de microaneurismas en estos animales. Actualmente se están realizando estudios clínicos multicéntricos con este inhibidor en pacientes diabéticos tipo 1 y 2 para conocer

los efectos de este tratamiento sobre la proteinuria, la progresión de la insuficiencia renal y el curso de la RD en estos pacientes (27).

2.2.5 La activación de la proteinquinasa C

La PKC es una familia de enzimas que incluye al menos 11 isoformas, nueve de las cuales son activadas por el segundo mensajero lipídico diacilglicerol (DAG, un activador fisiológico de la PKC). La hiperglucemia aumenta la síntesis de novo de DAG lo que activa la PKC. Las isoformas Beta y Epsilon son las que se activan primariamente en los tejidos vasculares durante la hiperglucemia (38). La hiperglucemia también puede activar la PKC indirectamente a través de los receptores de los productos finales de la glicación y a través de la actividad incrementada de la vía de los polioles probablemente por el aumento de los radicales libres (31). La activación de la PKC, específicamente de su isoforma beta (PKCB) se ha implicado en la patogenia de las manifestaciones tempranas y tardías de la RD (31,39). Muchas son las consecuencias de su activación como, las anormalidades que se producen en el flujo sanguíneo por la disminución en la producción de óxido nítrico y/o por el aumento de la actividad de la endotelina-I (40), los cambios en la contractilidad del músculo liso y el aumento en la síntesis de proteínas de la membrana basal (38,39). Además su activación puede conducir a la activación de citoquinas, incluidos factores vasoactivos como el factor transformador del crecimiento y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factores implicados en la permeabilidad vascular y en la angiogénesis. La administración oral de inhibidores de la PKC, de su isoforma beta a pacientes diabéticos de menos de 10 años de evolución parece reducir alguna de las disfunciones vasculares características de la RD (39).

Las principales vías bioquímicas implicadas en la patogénesis de la RD parecen conectadas entre sí y estudios recientes sugieren que todas ellas serían activadas por la sobreproducción de superóxido en las células endoteliales, hiperproducción que estaría inducida por la hiperglucemia. Así, se ha podido observar en estudios in vitro, que la normalización de los niveles

mitocondriales de radicales libres con inhibidores del complejo de la cadena transportadora de electrones previene la activación de la PKC, la formación de productos finales de la glicación y la acumulación de sorbitol inducidos por la hiperglucemia (41).

2.2.6 Cambios hematológicos

Afectan a los elementos formes de la sangre (sobre todo glóbulos rojos y plaquetas) y a la viscosidad del plasma y la sangre total. En la sangre se produce un estado de hipercoagulabilidad, con aumento de la viscosidad sanguínea y de la adhesividad y agregación plaquetaria. Los glóbulos rojos son más rígidos, por lo que se alteran mecánicamente con su roce con las células endoteliales, ello puede ocasionar una obstrucción del flujo sanguíneo, por un aumento en su agregabilidad.; este aumento parece condicionado por el nivel del control metabólico y por los niveles elevados de proteínas plasmáticas. También se produce un aumento de fibrinógeno a nivel plasmático. Todas estas anormalidades pueden producir trombosis en los pequeños vasos retinianos (23).

2.2.7 Modificaciones anatómicas

Incluyen alteraciones en la membrana basal capilar y la pérdida de pericitos. Las alteraciones de la membrana basal consisten en un engrosamiento de la misma, con vacuolización y depósito de colágeno fibrilar, aparecen en las fases iniciales de la RD y producen alteraciones funcionales en los capilares retinianos con disminución del calibre vascular y del flujo lo que dificulta la difusión de nutrientes y la consiguiente hipoxia tisular. Se estimula la proliferación de células endoteliales, al desaparecer el contacto entre los pericitos y estas células endoteliales. En condiciones normales esta proliferación está inhibida por el contacto que mantienen estas células a través de las fenestraciones de la membrana basal. Esta proliferación endotelial es un

hallazgo típico de la RD aunque no está claro de qué forma contribuye al desarrollo de la misma.

La pérdida de pericitos es considerada por algunos autores como el único hallazgo patognomónico de la enfermedad diabética. La pérdida selectiva de pericitos en los capilares de la retina, aparece en las fases iniciales de la RD y es secundaria, según algunas hipótesis al acúmulo de sorbitol intracelular. Los pericitos son células contráctiles de la pared capilar, con una importante función en el mantenimiento de la integridad capilar. Su pérdida en la diabetes contribuye a la disfunción vascular, al aumento de la permeabilidad y del diámetro capilar y a la alteración de la regulación del tono vascular al no poder contrarrestar las presiones transmuralas (42). La pérdida de pericitos facilita la dilatación focal de la pared del capilar y puede favorecer la aparición de microaneurismas, primera lesión observable clínicamente en la RD.

Todas las alteraciones expuestas condicionan la aparición de una serie de cambios fisiológicos a nivel de la microcirculación.

2.2.8 Cambios fisiológicos

En la diabetes, se altera el balance de la hemostasis vascular al producirse una disminución en la síntesis o la acción de factores vasodilatadores y un aumento de la liberación de factores vasoconstrictores en el endotelio vascular. La hiperglucemia es la responsable de esta disfunción en las células endoteliales. Se pierde el mecanismo autorregulador del flujo sanguíneo en la retina y la velocidad del flujo sanguíneo disminuye. La pérdida en la capacidad reguladora del flujo y de la presión intravascular parece secundaria a la pérdida de elasticidad de una pared arteriolar engrosada y a la pérdida de las células contráctiles o pericitos. La disminución de la velocidad sanguínea, que aparece precozmente en la evolución de la enfermedad sería secundaria, al menos en parte, a la mayor viscosidad sanguínea, a la degeneración de pericitos, y al estrechamiento arteriolar. La activación de la PKC también parece responsable de esta alteración del flujo sanguíneo al producir un aumento en la acción vasoconstrictora de la endotelina-1 (ET-1) junto con una disminución en la

acción vasodilatadora del óxido nítrico (ON), lo que conduciría a una vasoconstricción y a un aumento de la resistencia al flujo. De hecho, el tratamiento con inhibidores de la PKC puede normalizar el flujo sanguíneo en la retina de pacientes diabéticos tipo 1 (39, 42, 43). Se produce también una vasodilatación compensatoria, en general las arteriolas y vénulas en diabéticos tienen mayor calibre que en no diabéticos y ésta dilatación vascular pudiera producirse por un mecanismo de autorregulación para compensar la hipoxia de la retina.

En pacientes diabéticos tipo 1 con retinopatía, hay una disminución del diámetro arteriolar y un aumento del diámetro de las venas y se ha observado que estas variaciones se relacionan con la severidad de la RD (21,22) y que constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de nefropatía diabética en estos pacientes (44). Por otro lado, en los pacientes panfotocoagulados se observa una disminución en el diámetro tanto arteriolar como venular que podría ser el resultado del menor volumen de flujo sanguíneo requerido al haber disminuido las necesidades metabólicas y haber aumentado la oxigenación tras destruir con láser el tejido retiniano isquémico (21).

La rotura de la barrera hematorretiniana (BHR) interna, alteración que se observa en los estadios iniciales de la diabetes, puede aparecer antes de que aparezcan los signos clínicos de RD. La función de esta barrera es separar a los elementos neuronales de la retina de la circulación, y protegerla de las células inflamatorias y de otros productos citotóxicos que viajan a su través, de forma que se pueda desarrollar una adecuada actividad neuronal (26,45).

La BHR interna la forman las uniones estrechas que existen entre células endoteliales adyacentes (26,46) y unas proteínas las ensamblan. Algunas de estas proteínas como, la proteína ocludina y claudina se sitúan en la membrana plasmática y regulan el paso de solutos y fluido entre las células endoteliales, mientras que otras, como las zónula occludens, son proteínas citoplasmáticas que se asocian a las uniones estrechas y contribuyen a su organización (26, 45,46). Se ha sugerido que la alteración de la BHR interna que se observa en la diabetes podría ser secundaria a la disminución de la cantidad de la proteína

ocludina en estas uniones lo que permitiría, en los capilares y arteriolas, el paso de algunas sustancias al espacio intersticial (47,48)

2.2.9 Oclusión microvascular

La oclusión vascular contribuye a la isquemia retiniana, aunque aún existe controversia sobre los factores responsables de la misma. La oclusión vascular podría ser secundaria a fenómenos intravasculares o extravasculares. Entre los primeros figuran, la leucostasis (49), la microtrombosis secundaria al estado de hipercoagulabilidad existente en la diabetes (50) o las anomalías del endotelio o de la membrana basal como el edema osmótico de las células endoteliales por el acúmulo de sorbitol o el engrosamiento de la membrana basal capilar (51). Entre los fenómenos extravasculares estarían, la invasión de la luz vascular por células gliales (52) y la compresión de la pared de los capilares por el edema intersticial de la retina (51), hecho que aunque se ha sugerido puede contribuir a la oclusión vascular no parece probable que lo haga ya que el edema retiniano es un hallazgo patológico frecuente en muchas otras enfermedades que no se asocian necesariamente a oclusión de los capilares retinianos. Estos fenómenos de microtrombosis que aparecen en los enfermos diabéticos y de los que hasta el momento se tenían evidencias indirectas, han sido demostrados recientemente en ojos postmortem de pacientes diabéticos tipo 2 (50) y se han relacionado con el tiempo de duración de la diabetes.

2.2.10 Neurodegeneración

Estudios experimentales recientes han puesto de manifiesto que todas las células de la retina se alteran en la diabetes. Se ha observado una alteración en los componentes vasculares, con alteración de las uniones estrechas y muerte de células endoteliales y pericitos. También aparecen alteraciones en las células gliales, astrocitos y células de Müller, que modifican sus contactos con los vasos sanguíneos, liberan mediadores inflamatorios y alteran el

metabolismo del glutamato (29,53-55). Las células de microglía, aumentan su actividad en la diabetes, aumentando su número y liberando mediadores inflamatorios (55, 56); hay evidencias de muerte por apoptosis en estadios precoces de la enfermedad diabética de células ganglionares y neuronas de la capa nuclear interna (57). Parece que estas disfunciones celulares observadas en la diabetes afectarían a la integridad de la BHR al disminuir la capacidad de las células endoteliales para formar uniones estrechas y contribuirían de este modo a las alteraciones vasculares observadas en la RD.

Se ha postulado que la retina neural (células gliales y neuronas) aumentaría la producción de factores de crecimiento y podría disminuir el contenido de factores pro-barrera, regulando en parte la BHR y contribuyendo a la hiperpermeabilidad vascular y a la angiogénesis (26, 58,59).

Todos los cambios vistos hasta ahora producen por un lado, un aumento de la permeabilidad de los vasos con la salida de plasma, proteínas y lípidos, ocasionando edema y exudados duros (lesiones características de la RD) y por otro lado, fenómenos de oclusión microvascular que conducen a la aparición de exudados blandos y a otros cambios hipóxicos más diseminados en la retina que aparecen cuando se produce la oclusión de las arterias mayores y que pueden encontrarse durante el curso evolutivo de la RD.

La oclusión vascular progresiva va produciendo en la retina una situación de hipoxia, una retina isquémica. La isquemia actúa de estímulo fundamental para la liberación de determinados factores angiogénicos que son los responsables de la formación de los neovasos sanguíneos en la retina y en el iris, que aparecen en las fases avanzadas de la RD y caracterizan a la RD proliferativa (RDP). La isquemia de la retina precede a la instauración de los neovasos y se considera, desde hace más de 50 años, como el origen de los factores angiogénicos (60).

2.2.11 Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso de formación de neovasos sanguíneos. En la retina normal existe un balance entre factores activadores e inhibidores de la proliferación vascular. La neovascularización ocurre cuando se rompe este delicado equilibrio por sobreproducción o activación de los factores angiogénicos o por reducción en la cantidad de los agentes inhibidores. El proceso de angiogénesis es un proceso que ocurre tanto en condiciones fisiológicas (desarrollo embrionario y reparación de heridas), como en situaciones patológicas (tumores y retinopatías isquémicas) y que involucra a una gran cantidad de mediadores y tipos celulares que interactúan entre sí y son capaces de crear unas condiciones propicias para la formación de nuevos capilares desde otros vasos ya existentes. Las células implicadas son células inflamatorias, como los monocitos, macrófagos, los linfocitos T y los neutrófilos que participan en el proceso angiogénico al secretar citoquinas que pueden afectar la función de las células endoteliales permitiendo su proliferación, migración y activación.

Las sustancias que pueden jugar un papel en la estimulación del crecimiento de las células endoteliales son también numerosas y de ellas, los polipéptidos se encuentran entre las moléculas angiogénicas más importantes. Distintos polipéptidos angiogénicos han sido purificados, aislados y clonados, entre otros el Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), la Hormona de crecimiento (GH), el Factor transformador del crecimiento alpha (FTC-a; TNF-a), el Factor de crecimiento epidérmico (FCE), el Factor de crecimiento de fibroblastos básico (FCF o bFGF) y el Factor de crecimiento del endotelio vascular (FCEV o VEGF). Otros posibles mediadores de la angiogénesis intraocular incluyen, los péptidos (angiogenina, fibrina, el activador del plasminógeno), las integrinas, la adenosina y la angiopoetina 1 y 2. Entre los polipéptidos angiogénicos más estudiados están el bFGF, el IGF y el VEGF. Tanto el bFGF como el IGF pueden jugar un papel en la neovascularización, sin embargo, las características peculiares de cada uno de ellos hace pensar que no son factores angiogénicos primarios. Así, el bFGF no puede ser secretado de forma rápida en respuesta a cambios isquémicos, pero puede liberarse de forma

secundaria a un daño celular. Por su parte, el IGF parece que no es capaz de inducir neovascularización en ausencia de otros factores de crecimiento ya que se requieren cantidades suprafisiológicas para estimular la neovascularización (61). Sin embargo, el VEGF sí que cumple los criterios para ser considerado un factor angiogénico ocular primario. El VEGF que también se denomina factor de permeabilidad vascular, es el factor del que más evidencias clínicas y experimentales existen.

El VEGF es sintetizado por distintas células en la retina que incluyen a las células ganglionares, células del EPR, pericitos, células endoteliales, astrocitos y células de Müller y la expresión del mismo está regulada por la hipoxia. La hipoxia aumenta hasta 30 veces la producción de VEGF por estas células de la retina (61,62). Sin embargo, el aumento de VEGF puede ocurrir antes de que se evidencien extensas áreas retinianas de no perfusión capilar, lo que sugiere que la regulación del VEGF puede depender, no sólo del estímulo hipóxico, así el VEGF podría jugar un papel en los estadios más precoces de la RD (63, 64). Este factor estimula la formación de neovasos y además estimula la permeabilidad de los vasos, al inducir cambios en la expresión de las proteínas ocludina y zónula occludens-1, disminuyendo la cantidad de las mismas y contribuyendo al edema (28, 45). En la capacidad mitógena y de aumento de permeabilidad de este factor de crecimiento un paso fundamental es la activación de la PKCB (39, 65, 66). Si se bloquea la acción del VEGF en la retinopatía isquémica se inhibe la neovascularización retiniana (61). Estos y otros factores angiogénicos son los responsables de la formación de los neovasos que aparecen en los estadios más avanzados de la RD.

2.2.12 Bibliografía

1. Roman SH, Harris MI. Management of diabetes mellitus from a public health perspective. *Current therapies for diabetes*. Endocrinol Metab Clinics North, 1997; 443-474.
2. Klein R, Klein BEK, Moss, SE et al. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic retinopathy II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol*, 1984; 102: 520-526.
3. Klein R, Klein BEK, Moss, SE et al. 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*, 1984; 102: 527-532.
4. DCCT (Diabetes control and Complications Trial) Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of longterm complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 1993; 329: 977-986.
5. DCCT (Diabetes control and Complications Trial) Research Group: The relationship of glycaemic exposure (HbA 1 c) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial. *Diabetes*, 1995; 44: 968-983.
6. DCCT (Diabetes control and Complications Trial) Research Group. Effect of pregnancy on microvascular complications in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care*, 2000; 23: 1084-91.
7. UKPDS (the United Kingdom Prospective Diabetes Study): Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*, 1998; 352: 837-53.
8. UKPDS (the United Kingdom Prospective Diabetes Study): Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: (UKPDS 38). *BMJ*, 1998; 317: 703-13.
9. Adler A, Stratton 1, Neil A. et al. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ*, 2000; 321: 421-9.
10. Beck RW, Frank RN, Kraker RT. et al. The effect of a growth hormone receptor antagonist drug on proliferative diabetic retinopathy. Growth Hormone antagonist for proliferative diabetic retinopathy Study Group. *Ophthalmology*, 2001; 108: 2266-72.
11. Klein BEK, Moss SE, Klein R. Effect of pregnancy on progression of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*, 1990; 13: 34-40.
12. Klein BEK, Moss SE, Klein R et al. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic retinopathy XIII. Relationship of serum cholesterol to retinopathy and hard exudates. *Ophthalmology*, 1991; 98: 1261-1265.
13. Chantry KH, Klein ML, Chew EY. et al. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Association of serum lipids and retinal hard exudates in patients

- enrolled in the Early treatment Diabetic Retinopathy Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1989; 30(Suppl): 434.
14. Chew EY, Klein ML, Ferris FL. et al. Association of elevated serum lipid levels with retinal hard exudates in diabetic retinopathy. ETDRS. Report 22. *Arch Ophthalmol*, 1996; 114: 1079-1084.
 15. Klein R, Klein BEK, Moss, SE et al. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic retinopathy IX. Four years incidence and progression of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol*, 1989; 107: 237-243.
 16. Davis MD, Fisher MR, Gangnon RE. et al. Risk factors for high-risk proliferative diabetic retinopathy and severe visual loss: Early treatment retinopathy study Report 18. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998; 39: 233-252.
 17. Berman DH, Friedman EA. Partial absorption of hard exudates in patients with diabetic end-stage renal disease and severe anemia after treatment with erythropoetin. *Retina*, 1994; 14: 1-5.
 18. Cruickshanks KJ, Vadheim CM, Moss SE. et al. Genetic markers associations with proliferative retinopathy in persons diagnosed with diabetes prior to 30 years of age. *Diabetes*, 1992; 41: 879-85.
 19. Klein R, Klein BE, Moss SE. et al. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic retinopathy: XV. The long term incidence of macular edema. *Ophthalmology*, 1995; 102: 7-16.
 20. Klein R, Klein BE, Moss SE. et al. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic retinopathy: XVII. The 14 year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes. *Ophthalmology*, 1998; 105: 1801-15.
 21. Klein R, Klein BE, Moss SE. et al. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic retinopathy: XVIII. Retinal vascular abnormalities in persons with type 1 diabetes. *Ophthalmol*, 2003; 110: 2118-2125.
 22. Klein R, Klein BE, Moss SE. et al. The relation of retinal vessel caliber to the incidence and progression of diabetic retinopathy: XIX: The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*, 2004; 122: 76-83.
 23. Lafuente M. *Retinopatía Diabética*, 2005. Ed: Alcandora publicidad, S.L. Madrid (España). ISBN: 84-689-0765-0.
 24. European Diabetes Policy Group. A desktop guide to type II diabetes mellitus. *Diabetic Med*, 1999; 16: 716-730.
 25. Escolar JL, Cilvetti A, Pinzón JL, Ramírez G, Ruiz Escalante J. La disfunción endotelial en la angiopatía diabética. El factor de crecimiento del endotelio vascular. *Endocrinología y Nutrición*, 2001; (48), 7: 198-201.
 26. Gardner TW, Antonetti DA, Barber AJ. et al. Diabetic retinopathy: more than meets the eye. *Survey Ophthalmol*, 2002; 47 (Suppl 2): S253-S262.
 27. Friedman EA. Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care*, 1999; 22(Suppl2): B65-71.

28. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, 1996; 19: 257-67.
29. Lieth E, LaNoue KF, Antonetti DA, Ratz M. Diabetes reduces glutamate oxidation and glutamine synthesis in the retina. The Penn State Retina Research Group. *Exp Eye Res*, 2000; 70: 723-30.
30. Sorbinil Retinopathy Trial (SRT) Research Group. A randomised trial of sorbinil, an aldose reductase inhibitor, in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*, 1990; 108: 1234-1244.
31. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 2001; 414(13): 813-20.
32. Wautier JL, Guillausseau PJ. Advance glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. *Diabetes Metab*, 2001; 27: 535-542.
33. Stitt AW, Hughes SJ, Canning P, Lynch O. et al. Substrates modified by advanced end-products cause dysfunction and death in retinal pericytes by reducing survival signals mediated by platelet-derived growth factor, *Diabetologia*, 2004; 22.
34. Esposito C, Gerlach H, Brett J. et al. Endothelial receptor mediated binding of glucose modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med*, 1989; 170: 1387-1407.
35. Boehm BO, Schilling S, Rosinger S, Lang GE. et al. Elevated serum levels of N(epsilon)-carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, are associated with proliferative diabetic retinopathy and macular edema. *Diabetologia*, 2004; 47(8): 1376-9.
36. Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. Aminoguanidin prevents diabetes induced arterial wall protein cross-linking. *Science*, 1986; 232: 1629-1632.
37. Hammes HR, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 11555-11558.
38. Koya D, King GL. Protein Kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, 1998; 47: 859-66.
39. Aiello LP. The potential role of PKC beta in diabetic retinopathy and macular edema. *Surv Ophthalmol*, 2002; 47(Suppl2): S263-9.
40. Ishii H et al. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PCK beta inhibitor. *Science*, 1996; 272: 728-31.
41. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemia damage. *Nature*, 2000; 404(13): 787- 790.
42. Way KJ, Katai N, King GL. Protein Kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabetic Medicine*, 2001; 18: 945-945-959.
43. Bursell SE, Clermont A, Aiello LP et al. High dose vitamin E supplementation normalized retinal blood flow and creatinine clearance in patients with type I diabetes. *Diabetes Care*, 1999; 22: 1245-1251.

44. Wong TY, Shankar A, Klein R, Klein BE. Retinal vessel diameters and the incidence gross proteinuria and renal insufficiency in people with type I diabetes. *Diabetes*, 2004; 53(1): 179-84.
45. Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA et al. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junctions proteins occluding and zonula occluden. A potential mechanism of vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem*, 1999; 274: 23463-7.
46. Raviola G. The structural basis of the blood ocular barriers. *Exp Eye Res*, 1977; 25(Suppl): 27-63.
47. Gardner TW. Histamine, ZO-1 and increased blood retinal barrier permeability in diabetic retinopathy. *Trans Am ophthalmol Soc*, 1995; 93: 583-621.
48. Antonetti DA, Barber AJ, Khin S et al. Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occluding content vascular endothelial growth factor decreases occluding in retinal endothelial cells. Penn State Retina Research Group. *Diabetes*, 1998; 47: 1953-9.
49. Barouch FC, Miyamoto K, Allport JR et al. Integrin mediated neutrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000; 41: 1153-8.
50. Boeri D, Maiello M, Lorenzi M. Increased prevalence microthromboses in retinal capillaries diabetic individuals. *Diabetes*, 2001; 50: 1432-9.
51. Frank RN. Etiologic mechanisms in diabetic retinopathy. Chapter 73 1243-1276. *Retina*, 1994; Vol. 2; Basic Science and inherited retinal disease. Ed. Stephen J. Ryan. 2.^a edition. Mosby-St. Louis, Missouri.
52. Bek T. Gial cell involvement in vascular occlusion diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol Scand*, 1997; 75: 239-43.
53. Barber AJ, Antonetti DA, Gardner TW. Altered expression retinal occluding and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000; 41: 3561-8.
54. Mizutani M, Gerhardinger C, Lorenzi, M. Müller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes*, 1998; 47: 445-9.
55. Rungger-Brandle E, Dosso AA, Leuenberger PM. Glial reactivity, an early feature diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000; 41: 1971-80.
56. Zeng XX, Ng YK, Ling EA. Neuronal and microglial response in the retina streptozotocin-induced diabetic rats. *Vis Neurosci*, 2000; 17: 463-71.
57. Barber AJ, Lieth E, Khin SA et al. Neuronal apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect insulin. *J Clin Invest*, 1998; 102: 783-91.
58. Cooper ME, Vranes D, Youssel S. et al. Increased renal expression vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in experimental diabetes. *Diabetes*, 1999; 48: 2229-39.
59. Gilbert RE, Vranes D, Berka JL et al. Vascular endothelial growth factor and its receptor in control and diabetic rat eyes. *Lab Invest*, 1998; 78: 1017-27.

60. Ashton N, Ward B, Serpell G. Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular relevance to the problem of retrolental fibroplasias. *Br J Ophthalmol*, 1954; 38: 397-432.
61. Miller JW, Adamis AP, Aiello LP. Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Rev*, 1997; 13: 37-50.
62. Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, et al. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in retinal cells. *Arch Ophthalmol*, 1995; 113(12): 1538-1544.
63. Amin RH, Frank RN, Kennedy A, et al. Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997; 38: 36-47.
64. Clermont A, Aiello LP, Mori F, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and severity of nonproliferative diabetic retinopathy (NPDR) mediate retinal hemodynamics in vivo: A potential role for VEGF in the progression of nonproliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*, 1997; 124: 433-446.
65. Aiello LP, Bursell S, Clermont A, et al. Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor. *Diabetes*, 1997; 46: 1473-80.
66. Antonetti DA, Lieth E, Barber AJ, Gardner TW. Molecular mechanisms of vascular permeability in diabetic retinopathy. *Semin Ophthalmol*, 1999; 14: 2408.

2.3 Clasificación de la retinopatía diabética

La clasificación del estudio ETDRS tiene una sólida base científica y cada uno de sus niveles incluye las lesiones oftalmoscópicas o la combinación de lesiones que se asocian con un determinado riesgo de progresión (1,2). Esta clasificación es considerada para evaluar la severidad de la retinopatía diabética en los ensayos clínicos, es reproducible y ha sido ampliamente validada. Sin embargo, esta clasificación se consideró demasiado compleja para su uso en la práctica clínica diaria; cada una de 20 lesiones oftalmoscópicas debe ser graduada en una escala de 3 a 6 niveles, comparando los hallazgos con fotografías estándar.

Dada la complejidad de la escala ETDRS, múltiples grupos en diversos países desarrollaron sus propias clasificaciones simplificadas derivadas del ETDRS, para su empleo en la práctica clínica para retinopatía diabética (36). Estas clasificaciones son todas similares, pero no iguales y, por lo tanto, no comparables. La Academia Americana de Oftalmología, consciente de la necesidad de desarrollar una clasificación clínica práctica para la RD basada en la evidencia científica, reunió a un grupo de especialistas de 16 países que incluía oftalmólogos, investigadores y endocrinólogos para consensuar la elaboración de una escala de severidad para su uso (Global Diabetic Retinopathy Project Group). Alcanzando este consenso y aprobadas sus conclusiones, esta clasificación fue finalmente publicada en 2003 (7) como «propuesta para una escala de severidad para la retinopatía diabética y el edema macular». Esta clasificación ofrece una clara orientación en cuanto a la severidad de la retinopatía y su riesgo de progresión

Esta clasificación clínica se basa en evidencia científica proveniente de estudios previos, particularmente el ETDRS y el WESDR (8,9). La clasificación clínica propuesta por el Global Diabetic Retinopathy Project Group evalúa separadamente la retinopatía diabética y el edema macular diabético. La clasificación es oftalmoscópica.

2.3.1 Niveles de gravedad para retinopatía diabética

1. Sin retinopatía aparente. No se encuentran lesiones al examen oftalmoscópico. Equivale a nivel 10 de la escala ETDRS.

2. Retinopatía diabética no proliferativa leve. Sólo se encuentran microaneurismas retinianos, primera alteración oftalmoscópica demostrable en RD. Equivale al nivel 20 del ETDRS. Como conducta es recomendable optimizar el control de la glicemia, de la hipertensión arterial (HTA) si la hay y de los lípidos hemáticos.

3. Retinopatía diabética no proliferativa moderada. En esta etapa se pueden encontrar hemorragias retinianas, pero éstas no alcanzan el nivel crítico (más de 20 hemorragias intrarretinianas en los 4 cuadrantes). Otros hallazgos oftalmoscópicos pueden ser los exudados duros o lipídicos y los blandos o manchas algodinosas. Aunque estos últimos traducen la presencia de isquemia, su presencia no se asocia con mayor riesgo de progresión. Este nivel incluye también dilataciones venosas arrosariadas pero sólo en un cuadrante. La RDNP moderada equivale a los niveles 35 del ETDRS (probabilidad de progresión a RD proliferativa de 5,4% en un año) y 43 (11,9% de posibilidad de progresión). También incluye el nivel 47, con dilataciones venosas en un cuadrante, que tiene mayor riesgo de progresión a proliferativa en un año (26,3%). Existe consenso en que, dada la baja incidencia de progresión a RD proliferativa inicial en un año, la fotocoagulación con láser no está indicada en esta etapa. Particular atención deberá tener el paciente que presenta irregularidades y dilataciones del calibre venoso. Se debe optimizar el control metabólico, presión arterial y lípidos.

4. Retinopatía diabética no proliferativa severa. Cualquiera de las siguientes: hemorragias intrarretinianas severas, definidas como más de 20 en cada uno de los cuatro cuadrantes o dilataciones venosas definidas en 2 o más 4 cuadrantes o anomalías microvasculares intrarretinianas (IRMA) bien definidas en 1 cuadrante.

El principal problema con esta clasificación es la dificultad que se pueda tener en reconocer un foco de IRMA o las alteraciones venosas. Sin embargo, no es posible simplificar y basarse solo en el número de hemorragias, porque como lo demostró Klein al evaluar datos del WESDR, existe un porcentaje importante de pacientes que presenta IRMA o dilataciones venosas en ausencia de hemorragias intrarretinianas severas y que presentan igual riesgo de progresión a la forma proliferativa (7)

Las anomalías microvasculares intrarretinianas (IRMA) son pequeños vasos intrarretinianos tortuosos habitualmente de calibre fino, anormales y ajenos a la arquitectura normal de la vasculatura retiniana. En un examen rápido puede pasar fácilmente desapercibidos.

Las dilataciones venosas arrosariadas consisten en aumentos localizados del calibre venoso, con irregularidades definidas en el calibre venoso (fig. 4). También se pueden observar asas venosas, en que la vena pierde su trayecto rectilíneo y forma un asa o duplicación de la vena, que se divide en dos en un corto tramo. La RD no proliferativa severa conlleva un riesgo de progresión a proliferativa del 50,2% en un año y del 14,6% a RD proliferativa de alto riesgo. Si la RD no proliferativa es muy severa (reúne las 3 características: hemorragias severas + venas arrosariadas + IRMA), el riesgo de progresión a RD proliferativa de alto riesgo es del 45% en un año.

En consideración al alto riesgo de progresión y por lo tanto de ceguera, puede considerarse iniciar una panfotocoagulación con láser en esta etapa, en especial en pacientes con diabetes tipo 2 con catarata parcial, mal control metabólico, RD avanzada en el ojo contralateral y en pacientes inconstantes en sus controles.

5. Retinopatía diabética proliferativa. Incluye todos los ojos con neovascularización retiniana o papilar bien definida y/o hemorragia vítrea o prerretiniana. Esta única categoría abarca varios niveles de la escala ETDRS: el 61 (RD proliferativa leve, con neovascularización retiniana menor de 1/2 área papilar en uno o más cuadrantes) el 65 RD (proliferativa moderada, con neovascularización retiniana mayor de 1/2 área papilar y neovascularización de la papila inferior a 1/3 de área papilar) y los niveles 71 y 85 (RD proliferativa de alto riesgo con neovascularización papilar mayor de 1/3 del área papilar y/o hemorragia prerretiniana o vítrea). Este nivel también incluye la RD proliferativa

avanzada, con proliferación fibrovascular, desprendimiento de retina traccional/regmatógeno y fondo no examinable por opacidad vítrea. La fotocoagulación con láser debe realizarse en pacientes con RD proliferativa leve si tienen mal control metabólico, catarata parcial o se piensa que no acudirán a sus controles.

En los pacientes con RD proliferativa de alto riesgo, con neovascularización del disco o hemorragia vítrea o prerretiniana (figs. 7 y 8), el tratamiento con láser es obligado y debe realizarse de forma inmediata.

Formas más avanzadas pueden requerir tratamiento quirúrgico mediante vitrectomía.

2.3.2 Edema macular diabético

Niveles de severidad:

1. Sin edema macular evidente. No se detecta engrosamiento retiniano ni exudación lipídica en polo posterior.
2. Edema macular presente.
 - 2.1. Edema macular diabético leve. Engrosamiento retiniano o exudación lipídica en polo posterior (entre las arcadas vasculares), pero lejos del polo posterior.
 - 2.2. Edema macular diabético moderado. El engrosamiento macular o los exudados lipídicos están próximos al centro de la mácula.
 - 2.3. Edema macular diabético severo. El engrosamiento retiniano y/o los exudados lipídicos afectan el centro de la fovea (fig. 10).

Aunque esta clasificación del Global Diabetic Retinopathy Group es sencilla y práctica, parece necesario recordar el concepto de «edema macular clínicamente significativo», introducido por el ETDRS (10), puesto que sigue siendo la regla de oro para iniciar un tratamiento.

El edema macular clínicamente significativo incluye:

1. Engrosamiento de la retina a menos de 500 micras del centro de la mácula.
2. Exudación lipídica a menos de 500 micras del centro de la mácula, si se asocia con aumento del grosor retiniano,
3. Zona de engrosamiento retiniano de 1 diámetro papilar o mayor, si una parte de éste está a menos de 1 diámetro papilar del centro de la mácula.

Finalmente, debemos enfatizar que la clasificación propuesta por el Global Diabetic Retinopathy Project Group se base exclusivamente en el examen oftalmoscópico, al alcance de cualquier oftalmólogo. Pruebas complementarias como la angiografía fluoresceínica y la tomografía de coherencia óptica pueden aportar información pronóstica o anatómica adicional.

2.2.3 Bibliografía

1. Diabetic Retinopathy Study Research Group. A modification of the Airlie House classification of diabetic retinopathy. Report Number 7. Invest Ophthalmol Vis Sci 1981; 21: 210-226.
2. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS Report Number 10. Ophthalmology 1991; 98: 786-806.
3. Verdaguer T J. Screening para retinopatía diabética en latino América. Resultados. Rev Sac Brasil Retina Vítreo 2001; 4: 145.
4. National Health and Medical Research Council. Clinical Practice Guidelines: management of diabetic retinopathy. Canberra: NHMRC, 1997.
5. Adlington SJ, Kohner EM, Meuer S, Klein R, Sjolie. Methodology for retinal photography and assessment of diabetic retinopathy: the EURODIAB IDDM Complications Study. Diabetologia 1993; 38: 437-444.
6. Leske MC, SuhYuh WU, MA, Hyman L, Xiaowei Li, Hen nis A, Connell AMS, Schachat AP. Diabetic retinopathy in a black population. The Barbados Eye Study. Ophthalmology 1999; 106: 1893-1899.
7. Wilkinson CP, Ferris F, Klein R, Lee P, Agardh CO, Davis M, Dills O, Kampik A, Pararajasegaram R, Verdaguer T J. Proposed International Clinical Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema Disease Severity Scales. Ophthalmology 2003; 110: 1667-1682.
8. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS Report Number 9. Ophthalmology 1991; 98: 766- 85.
9. Klein R, Klein BE, Moss SE, et al. The Wisconsin Epidemiological Study of Diabetic Retinopathy. X. Four-year incidence and progression of diabetic retinopathy when age of diagnosis is 30 years or more. Arch Ophthalmol. 1989; 107: 237-43.
10. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Photocoagulation for diabetic macular edema. ETDRS Report Number 1. Arch Ophtalmol. 1985; 103: 1796-1806.

2.4 Presentación clínica de la retinopatía diabética proliferativa

La retinopatía diabética proliferativa no es más que un estado evolutivo de las alteraciones producidas en la retina por la diabetes mellitus, en el que el deterioro y progresión del daño retiniano favorece la aparición de una serie de complicaciones que pueden en último término ser responsables de provocar en el paciente la ceguera; conocer estos signos clínicos, su evolución y pronóstico, es fundamental a la hora de plantearse el tratamiento adecuado en cada caso.

2.4.1 Definición

La retinopatía diabética proliferativa (RDP) se define como un estado evolutivo de la retinopatía diabética en la que aparecen neovascularización, tejido fibroso o ambos. Los neovasos se originan en la superficie del nervio óptico y/o en las capas internas de la retina, en estas, pueden aparecer desde cualquier punto de la circulación vascular retiniana, crecer atravesando la membrana limitante interna, extenderse sobre la superficie de la misma y sobrepasar la hialoides posterior, que les servirá de soporte y desde ahí alcanzar hacia la cavidad vítrea (1). El tejido fibroso que generalmente acompaña a la neovascularización, al tener tendencia a la contracción, provocará hemorragias prerretinianas o vítreas dependiendo de que la hialoides posterior se encuentre parcial o completamente desprendida, también puede producir desprendimientos de retina traccionales que pueden afectar el área macular con la consecuente disminución de la agudeza visual. En el transcurso clínico puede aparecer rubeosis como consecuencia de la progresión de los neovasos en la cara anterior del iris y el ángulo camerular y en último término ocasionar un glaucoma neovascular.

2.4.2 Etiopatogenia

Se conoce desde hace años que la ausencia de perfusión capilar retiniana y consecuentemente la aparición de isquemia es la causa de la aparición de la

neovascularización (2), y que esta isquemia es la que estimula la síntesis de mediadores que en último término serán los responsables de la aparición del tejido fibrovascular (3). A lo largo de los años se han ido conociendo la existencia de una correlación entre el grado de tejido retiniano isquémico y la presencia de neovascularización, esto es así para las distintas entidades clínicas que ocasionan isquemia retiniana y entre ellas la retinopatía diabética (46). Estos factores angiogénicos difusibles estimulan el crecimiento de tejido vascular y fibroso tanto a nivel local, es decir, en el tejido retiniano lindante con el área isquémica, así como a distancia en el nervio óptico, cuerpo ciliar, iris, y demás estructuras endoculares. En el curso de la retinopatía diabética es bien conocido que aparecen alteraciones en el flujo sanguíneo con aumento de la permeabilidad vascular y rotura de la barrera hematorretiniana.

La pared vascular padece los efectos de una circulación alterada, lo cual ocasiona que el coeficiente de rozamiento sea superior al normal, ello es debido a una serie de alteraciones hematológicas que comprometen a elementos formes de la sangre, sobretodo glóbulos rojos y plaquetas; hay un aumento de la viscosidad del plasma y sangre total, a expensas sobre todo del incremento de la agregación plaquetaria y la disminución de la deformabilidad de los eritrocitos lo cual repercute sobre las células endoteliales ya alteradas por cambios bioquímicos, lo que genera una disminución de su población; estos cambios estructurales aumentan la permeabilidad de los vasos que ocasiona extravasación de plasma y proteínas a nivel capilar ocasionando edema y exudados duros, la pared arteriolar aumenta su grosor y pierde elasticidad; este hecho asociado a la disminución de pericitos condiciona en la pared arteriolar la pérdida de la capacidad reguladora del flujo y de la presión intravascular en un proceso similar al de la arterioesclerosis e hipertensión con lo que los vasos retinianos se vuelve incapaces de controlar de forma adecuada los aumentos de presión de perfusión (7). Este aumento de la permeabilidad vascular retiniana se ha podido objetivar con técnicas de fluorometría vítrea y de cámara anterior (8-10). La neovascularización es la clave de la RDP y esta se produce cuando se rompe el delicado equilibrio por sobreproducción o activación de factores angiogénicos o por reducción de la cantidad de agentes inhibidores (7). La angiogénesis está regulada de forma

muy precisa, últimamente se conocen una serie de factores vasoproliferativos endógenos y otros inhibidores, se han descrito algunas de sus propiedades pero no se conoce de forma exacta su interrelación ni los factores necesarios para la aparición de neovascularización, lo mismo se puede decir de los moduladores de la respuesta angiogénica tales como macrófagos, células cebadas, heparina y cobre.

La isquemia retiniana precede a la aparición de neovasos y se considera el factor desencadenante clave para la génesis de factores angiogénicos difusibles (2, 3, 11). En el proceso de la angiogénesis es fundamental la migración y proliferación de las células del endotelio vascular, en los mamíferos estas células permanecen diferenciadas sin actividad proliferativa (12,13), pero en el curso clínico de la retinopatía diabética se puede perder el control del crecimiento de las células endoteliales y desencadenarse el proceso angiogénico. Se han descrito numerosas sustancias con capacidad angiogénica tales como la hormona del crecimiento, factores de crecimiento secundarios como el factor de crecimiento similar a la insulina, angiotensina (11), polipéptidos, factores de crecimiento de fibroblastos de entre estos los más estudiados a nivel retiniano son, el factor de crecimiento fibroblástico básico (FCF b) el factor de crecimiento del endotelio vascular (FCEV o VEGF) y el factor transformador del crecimiento (FTC), todos estos factores son de especial importancia en el crecimiento del tejido fibrovascular en la retinopatía diabética. Estos factores han sido aislados de tejidos oculares así como de modelos experimentales animales. El factor bFCF, estimula la proliferación y migración endotelial en matrices de colágeno similares a capilares (14,15). El IGF también actúa como estimulante de la migración y proliferación endotelial y se ha demostrado su acción angiogénica en vivo, clínicamente se ha evidenciado que su concentración intravítrea es mayor en pacientes con RDP que en el grupo control (16). El VEGF se ha demostrado suficiente para generar por si solo neovascularización si es inyectado intravítreo en ojos de experimentación y es un potente inductor de la proliferación fibrogial (17). La diabetes mellitus provoca como se ha dicho una serie de anomalías vasculares en la retina a través de mecanismos multifactoriales ocasionando una hipoperfusión e isquemia retiniana; estos cambios estimulan la síntesis de

factores de crecimiento en las células retinianas, los cuales difunden desde el tejido retiniano hacia todo el globo ocular acoplándose a receptores altamente específicos de las células endoteliales capilares; esta unión induce una serie de reacciones bioquímicas intracelulares que estimulan la replicación celular y aumentan la permeabilidad vascular. El gel vítreo aparte de representar un reservorio de factores de crecimiento, ejerce un factor mecánico para el crecimiento del tejido fibrovascular, si la cortical del vítreo se mantiene adaptada provee a los neovasos una arquitectura de soporte para el crecimiento de los mismos hacia la cavidad vítrea; si se produce un desprendimiento del vítreo precoz antes de la aparición de la RDP este actuará como factor de protección frente a la aparición de un desprendimiento de retina traccional.

2.4.3 Neovascularización

El riesgo de iniciar una RDP es mayor en pacientes que presentan una retinopatía diabética no proliferativa severa RDNPS, esta incluye signos como exudados algodonosos, los cuales traducen un infarto isquémico de la capa de fibras nerviosas, anomalías microvasculares intraretinianas (AMIR), arrosamiento venoso y áreas extensas de microaneurismas y hemorragias intrarretinianas. En el estudio de retinopatía diabética (DRS) la RDNP severa se define como aquel paciente que presenta al menos tres de estas características con afectación de los cuatro cuadrantes del fondo ocular (18-20); alrededor del 50% de estos pacientes en el grupo control del estudio desarrollaron neovascularización en un periodo de seguimiento de 15 meses (21). Las características de RDNP severa no están siempre presentes cuando se inicia la neovascularización, una posible explicación a ello es que los exudados algodonosos desaparecen, las hemorragias y AMIR lo pueden hacer si se produce un aumento del área de oclusión capilar. En algunos casos las lesiones retinianas son leves y no se observan zonas extensas de cierre capilar cuando aparecen los neovasos lo cual pone en evidencia que no siempre que se inicia la neovascularización hay una RDNP severa previa.

Las lesiones características en la RDNP severa son el cierre capilar y habitualmente representa un estadio previo a la aparición de neovasos. Hay evidencia angiográfica de que lesiones que se presentan en este estadio de la RD como las AMIR, reduplicación venosa o la aparición de pequeñas vénulas son en realidad nuevos vasos intrarretinianos que intentan revascularizar zonas de oclusión capilar (22,23). La formación de neovasos se produce como respuesta a la isquemia y se originan en los tramos venosos situados en las zonas de no perfusión, son capilares que carecen de uniones íntimas entre sus células endoteliales por lo que son parcialmente permeables, su crecimiento se inicia dentro de la retina, posteriormente, atraviesan la membrana limitante interna y continúan creciendo sobre la hialoides posterior. Al principio, pueden aparecer finos capilares sobre la superficie del nervio óptico formando asas (Fig. 1a). Inicialmente carentes de tejido fibroso, progresan más o menos rápido y van aumentando su calibre, el tejido fibroso que aparece a continuación lo hace como soporte de las estructuras vasculares, en su evolución aumenta la adherencia entre ambos y la hialoides posterior, más adelante puede aparecer una regresión de los neovasos con contracción del tejido fibrótico. Clínicamente los neovasos aparecen como pequeñas formaciones localizadas sobre las venas formando capilares que se extienden desde las mismas por la superficie de la retina; habitualmente a lo largo de su trayecto o en el extremo distal de los mismos pueden observarse dilataciones saculares o fusiformes (Fig. 1b).

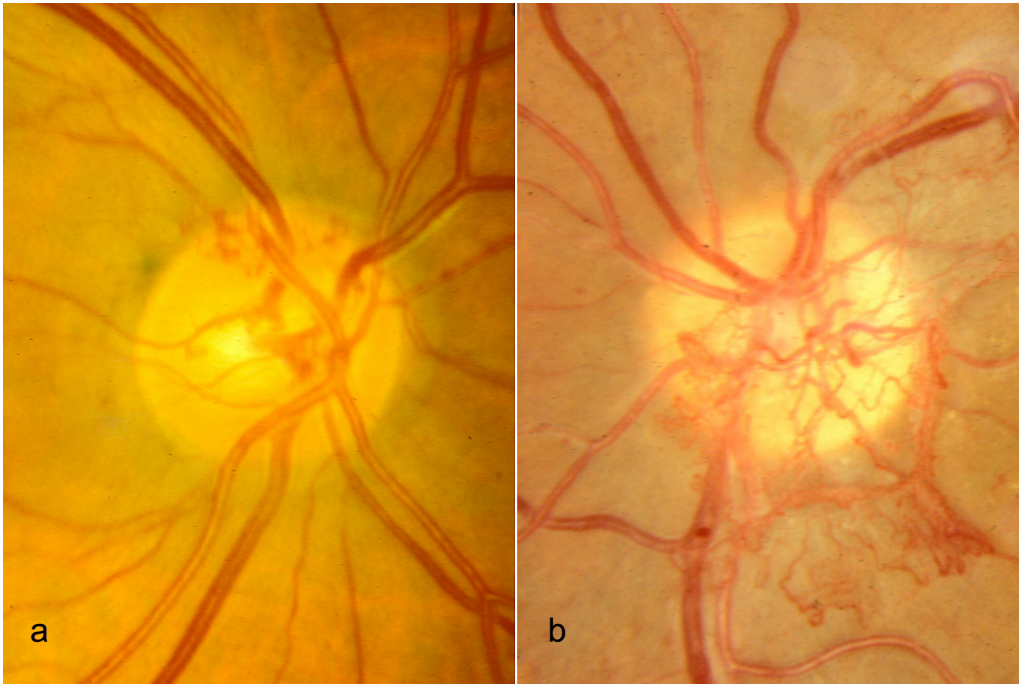


Fig. 1

Angiográficamente se observa una intensa hiperfluorescencia en relación con la retina adyacente ya que pierden fluoresceína profusamente lo cual está favorecido por la ausencia de uniones capilares en la luz del neovaso (Fig. 2),

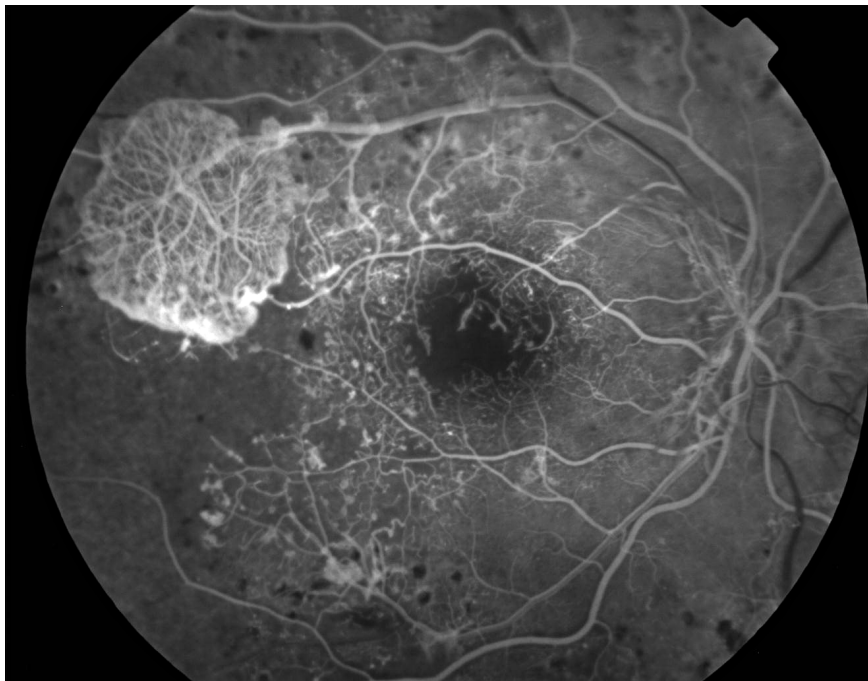


Fig. 2

la difusión es más precoz en cavidad vítrea o en el espacio subhialoideo que en la retina, grandes áreas de neovasos pueden extenderse en abanico y presentar extensas fugas, aunque en los complejos neovasculares muy extensos pueden desarrollarse uniones endoteliales firmes y presentar menos hiperfluorescencia.

La neovascularización ocurre más frecuentemente en el polo posterior alrededor de los 45° centrales que rodean al II par (24). Los neovasos papilares son aquellos que aparecen en la superficie del nervio óptico o en una extensión de retina de un diámetro papilar adyacente al mismo, se originan en el sistema vascular peripapilar que irriga el nervio óptico y crecen hacia la retina a lo largo de la superficie posterior del vítreo o bien hacia la cavidad vítrea. La neovascularización papilar (NVP) se asocia a amplias zonas de no perfusión localizadas cerca del disco óptico o bien a distancia, en la extrema periferia; la severidad de la NVP viene determinada por su extensión, y una NVP se considera severa si su extensión es igual o mayor de 0,25 diámetros de disco y su aparición es particularmente frecuente, en las distintas series su frecuencia oscila entre el 69-73% de los casos (25,26). En el estudio RDS en el grupo control que presentó neovascularización en las fotografías de base, un 15% lo hicieron en la superficie del nervio óptico o en un diámetro papilar a su alrededor (neovasos papilares), un 40% lo hicieron fuera de esta área (neovasos extrapapilares) y un 45% lo hicieron en ambas zonas (24,27). Los neovasos papilares son fácilmente detectables, ya desde su inicio empiezan formando pequeñas redes vasculares y en su crecimiento, van incrementando su tamaño hasta un cuarto del diámetro de una vena cuando emerge del II par y se orientan de forma radiada desde el mismo.

La neovascularización extrapapilar aparece más a menudo lindando con una área de tejido no perfundido, aparecen en forma de una fina red de neovasos en relación con una vena, vénula o capilar cruzando entre el lado arterial y venoso (28); aunque su origen es intrarretiniano la NVE puede atravesar la membrana limitante interna y crecer por debajo de la hialoides posterior (25) (Fig. 3).

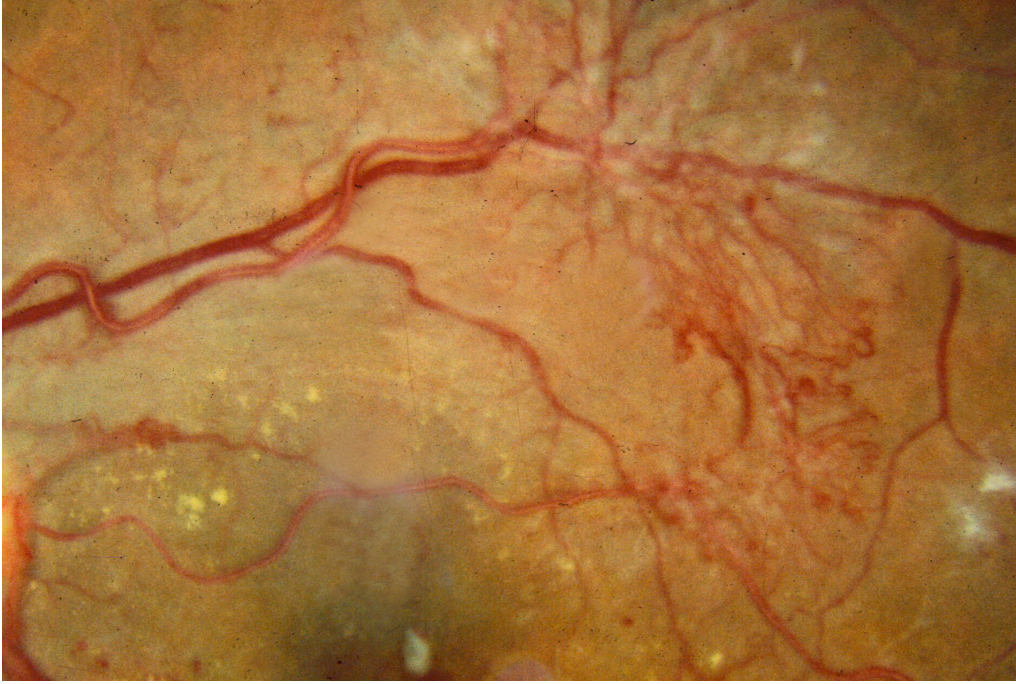


Fig. 3

Otra forma de aparición de los neovasos son aquellos que ya desde su inicio presentan un calibre similar a los vasos retinianos normales y crecen sobre la superficie retiniana sin formar redes (Fig. 4),

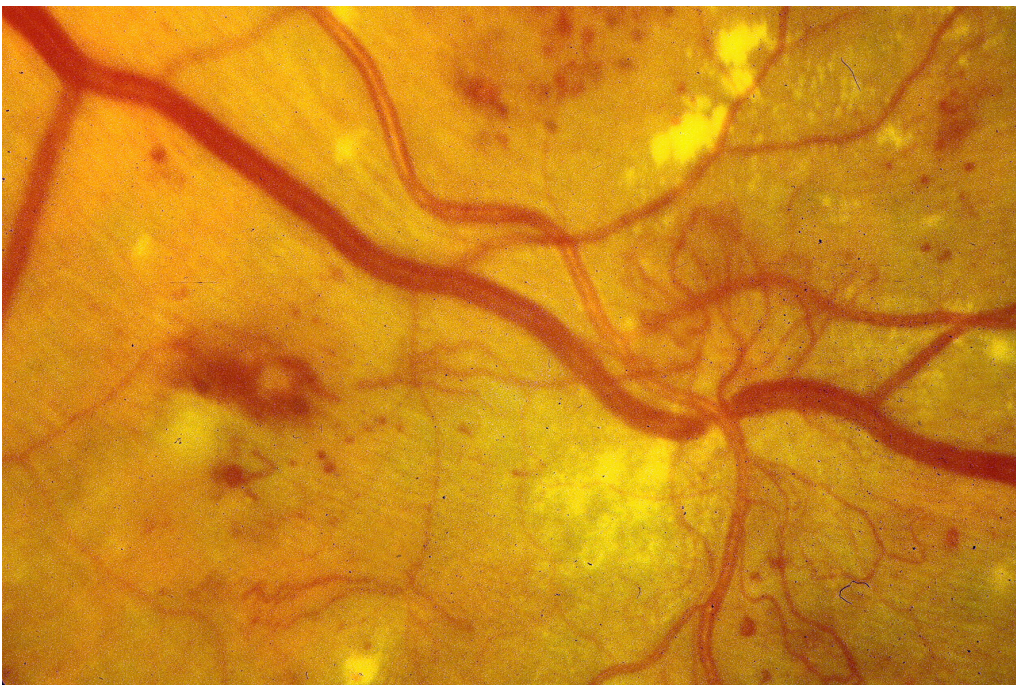


Fig. 4

Tanto los neovasos papilares como los retinianos son fácilmente distinguibles mediante biomicroscopía con lente estereoscópica de 60 D, o con lente de contacto o bien mediante fotografía estereoscópica de 30° (19,26). La localización típica es junto a áreas de cierre capilar (isquemia retiniana) coincidente con exudados algodonosos o microaneurismas descompensados que han ocasionado hemorragias intrarretinianas. El método ideal de detección de los neovasos combina, oftalmoscopia indirecta binocular en 360° de la superficie retiniana, biomicroscopía de los 6 DD centrados en el II par y de cualquier zona sospechosa que se haya hallado durante la exploración indirecta. Para la detección de neovasos fuera del disco óptico las estereofotografías de 30° son muy útiles especialmente si se utilizan los 7 campos de la clasificación modificada de Airlie Hause (19), tomando como base estos campos fotográficos, serán de gran ayuda para la detección de neovasos en controles sucesivos.(Fig. 5)

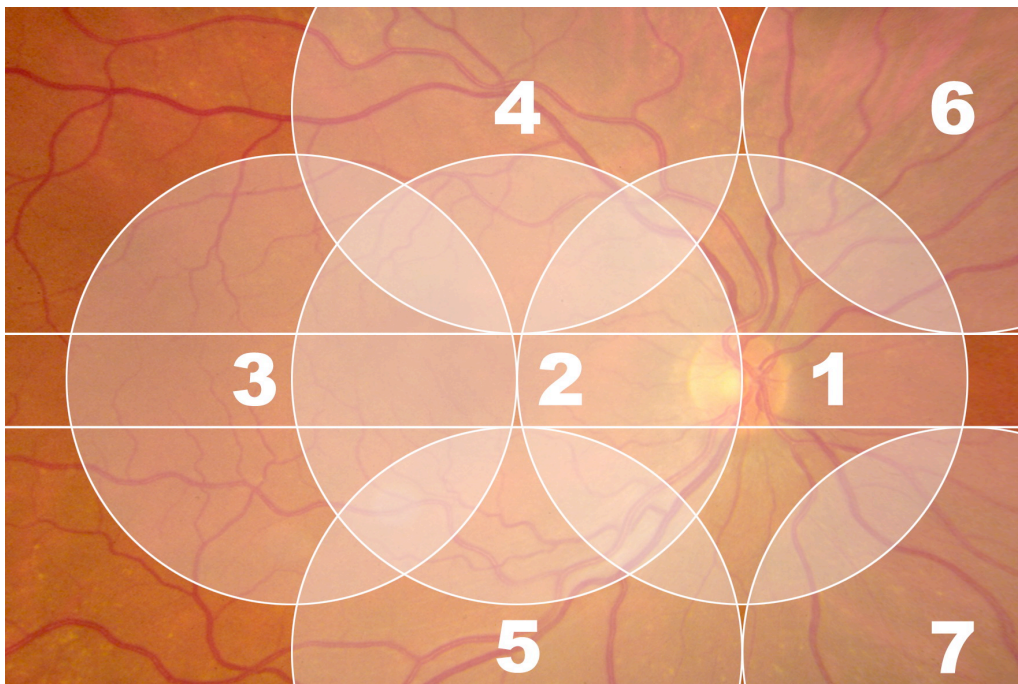


Fig. 5

Cuando la neovascularización no se detecta con biomicroscopía o campos fotográficos pero se sospecha por haber presentado hemorragia vítrea reciente puede ser de ayuda la inspección de la retina periférica con lente de tres espejos de Goldman y especialmente útil será la angiografía fluoresceínica en la que podremos observar una intensa fuga de contraste coincidente con la

localización de los neovasos; hay que considerar la posibilidad de que la hemorragia pueda provenir de un desgarro retiniano periférico por lo que es importante realiza un oftalmoscopia indirecta de la retina periférica con indentación. En ocasiones es difícil diferenciar los neovasos de los AMIR, estos representan una dilatación de capilares retinianos dilatados o formando shunts, mediante angiografía no es difícil su diagnóstico puesto que estos no exudan mientras que si lo hacen los neovasos. La angiografía no es imprescindible para detectar los neovasos pero es de gran ayuda en los casos que se generen dudas diagnósticas, las lesiones sospechosas deben ser seguidas con controles frecuentes.

Inicialmente los neovasos pueden ser visibles con dificultad pero en cuanto crecen aumentan el calibre y se distribuyen con frecuencia creando un red vascular a veces de forma radiada desde su punto de origen, en la extrema periferia pueden crecer paralelamente a la base del vítreo, al tiempo que van creciendo y extendiéndose van perdiendo su configuración de red vascular y se van pareciendo cada vez más a las venas retinianas normales con la particularidad de que cruzan tanto las arterias como a las venas (Fig. 6).

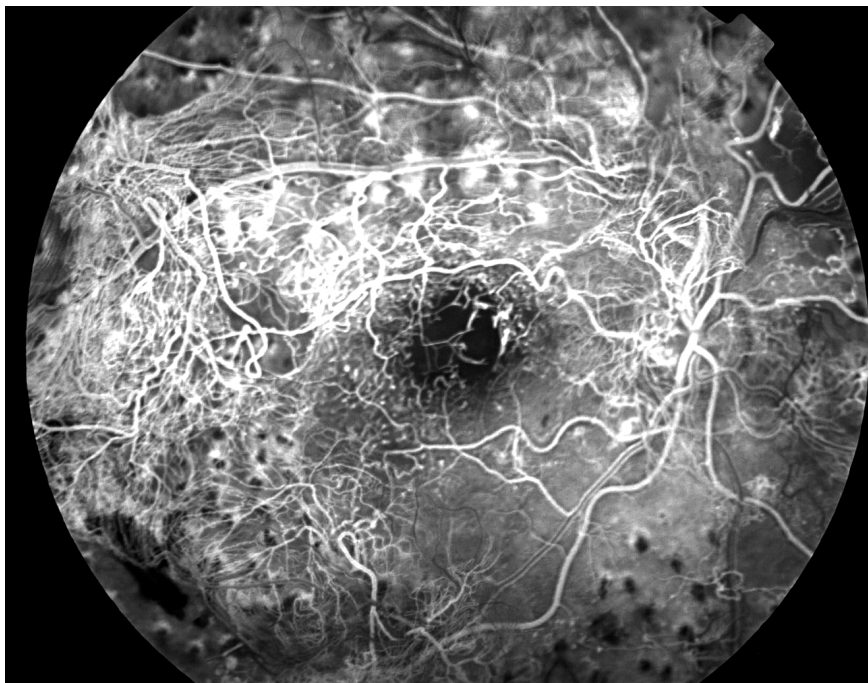


Fig. 6

El grado de crecimiento de los neovasos es muy variable, en algunos no se detecta crecimiento de los mismos tras semanas de seguimiento, mientras que en otros este crecimiento se puede evidenciar solo con un control en 1-2 semanas. Al principio los neovasos suelen aparecer descubiertos, pero más tarde un fino tejido fibroso aparece adyacente a ellos, este está compuesto por fibrocitos y células gliales. Típicamente siguen un ciclo de aparición, crecimiento y regresión posterior y esta puede ser parcial o completa (25, 29, 30). La regresión se inicia con una reducción de calibre y del número de neovasos cerca del origen de los mismos y son reemplazados por tejido fibroso. En ocasiones los neovasos en regresión tienen aspecto envainado debido a un aumento del espesor de la pared del vaso, este puede ser tan denso que aparecerá como una línea blanca sin poder visualizarse la columna hemática en su interior. Es frecuente en un mismo caso visualizar nuevos vasos emergiendo de la neovascularización en regresión como también evidenciarlos en una misma retina en distintos tiempos evolutivos; el componente fibrovascular de la neoproliferación tiende desde su inicio a hacerse transparente por lo que a veces es subestimado, en ocasiones solo es visible cuando experimenta una contracción y se separa de la superficie retiniana, si esto no se produce los neovasos pueden aparecer e involucionar sin que se produzca ningún síntoma visual incluso pueden regresar sin dejar ningún rastro de su anterior presencia.

2.4.4 Proliferación fibrosa y contracción vítrea

La proliferación fibrosa puede presentarse aislada o lo que es más frecuente asociada a neovasos; puede observarse en cualquier localización retiniana formando desde finas láminas a gruesos cordones fibrosos hasta incluso extensas condensaciones de tejido fibroso. En la proliferación fibrosa se incluye el engrosamiento de la hialoides posterior y las áreas vasculares o con vasos atróficos en ocasiones sin columna hemática visible en su interior. El tejido crece sobre las arcadas y nervio óptico pudiendo llegar a formar un anillo fibroso circular (Fig. 7).



Fig. 7

El crecimiento es más evidente en el borde de la laguna de vítreo licuado premacular que existe en estos pacientes (31). Antes de que se produzca el desprendimiento vítreo posterior las redes neovasculares aparentan estar anteriores a la superficie de retina, aunque no existe separación entre la retina y la hialoides posterior, en este estadio los neovasos suelen ser asintomáticos, aunque pequeñas hemorragias pueden aparecer cerca del extremo del borde de crecimiento de los mismos, estas hemorragias suelen mantenerse retrorhiloideas y si no son extensas o no afectan el área macular pueden pasar desapercibidas por el paciente (16,32,33). Cuando las hemorragias son clínicamente sintomáticas siempre suelen coincidir con la presencia de un desprendimiento vítreo parcial o total.

Cuando solo existe un pequeño desprendimiento del vítreo posterior, se aprecia como una zona plana muy próxima a la retina, si este desprendimiento continúa y se hace más extenso la superficie de la hialoides posterior se desplaza hacia la cavidad vítrea media y se aprecia un contorno curvo más o menos paralelo a la retina siendo la distancia de separación variable. Este desplazamiento anterior de la HP se mantiene adherida a los penachos fibrovasculares que emergen desde el lugar de origen de los neovasos provocando tracciones, la cavidad que queda entre la HP y la retina aparece

ópticamente vacía solo ocupada en ocasiones por restos hemáticos (34). La causa principal de este desplazamiento anterior del vítreo se debe a la contracción de la hialoides posterior, el espesor de la misma es variable, siendo más gruesa en la zona de emergencia de los neovasos debido al crecimiento de tejido fibroso a lo largo de su superficie, a distancia de estas áreas suele ser más delgada pudiéndose en algunas áreas observar agujeros de espesor completo.

El desprendimiento de vítreo posterior (DVP) generalmente se inicia cerca del polo posterior (31), el lugar más frecuente es la zona adyacente a los vasos superotemporales, rápidamente se extiende hacia la periferia del cuadrante donde se inicia, aunque la extensión a otros cuadrantes es más lenta, pudiendo llegar a tardar meses o incluso años. El desprendimiento de vítreo posterior del II par a veces se dificulta por la adhesión del tejido fibrovascular procedente del mismo con el vítreo. El DVP no es un proceso suave sino que evoluciona a brotes, a veces bloqueado por una proliferación retino-vítrea; si la tracción continúa puede hasta arrancarla y progresar por detrás de la misma, en ocasiones se detiene en zonas de retina adheridas a la hialoides posterior donde no existen neovasos, esto clínicamente se traduce en áreas de elevación de la cara interna de la retina en relación a áreas límite entre hialoides posterior adaptada y desprendida que genera tracción puntual sobre una área retiniana.

2.4.5 Hemorragias

La retinopatía diabética proliferativa puede ser asintomática hasta que aparecen hemorragias, estas pueden aparecer en el espacio prerretiniano o bien en la cavidad vítrea. Las hemorragias subretinianas son poco frecuentes pero pueden hallarse en la RDP de larga evolución (35); el tamaño, extensión y densidad de las mismas es variable y dependen de distintos factores.

Tanto la contracción de la proliferación fibrosa como la tracción de la hialoides posterior que ejercen tracción sobre los neovasos pueden ser causa de hemorragia, con frecuencia estas pueden quedar limitadas por la extensión del

desprendimiento del vítreo. En algunos casos las hemorragias pueden aparecer sin tracción vítrea, provocadas por fenómenos de valsalva o por reacciones a la inyección de insulina (36); con frecuencia pueden presentarse durante el sueño sin un factor desencadenante conocido, aunque es lógico pensar que las tracciones que puede ejercer el vítreo durante la fase de movimientos oculares rápidos, que se producen durante la fase REM del sueño puedan ser un factor etiológico (37). Los resultados del estudio ETDRS, así como de otras publicaciones, indican que la toma de ácido acetilsalicílico o derivados no aumenta el riesgo de poder padecer una hemorragia vítrea (38,39). El movimiento que se puede observar de la sangre contenida en la cavidad vítrea permite valorar el grado de desprendimiento del vítreo (39). En las hemorragias preretinianas, la sangre queda atrapada entre la retina y la hialoides posterior desprendida en el espacio prerretiniano, retrohialoideo o subhialoideo, el aspecto oftalmoscópico típico es el de un nivel superior mientras que su porción distal marca la zona de adherencia vítreo-retiniana (33), lo que le confiere un aspecto que se dado en llamar de «quilla de barco» (Fig. 8),

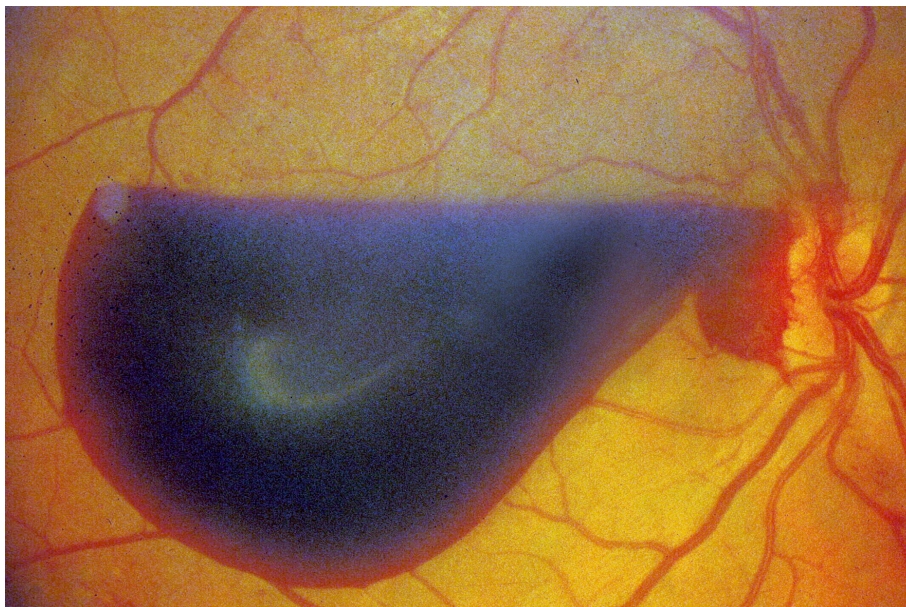


Fig. 8

La hemorragias pueden tener también aspecto redondeado o lineal y con frecuencia se pueden ver en un mismo caso las distintos tipos de hemorragias (Fig. 9).

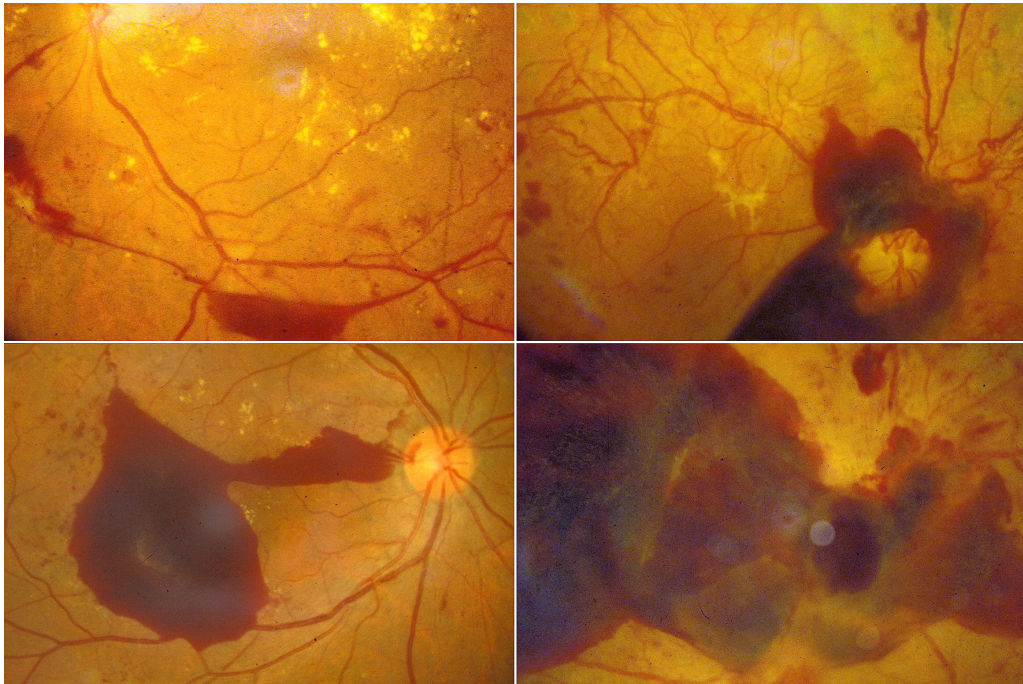


Fig. 9

La sangre tiene una absorción relativamente rápida cuando se halla en contacto con el vítreo fluido detrás de la hialoides posterior desprendida, aunque este proceso puede durar semanas. Las hemorragias vítreas se producen cuando la sangre atraviesa la hialoides posterior y penetra en la cavidad vítrea, al liberar hemosiderina, esta acelera el desarrollo de la sinéresis y contracción del vítreo lo cual puede condicionar a su vez un aumento de tracciones y consecuentemente de las hemorragias. Las hemorragias vítreas son más lentas en su proceso de reabsorción y durante el mismo pierden su color rojo para volverse cada vez más blanquecinas, dejando ver un vítreo organizado, que en la mayoría de casos precisará de tratamiento quirúrgico.

2.4.6 Desprendimiento de retina

Las tracciones ejercidas sobre la superficie retiniana por la hialoides posterior desprendida y tejido de proliferación fibrosa pueden ocasionar desprendimientos de retina traccionales; estos son más probables cuando se ejercen tracciones antero-posteriores o tangenciales y clínicamente pueden tener distinta apariencia. Lincoff (40,41) diferencia el desprendimiento de retina

traccional de la retinosquiasis, provocados ambos por las tracciones en polo posterior; estudios histopatológicos recientes en ojos enucleados afectados de retinopatía diabética proliferativa han demostrado que la retinosquiasis traccional de polo posterior es relativamente frecuente en estos pacientes (42). Para valorar las tracciones en polo posterior, cuando los medios son transparentes, es primordial un estudio biomicroscópico, así mismo, para el estudio del desprendimiento de retina a nivel macular es muy útil el uso de la Tomografía de Coherencia Óptica, esta nos permitirá diferenciar entre la retinosquiasis de polo posterior y el desprendimiento traccional, así como diagnosticar la presencia de membranas epirretinianas que con frecuencia se ven en estos casos (43, 44). Esta diferenciación clínica es muy importante a la hora de dar un pronóstico preoperatorio a estos pacientes. Cuando existen opacidades hemáticas o bien por vítreo organizado posthemorrágico que no nos permita una buena visualización del fondo ocular será imprescindible un estudio ultrasonográfico.

En la retina, en condiciones normales existen adherencias vítreo-retinianas en casi toda su superficie siendo más cohesivas las que aparecen en la base del vítreo, alrededor del nervio óptico, macula y grandes vasos. En paciente con RDP estas adherencias se ven reforzadas con un engrosamiento de la hialoides posterior, además de las adherencias secundarias a las proliferaciones fibrovasculares que aparecen en este estadio de la retinopatía diabética. Cuando se contrae el vítreo se puede producir un desprendimiento parcial en la parte posterior del mismo manteniéndose adherencias al plano retiniano, creándose tracciones antero-posteriores, en ocasiones, puede observarse junto a una área de tracción la presencia de agujeros retinianos de espesor total, los cuales pueden ser causa de desprendimientos de retina regmatógenos. Entre estas zonas y la base del vítreo durante este proceso de desprendimiento parcial del vítreo puede aparecer un desprendimiento de retina traccional focal, en este caso la retina adopta forma de tienda de campaña.

Muchas veces las adherencias vítreo-retinianas son más fuertes alrededor del II par y en arcadas vasculares temporales debido a un mayor engrosamiento de la HP con mayor componente de tejido fibrovascular en esta área, en estos

casos se puede producir un desprendimiento retina traccional sobre arcadas temporales quedando la retina suspendida como una hamaca entre ambas arcadas superiores e inferiores, en estos casos es más frecuente la afectación macular.

Si se deja evolucionar de manera espontánea, la tendencia es a producirse una mayor contracción del vítreo y generarse un desprendimiento de retina total con formación de grandes pliegues. En la superficie anterior y posterior de la retina desprendida pueden aparecer membranas proliferativas pre y subretinianas. En otras ocasiones el mecanismo traccional es diferente, se produce una contracción tangencial del tejido fibrovascular entre la papila y arcadas vasculares; al ser la adherencia papilar más fuerte se produce una tracción con distorsión del área macular (45); en este proceso puede involucrarse el EPR el cual aparecerá distorsionado hacia el punto de mayor tracción. En otros casos es solo la macula la que está afectada. El lugar de mayor contracción suele ser junto al nervio óptico y la macula es desplazada hacia cuadrantes nasales. Si la fuerza traccional es combinada, tangencial y antero-posterior se puede originar un desprendimiento de retina en meseta, que afecta todo el polo posterior. El desarrollo de la proliferación fibrosa prerretiniana puede producir una tracción tangencial que ocasiona un desprendimiento de retina multifocal plano.

Los desprendimientos de retina traccionales se dividen según se afecte o no la macula, los extramaculares son más frecuentes y muchas veces asintomáticos; por lo que no precisarán de tratamiento quirúrgico inmediato, solo un pequeño porcentaje afectarán la macula de forma progresiva, en este caso si es imprescindible realizar una vitrectomía y liberar a la retina de tracciones lo antes posible.

2.4.7 Rubeosis

La neovascularización del iris es una complicación de RDP. La rubeosis se caracteriza por la presencia de neovasos en la superficie del iris; inicialmente aparecen en el reborde pupilar y raíz del iris donde existen capilares, a partir de los cuales aparecerá la neovascularización; los neovasos del ángulo son provenientes de capilares del iris y de cuerpo ciliar, todos ellos crecen de forma anárquica y se acompañan de tejido fibroso que tapiza el ángulo camerular y superficie del iris; este tejido fibrovascular puede regresar con tratamiento adecuado, pero si por el contrario progresa, puede ocasionar un glaucoma neovascular de ángulo abierto o cerrado dependiendo de que el tejido de proliferación recubra todo el ángulo o no. Un porcentaje entre un 25% de ojos con rubeosis desarrollarán glaucoma neovascular en el plazo de un año (46,47); en la mayoría de ellos será de aparición precoz, 33% en el primer mes de seguimiento y un 60% lo hará antes de los tres primeros meses (48). Con frecuencia los neovasos son visibles a la lámpara de hendidura con la pupila no dilatada (Fig.8).

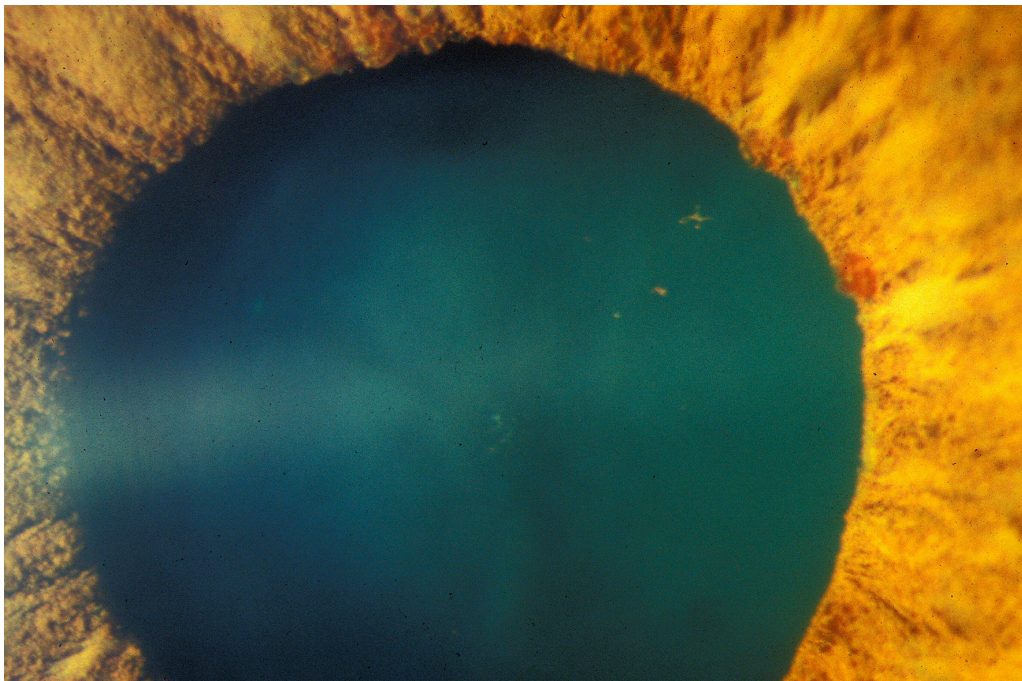


Fig. 8

2.4.8 Retinopatía diabética involutiva

Cuando se produce en el curso evolutivo de la retinopatía diabética un desprendimiento de vítreo total, excepto en las zonas de adherencia a los penachos fibrovasculares, la RD tiende a entrar en un estadio involutivo (49-51). Las hemorragias vítreas van disminuyendo en frecuencia e intensidad hasta desaparecer completamente, en este momento siempre suele existir un grado más o menos importante de desprendimiento de retina en función de las adherencias vítreo-retinianas, si la macula está intacta la agudeza visual puede ser buena, aunque lo habitual es encontrarnos con una macula traccionada y con un grado variable de edema y exudación lipídica y por lo tanto con baja agudeza visual, quizás en la mayoría de los casos el desprendimiento de retina existente afecte el polo posterior con una importante reducción de visión. Se produce una marcada reducción de calibre vascular, las venas anteriormente dilatadas y arrosariadas pueden recuperar su calibre normal o tener una apariencia envainada; las arteriolas presentan una franca reducción de su calibre con disminución de sus bifurcaciones, algunas arteriolas aparecen blancas y exangües, hay una reducción de las hemorragias y de los microaneurismas, los neovasos se reducen en calibre y número al tiempo que no aparece nueva neovascularización. El tejido fibroso aparece más delgado y transparente, hay una franca palidez del segundo par con cambios atróficos a nivel del epitelio pigmentario de la retina, todo ello va acompañado por una baja agudeza visual que se explica, entre otros motivos, por la severa isquemia retiniana.

2.4.9 Tratamiento quirúrgico

En ocasiones por la evolución clínica de la retinopatía se producen complicaciones como las hemorragias y el desprendimiento de retina que requerirán una reparación quirúrgica mediante vitrectomía vía pars plana.

En la RDP se produce un crecimiento neovascular estimulado por la respuesta angiogénica secundaria a la isquemia retiniana, ello da lugar a un crecimiento

de nuevos vasos y tejido fibrótico .Este tejido se extiende inicialmente sobre la hialoides posterior que le sirve de armazón desde donde alcanzar el vítreo posterior. El crecimiento es proporcional al estímulo isquémico y se extiende hacia la cavidad vítrea. La contracción del tejido fibrovascular puede ocasionar hemorragias premaculares densas en el polo posterior o hemorragias extensas dentro de la cavidad vítrea así como tracciones sobre la retina que causaran desprendimiento de la misma tanto en el polo posterior como en la periferia; todo ello puede ocasionar una disminución severa de la agudeza visual y requerirá la realización de una vitrectomía pars plana cuyo objetivo es la aclaración de los medios y la relajación de las tracciones sobre la superficie de la retina; la realización de un tratamiento ablativo mediante la panfotocoagulación con láser reducirá el tejido periférico isquémico y consecuentemente el estímulo neovascular proliferativo.

La indicación del tratamiento quirúrgico viene determinada por la presencia de:

- Hemorragias premaculares
- Hemorragia vítrea
- Desprendimiento de retina traccional
- Tracción tangencial del polo posterior
- Desprendimiento de retina combinado traccional y regmatógeno
- Opacificación del vítreo

Hemorragia premacular y/o vítrea

La hemorragia vítrea sigue siendo la primera causa de la indicación de vitrectomía en el paciente diabético. Clínicamente se refiere como la disminución súbita de agudeza visual más o menos severa en función de la densidad de la misma el diagnóstico viene determinado por la exploración mediante oftalmoscopia y en función de la transparencia de medios por la

ecografía dinámica; esta es especialmente útil para estudiar las tracciones vítreo-retinianas

Desprendimiento de retina traccional

La indicación quirúrgica viene determinada por la presencia de un desprendimiento de retina en polo posterior o por fuera de él. Estas tracciones provocan cambios en la retina y epitelio pigmentado que pueden ser crónicos y ocasionar si no se corrigen un deterioro visual permanente ; es por ello que en estos casos se realiza una vitrectomía pars plana complementada con técnicas de segmentación, delaminación y viscocirugía que solas o en combinación van encaminadas a obtener una relajación de las tracciones vítreo-retinianas con la restauración de la superficie retiniana ;a su vez se debe complementar el tratamiento con la panfotocoagulación adecuada para cada caso.

Tracción tangencial en el polo posterior

La aparición de tracciones de la hialoides posterior así como la presencia de membranas epirretinianas puede provocar distorsiones en el polo posterior, que en su curso evolutivo ocasionaran un gran deterioro visual secundario a desprendimiento foveales, edema macular difuso o en casos avanzados incluso ectopia macular. El tratamiento quirúrgico con disección de estas estructuras premaculares pueden sin duda mejorar el curso evolutivo y la agudeza visual del paciente.

Opacidades vítreas

Las opacidades del vítreo pueden ser motivadas por una hemorragia vítrea previa que ocasiona una degradación del vítreo con pérdida de su transparencia muchas veces secundaria a los depósitos de fibrina, fruto de la degradación de la sangre en la cavidad vítrea. Otras veces se produce una opacificación secundaria al engrosamiento de la hialoides posterior en

ocasiones adherida al polo posterior, la extracción de esta hialoides posterior mediante vitrectomía más delaminación de esta capa del vítreo suele llevar a una rápida mejoría de agudeza visual.

2.4.10 Bibliografía

1. Davis M. Proliferative diabetic retinopathy. In Ryan S (ed): Retina, vol. 2. St Louis, CV Mosby. 1989, pp. 367-402.
2. Michaelson IC. The mode of development of the vascular system of the retina, with some observations on its significance for certain retinal disease. Trans Ophthalmol Soc UK, 1948; 68: 137-180.
3. Ashton N. Retinal vascularization in health and disease. Am J Ophthalmol 1957; 44: 7-24.
4. The Diabetic Retinopathy Study Research Group. Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy: The second report of Diabetic Retinopathy Study findings. Ophthalmology 1978; 85: 82.
5. Kohner E, Schilling J, Hamilton A. The role of avascular retina in the new vessel formation. Metab Ophthalmol 1976; 1: 15.
6. Branch Vein Occlusion Study Group. Argon laser scatter photocoagulation for prevention neovascularization and vitreous hemorrhage in branch vein occlusion. Arch Ophthalmol 1986; 104: 34-41.
7. Bonalonte S, Garcia CA. Retinopatía diabética. Mosby Doyma: Epidemiología de la retinopatía diabética, 1996; 47-61.
8. Plehwe W, Sleightholm M, Koner E, et al. Does vitreous Fluorophotometry reflect severity of early diabetic retinopathy? Sr J Ophthalmol 1989; 73: 225-260.
9. Aiello L, Li R, Sebestyen J, et al. The eyes and diabetes: In Marble A (ed): Joslins Diabetes Mellitus, 12th ed. Philadelphia, Lea and Febiger, 1985.
10. Elizalde J. Estudio cuantitativo de la permeabilidad de la barrera hematoacuosa ocular como índice de actividad de la retinopatía diabética proliferativa. Tesis doctoral. 2003.
11. Wise NG. Retinal neovascularization. Trans Am Ophthalmol Soc 1956; 54: 729-733.
12. Engerman RL, Plaffenbach D, Davis MD. Cell turnover 01 capillaries. Lab Invest 1967; 17: 738-43.
13. Wise GN, Dollery CT, Henkind P. The Retinal Circulation. New York: Harper and Row 1971; 34-54.
14. Baird A, Böhlen P. Fibroblast growth factors. In Roberts AS, Sporn MS (eds): Handbook of Experimental Pharmacology: Peptid Growth Factors and Their Receptors. Serlin, Springer-Verlag, 1990, pp. 369-418.

15. Montesano R, Vassalli JD, Sraida A, et al. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 7297-301.
16. Grant MS, Mames RN, Fitzgerald C, et al. Insulin-like growth factors an angiogenic agent. In vivo and in vitro studies. *Ann N Y Acad Sci*. 1993, 692: 230-242.
17. Tolentino M, Miller J, Gragoudas E, et al. Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 1996, 114: 964-970.
18. The Diabetic Retinopathy Study Research Group. Indications for photocoagulation treatment of diabetic retinopathy: Diabetic Retinopathy Study Report n.^o 14. *Int Ophthalmol Clin* 1987; 27: 239-53.
19. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs. An extension of the modified Airlie House Classification. ETDRS Report n.^o 10. *Ophthalmology* 1991; 98: 786-806.
20. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Group. ETDRS Report n.^o 9 Early photocoagulation for diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 1991; 98: 766-785.
21. Diabetic Retinopathy Study Research Group: Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy: The second report of the Diabetic Retinopathy Study Findings. *Ophthalmology* 1978; 85: 82-106.
22. Shimizu K, Kobayashi Y, Muraoka K. Midperipheral fundus involvement in diabetic retinopathy. *Ophthalmology*, 1981; 88: 601-612.
23. Muraoka K, Shimizu K. Intraretinal neovascularization in diabetic retinopathy. *Ophthalmology*, 1984; 93: 1440-1446.
24. The Diabetic Retinopathy Study Research Group. Report 6: Design, methods and baseline results. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1981; 21: 149-226.
25. Davis M. Vitreous contraction in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*, 1965; 74: 741-751.
26. Taylor E, Dobree J. Proliferative diabetic retinopathy: Site and size of initial lesion. *Sr J Ophthalmol*, 1970; 54: 11-18.
27. Diabetic Retinopathy Study Research Group: A modification of the Airlie house classification of diabetic retinopathy, DRS report n. 7, *Invest Ophthalmol Vis Sic* 1981; 21: 210-226.
28. Olk RJ, Lee CM. Diabetic Retinopathy. Practical management JS Lippincott company 1993.

29. Davis M. Natural history of diabetic retinopathy. In Kimura S, Caygill W, eds: *Vascular complications of Diabetes Mellitus*, St Louis Mosby 1967.
30. Dobree J. Proliferative diabetic retinopathy: Evolution of the retinal lesions, *Sr J Ophthalmol*; 1964; 48: 637-649.
31. Kishi S, Shimizu K. Clinical Manifestations 01 Posterior Precortical Vitreous Pocket in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Ophthalmology* 1993; 100: 225-229.
32. Charles S. *Vitreous Microsurgery*: Baltimore, Williams and Wilkins, 1981; pp. 107-120.
33. Abrams G, Williams G. "En Bloc" excision of diabetic membranes. *Am J Ophthalmol*, 1987; 103: 302-308.
34. Tolentino F, Lee P, Schepens C. Biomicroscopy study of vitreous cavity in diabetic retinopathy, *Arch Ophthalmol*, 1966; 75: 238-246.
35. Lawrence S, Morse MD, Christopher B, et al. Subretinal Hemorrhages in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Retina* 1997; 17: 87-93.
36. Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group. Early vitrectomy for severe proliferative diabetic retinopathy in eyes with useful vision: Results of a randomized trial, Diabetic Study report n.º 3, *Ophthalmology* 1988; 95: 1307-1320.
37. Bonalonte S, Garcia CA. *Retinopatía diabética*. Mosby Doyma: Clasificación de la retinopatía diabética, 1996: 63-89.
38. Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group. Early vitrectomy for severe vitreous hemorrhage in diabetic retinopathy: Four-year results of a randomized trial, Diabetic Retinopathy Study report n.º 5, *Arch Ophthalmol* 1990; 108: 958-964.
39. Larsen H. Diabetic retinopathy: An ophthalmoscopic study with a discussion of the morphologic changes and the pathogenic factors in the disease, *Acta Ophthalmol Suppl* 1960; 60: 1-89.
40. Lincoff H, Serag Y, Chang S, et al. Tractional elevations of the retina in patients with diabetes. *Am J Ophthalmol* 1992; 113: 235-242.
41. Lincoff H, Kreissig I. Patterns of non-rhegmatogenous elevations of the retina. *Br J Ophthalmol* 1974; 58: 899-906.
42. Faulborn J, Ardjomand N. Tractional retinoschisis in proliferative diabetic retinopathy: A histopathologic study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000; 238: 40-44.
43. Imai M, Iijima H, Hanada N. Optical Coherence Tomography of Tractional Macular Elevations in Eyes With Proliferative Diabetic Retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2001; 132: 81-84.

44. Steven D, Schwartz MD, Robert Alexander Msc, et al. Recognition of Vitreoschisis in Proliferative Diabetic Retinopathy. A Usefull Landmark in Vitrectomy for Diabetic Traction Retinal Detachment. *Ophthalmology* 1996; 103: 323-328.
45. Brescinc G, Haight B. Retinal wrinkling and macular heterotopia in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1979; 97: 1890-1895.
46. Orth V. The Frecuency of rubeosis iridis in diabetic patients. *Acta Ophthalmol*, 1971; 49: 301-307.
47. Cooper KL, Constable IJ. The management of neovascular glaucoma *Aust J Ophthalmol* 1979; 5-9
48. Fernández-Vigo J. Diabetes ocular. *Edika-Med*. 1992.
49. Beetham W. Visual prognosis of proliferating diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 1963; 47: 611-619.
50. Ramsay W, Ramsay R, Purple R, et al. Involutional diabetic retinopathy, *Am J Ophthalmol* 1977; 84: 851-858.
51. Rand L, Krolewski A, Aiello L, et al. Multiple factors in the prediction of risk of proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med*, 1985; 313: 1422-1438.

2.5 Retinopatía diabética e inflamación. Papel de la inflamación en las primeras etapas de la retinopatía diabética.

La inflamación es una respuesta inespecífica a la lesión que incluye una variedad de mediadores funcionales y moleculares, como son el reclutamiento y la activación de los leucocitos. La inflamación suele tener efectos beneficiosos durante la fase aguda, pero puede que estos puedan devenir nocivos si persisten crónicamente. El aumento de la expresión de diversas proteínas inflamatorias está regulado a nivel de la transcripción de genes a través de la activación de factores de transcripción proinflamatorios, como el factor nuclear de transcripción KAPPA B (NF-kB). Estos factores de transcripción proinflamatorios se activan y juegan un papel fundamental en la amplificación y la perpetuación del proceso inflamatorio. Los factores de transcripción asociados con producción de mediadores proinflamatorios incluyen factores nucleares (NF-kB), la proteína activadora 1 (AP-1), la proteína específica 1 (SP1), los receptores activados de proliferación de peroxisomas (PPAR) y otros miembros de los receptores nucleares (1,2,3). Las proteínas proinflamatorias (incluyendo COX-2, la interleuquina-1 y el factor de necrosis tumoral alfa), pueden contribuir al daño y muerte celular en los tejidos como el cerebro y la retina (5, 6, 7,8) al menos en parte por la activación de NF-kB (6).

2.5.1 Estudios en animales

Muchos de los cambios moleculares y funcionales que son característicos de la inflamación y que se resumen a continuación, han sido detectados en la retina de los animales diabéticos o en los seres humanos y en células de la retina cultivadas en una concentración elevada de glucosa. Aunque muchas especies de animales han sido estudiados como posibles modelos de la retinopatía diabética, la mayoría de los estudios que relacionan procesos inflamatorios en el desarrollo de la retinopatía diabética se han realizado, hasta la fecha, en ratas y ratones y se han centrado en los modelos de deficiencia de insulina (diabetes tipo 1).

Leucostasis y activación de las plaquetas

La atracción y adhesión de leucocitos a la pared vascular son componentes importantes de los procesos inflamatorios. La leucostasis se ha detectado aumentada de manera significativa en retinas de los animales diabéticos (9,10), y podría contribuir a la falta de perfusión capilar. La rigidez de los leucocitos esta aumentada en el paciente diabético con lo que disminuye su capacidad de deformación y puede contribuir al desarrollo de la isquemia capilar en vasos de la retina (10, 11, 12, 13, 14). Una segunda línea de evidencia muestra que la adhesión de leucocitos anormales a los vasos de la retina en la diabetes es mayor y esta se produce a través de las moléculas de adhesión.

La diabetes aumenta la expresión de ICAM-1 en la retina de los animales y en los seres humanos (15) y la interacción de esta molécula en células endoteliales de la retina con CD18 en monocitos y neutrófilos contribuye a la lesión inducida por la diabetes por aumento de leucostasis dentro de los vasos retinianos (14). La leucostasis ha sido propuesta como un factor de apoptosis de las células endoteliales retinianas en la retinopatía diabética (14).

Una tercera causa etiológica de la ausencia de perfusión capilar en la diabetes implica a las plaquetas. Se ha descrito la formación de microtrombos plaquetarios en retinas de ratas diabéticas y en los seres humanos, y han sido espacialmente asociadas a la apoptosis de las células endoteliales (16). El clopidogrel, un fármaco antiplaquetario selectivo, sin embargo, no impidió la apoptosis neuronal, la reactividad glial, ni la apoptosis de las células capilares en retinas de ratas diabéticas (17), lo que sugiere que las plaquetas no son las primeras en iniciar la patología.

Aumento de la permeabilidad vascular

Uno de los primeros eventos en el desarrollo de la retinopatía diabética es la ruptura de la barrera hematorretiniana (BHR), este defecto contribuye al edema de la retina y la discapacidad visual en los pacientes diabéticos. La controversia se mantiene en cuanto a cómo se desarrolla el aumento de la permeabilidad de

la retina en pacientes diabéticos. En los animales de experimentación con diabetes inducida, la rotura de la BHR se detecta entre los 8 días a más de 6 meses después de la aparición de la diabetes (18, 19, 20). Todos estos estudios van encaminados a desarrollar medios para evaluar aumento de la permeabilidad vascular en la retina y modelos para identificar terapias para inhibir este defecto. Los tratamientos que se han evaluado para inhibir el aumento de la permeabilidad vascular en la retina diabética incluyen inhibidores de la aldosa reductasa, inhibidores de la proteínquinasa C, tirosina, inhibidores de la quinasa, la aspirina, un inhibidor de la COX-2, los esteroides, antagonistas del VEGF, antagonistas del receptor de TNF y el PPAR y ligandos gamma (21,22,23,24,25).

Factor nuclear de transcripción KAPPA B (NF-kB).

El NF-kB es un gran factor de transcripción inducible que es un importante regulador de los genes involucrados en las respuestas inflamatorias e inmunes, de la proliferación y de la apoptosis en mamíferos. El NF-kB se compone de homodímeros y heterodímeros. La forma más abundante y mejor estudiada en células de mamíferos son las subunidades P50 y P56. La activación del NF-kB ocasiona la activación de subconjuntos específicos de genes. Experimentos de unión al ADN han demostrado que el NF-kB se activa en la retina las células endoteliales y pericitos expuestos a concentraciones elevadas de glucosa (26,27).

La diabetes causa la migración de la subunidad P65 en el núcleo de los pericitos (28), y de la subunidad P50 en los núcleos de las células endoteliales, pericitos y las células de la capa nuclear interna (29). La evidencia del importante papel de NF-kB en la patogenia de las primeras etapas de la retinopatía diabética es doble. En primer lugar, la inhibición de las proteínas cuya expresión está regulada de NF-kB (como iNOS e ICAM) inhibe la degeneración de los capilares retinianos. En segundo lugar, los compuestos que inhiben NF-kB también logran inhibir el desarrollo de la retinopatía. Por ejemplo, varios antioxidantes que disminuyen el desarrollo de la degeneración y pérdida de pericitos capilares en la retina de las ratas diabéticas (30) también inhiben la activación en la retina del NF-kB inducida por la diabetes (27). Del

mismo modo, dosis bajas e intermedias de salicilatos (aspirina, salicilato de sodio, y la sulfasalazina) inhiben la activación de NF- κ B en las retinas de ratas diabéticas y también inhiben la expresión de mediadores inflamatorios como la iNOS e ICAM-1, y la degeneración capilar y pérdida de pericitos en los animales (30,31). La aspirina inhibe la producción de prostaglandinas, pero el salicilato de sodio y la sulfasalazina tienen mucho menos actividad, lo que sugiere que la acción común de estos tres salicilatos para inhibir la retinopatía en la diabetes no está principalmente mediada por la inhibición de las prostaglandinas.

Sintasa del óxido nítrico (iNOS)

La expresión de iNOS está regulada por lo menos en parte por el NF- κ B. La simpatectomía experimental incrementa la expresión de la proteína iNOS en las retinas de las ratas no diabéticas (32), lo que sugiere que la pérdida de la actividad simpática, como ocurre en la diabetes, podría contribuir a la regulación al alza de esta proteína inflamatoria de la retina. Se ha observado una regulación al alza de la iNOS en retinas de experimentación de roedores diabéticos y en pacientes en la mayoría de estudios (33, 34,35). También se conocen alteraciones en la expresión de otras isoformas de la sintasa de óxido nítrico en diabetes inducida (36,37). Un posible papel de la iNOS en la patogénesis de la retinopatía diabética se ha sugerido por los estudios con aminoguanidina. La aminoguanidina es un inhibidor selectivo de la iNOS (39), y se ha descrito que es útil para inhibir el desarrollo de las lesiones microvasculares de la retinopatía diabética en perros diabéticos (40), y también en las ratas (41). El papel de la iNOS en el desarrollo de las primeras etapas de la retinopatía diabética se ha investigado directamente con ratones genéticamente deficientes en iNOS(42). En ese estudio, los ratones diabéticos desarrollaron la degeneración esperada de los capilares de la retina, así como aumento de leucostasis y síntesis de superóxido. Por el contrario, los ratones diabéticos no deficientes en iNOS no desarrollaron estas anomalías estructurales o funcionales.

Ciclooxigenasas

La COX-2 está regulada por lo menos en parte por el NF- κ B. En retinas de animales diabéticos hay una inducción de la COX-2, así como aumento de la producción de prostaglandinas(43). Se ha demostrado (43) que la producción de prostaglandina PGE2 por las retinas de ratas diabéticas fue inhibida significativamente por Celecoxib (un inhibidor selectivo de la COX2), pero no por un inhibidor de la COX-1, lo que sugiere que COX-2 es el principal responsable del aumento de la producción de PGE2 en la retina de ratas diabéticas. El inhibidor de la COX-2, Meloxicam, también reduce las concentraciones de eNOS (NOS endotelial) y del NF- κ B, en la retina diabética y redujo las de TNF. Los inhibidores menos selectivos de la COX-2 disminuyen el desarrollo de la retinopatía diabética en perros y roedores, así como el aumento de la permeabilidad vascular en roedores diabéticos.

Moléculas de adhesión (ICAM-1)

Los glóbulos blancos se unen a ICAM-1 en la superficie del endotelio como un componente de un proceso de múltiples pasos que conducen a la adhesión de los glóbulos blancos de la pared endotelial (38). Esta leucostasis se sabe que está aumentada en los vasos sanguíneos de la retina en la retinopatía diabética (44,45), y este proceso es mediado por el ICAM-1. El ICAM-1 aumenta la expresión de la leucostasis por diversos estímulos, incluyendo el VEGF, la activación de P-PAR, el estrés oxidativo y dislipidemia (47). Ratones modificados genéticamente C57B1/6J se han utilizado para explorar el papel de ICAM-1 y la adhesión a las células sanguíneas (CD18) en la patogénesis de las enfermedades vasculares de la retina inducidas por la diabetes. A los ratones deficientes en los genes de estas proteínas y sus controles de tipo salvaje se les indujo diabetes experimentalmente. Después de una duración de la hiperglucemia de hasta a 11 meses los animales diabéticos desarrollaron degeneración capilar y pérdida

de pericitos, así como anomalías asociadas incluyendo leucostasis, aumento de la permeabilidad capilar y engrosamiento de la membrana basal capilar.

Factor endotelial de crecimiento vascular (VEGF)

El VEGF es una molécula proinflamatoria que juega un papel bien conocido en neovascularización y en el aumento de la permeabilidad vascular. La expresión del VEGF está regulada en gran parte por la hipoxia, pero también se va acumulando en la retina desde el inicio de la diabetes, antes de la aparición de la falta de oxígeno (48, 49, 50). Se produce en múltiples tipos de células de la retina, incluyendo las células ganglionares, las células de Müller, y los pericitos. Las inyecciones repetidas de altas concentraciones de VEGF en los ojos de monos no diabéticos dan como resultado cambios en la retina que en cierto modo se asemejan a aquellos de las primeras etapas de la retinopatía diabética, incluyendo tortuosidad vascular y microaneurismas (51,52). En la clínica los ensayos con terapias anti-VEGF han demostrado muy buenos resultados en las fases avanzadas de la retinopatía diabética (53, 54,55).

Interleuquina (IL)-1 β y caspasa-1

Se ha observado que la citoquina proinflamatoria IL-1 β , se incrementa en las retinas de ratas diabéticas (56). La inyección intravítrea de IL-1 β se demostró que era capaz de causar la degeneración de la retina y de las células endoteliales capilares, pero la relevancia de estos hallazgos en la degeneración capilar *in vivo* no está clara porque las concentraciones de IL-1 β probablemente fueron farmacológicas. El papel de la IL-1 β en la patogénesis de la retinopatía diabética se conoce por el estudio sobre ratones diabéticos en los que se inhibió la enzima responsable para la producción de IL-1 β . La IL-1 β es el producto predominante de la caspasa-1, y la actividad biológica de la IL-1 β está mediada por su unión con el receptor de superficie celular (IL-1R1). La actividad de la caspasa-1 se incrementa en las retinas de ratones y seres humanos diabéticos y en las células de Müller retinianas expuestas a una alta concentración de glucosa (57). La inhibición de la

caspasa-1 con Minociclina inhibe el aumento de la IL-1 β y la disminución de la degeneración de la retina y de sus capilares en los animales con diabetes inducida. Los resultados indican que la activación de la caspasa-1 y la posterior producción de IL-1 β desempeñan un papel importante en el desarrollo de la patología retiniana en la diabetes. Otra acción conocida de la IL-1 β es la activación del NF-kB.

TNF y otras citoquinas

Las concentraciones de TNF en la retina son significativamente mayores de lo normal en ratas diabéticas (58). El Eterncept actúa como inhibidor competitivo para bloquear los efectos del TNF en las células; el tratamiento con el mismo no redujo en la retina la concentración de VEGF, pero inhibió la ruptura de la barrera hematorretiniana y la activación del NF-kB en la retina diabética así como en los cultivos de células de Müller estimuladas con albúmina glucosilada o glucosa (59, 60, 61)

2.5.2 Cambios en la retina

Muchas de las proteínas inflamatorias que pueden participar en la degeneración de los capilares retinianos en la diabetes inducida se sabe que son reguladas por el NF-kB. Cabe la posibilidad de que cada una de estas proteínas, de forma independiente, causen la degeneración del capilar, pero la evidencia sugiere que actúan de forma secuencial y jerárquica.

Las pruebas con tejido de la retina de animales diabéticos o que se incuban en medios altos en glucosa indica que:

1. PARP regula la actividad de NF-kB así como la expresión de ICAM- 1
2. La inhibición de NF-kB con sulfasalazina inhibe expresión de iNOS, ICAM-1, VCAM y la COX-2 (63)
3. La inhibición de iNOS inhibe la hiperglucemia inducida por la generación de prostaglandinas, mientras que la reacción opuesta (regulación de la producción de óxido nítrico por la COX-2) no fue detectada

4. La inhibición de la COX inhibe la expresión de ICAM-1 y la leucostasis. Esta vía, sin duda, se volverá más complicada e interactiva a medida de que se disponga de mayor información sobre el papel de las proteínas proinflamatorias y factores de transcripción en el desarrollo de la retinopatía en la diabetes. Se sabe que muchas citoquinas activan NF- κ B y otros mediadores proinflamatorios.

2.5.3 Inflamación en la retinopatía diabética en humanos

La evidencia de que los procesos inflamatorios desempeñan un papel importante en la degeneración de los capilares de la retina en pacientes diabéticos es menos completa que en los animales, pero es en muchos sentidos es coherente con los estudios en animales. Los aumentos en las concentraciones de TNF, IL- 1β , y otros mediadores de la inflamación se ha demostrado en las muestras de vítreo de los pacientes diabéticos (64, 65,66). La actividad de la caspasa-1, la enzima responsable de la producción de IL- 1β , se incrementa en la retina de los seres humanos con diabetes, y se correlaciona con la distribución de las lesiones en la retina (67). El factor C5b-9, es el producto terminal de la activación del complemento y se ha observado dentro de los vasos sanguíneos de la retina de los pacientes diabéticos.

Ensayos clínicos prospectivos para evaluar el posible efecto de la aspirina sobre la retinopatía diabética en los pacientes han dado resultados contradictorios. El tratamiento con AAS resultó, en un análisis estadístico, que provocaba una inhibición significativa, aunque débil, de la media de incremento anual en el número de microaneurismas (68), mientras que no se observó ningún efecto beneficioso en todos los aspectos de la retinopatía en el estudio ETDRS (69). A la luz de las conclusiones alcanzadas en diferentes estos ensayos clínicos, y los resultados positivos obtenidos en los estudios sobre animales parece prudente reservar el juicio en este momento acerca de si la aspirina podría o no inhibir la retinopatía diabética en los seres humanos.

2.5.4 Conclusiones

Los numerosos efectos que se desarrollan en la retina como consecuencia de la diabetes son secundarios a una respuesta inflamatoria. Estos cambios inflamatorios al parecer son importantes en la patogénesis de la retinopatía diabética ya que la inhibición de esta cascada inflamatoria en cualquiera de los múltiples pasos puede inhibir las primeras etapas de la retinopatía diabética (en particular, la degeneración de los capilares retinianos). Las evidencias de los estudios realizados en animales diabéticos son suficientes para justificar nuevas investigaciones sobre el papel de la inflamación en el desarrollo de la retinopatía en los pacientes diabéticos.

2.5.5 Bibliografía

1. P. G. Winyard and D. R. Blake, "Antioxidants, redox regulated transcription factors, and inflammation," *Advances in Pharmacology*, 1997 vol. 38:403–421,.
2. D. Jourd'heuil, Z. Morise, E. M. Conner, and M. B. Grisham, "Oxidants, transcription factors, and intestinal inflammation," *Journal of Clinical Gastroenterology*, vol. 25, supplement 1:1997 S61–S72,.
3. I. Rahman, "Oxidative stress, transcription factors and chromatin remodelling in lung inflammation," *Biochemical Pharmacology*, 2002 vol. 64. 5-6: 935–942,.
4. L. Escoubet-Lozach, C. K. Glass, and S. I. Wasserman, "The role of transcription factors in allergic inflammation," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2002. vol. 110, no. 4: 553–564,
5. V. J. Quagliarello, B. Wispelwey, W. J. Long Jr., and W. M. Scheld, "Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat: characterization and comparison with tumor necrosis factor," *Journal of Clinical Investigation*, 1991. vol. 87, no. 4: 1360–1366
6. R. A. Kowluru and S. Odenbach, "Role of interleukin-1 β in the pathogenesis of diabetic retinopathy," *British Journal of Ophthalmology*, 1991. vol. 88, 10: 1343–1347.
7. Y. Du, V. P. Sarthy, and T. S. Kern, "Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats," *American Journal of Physiology*, 200. 287: R735–R741,.
8. J. A. Vincent and S. Mohr, "Inhibition of caspase-1/interleukin-1 β signaling prevents degeneration of retinal capillaries in diabetes and galactosemia," *Diabetes*, 2007. 56.: 224–230,.
9. S. Schroder, W. Palinski, and G. W. Schmid-Schonbein, "Activated monocytes and granulocytes, capillary non perfusion, and neovascularization in diabetic retinopathy," *American Journal of Pathology*, 1991. 139 : 81–100.
10. A. G. Harris, T. C. Skalak, and D. L. Hatchell, "Leukocyte capillary plugging and network resistance are increased in skeletal muscle of rats with streptozotocin induced hyperglycemia," *International Journal of Microcirculation, Clinical and Experimental*, 1994 . 14: 159–166.

11. D. L. Hatchell, C. A. Wilson, and P. Saloupis, "Neutrophils plug capillaries in acute experimental retinal ischemia," *Microvascular Research*, 1994, vol. 47, 3: 344–354.
12. K. Miyamoto, S. Khosrof, S.-E. Bursell, et al., "Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999. 96, 19: 10836–10841.
13. A. Nonaka, J. Kiryu, A. Tsujikawa, et al., "PKC- β inhibitor (LY333531) attenuates leukocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2000 ;41 : 2702–2706,.
14. A. M. Jousseaume, T. Murata, A. Tsujikawa, B. Kirchhof, S.-E. Bursell, and A. P. Adamis, "Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina," *American Journal of Pathology*, 2001; 158: 147–152.
15. D. J. Lefer, D. S. McLeod, C. Merges, and G. A. Luty, "Immunolocalization of ICAM-1 (CD54) in the posterior eye of sickle cell and diabetic patients," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1993 ;34:1206
16. D. Boeri, M. Maiello, and M. Lorenzi, "Increased prevalence of microthrombosis in retinal capillaries of diabetic individuals," *Diabetes*, 2001; 50 : 1432–1439.
17. D. A. Antonetti, A. J. Barber, S. Khin, et al., "Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occludin content: vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells," *Diabetes*, 1998; 47 : 1953–1959.
18. A. Carmo, J. G. Cunha-Vaz, A. P. Carvalho, and M. C. Lopes, "Nitric oxide synthase activity in retinas from noninsulin- dependent diabetic Goto-Kakizaki rats: correlation with blood-retinal barrier permeability," *Nitric Oxide*, 2000 ;4: 590–596,.
19. A. M. Jousseaume, V. Poulaki, A. Tsujikawa, et al., "Suppression of diabetic retinopathy with angiopoietin-1," *American Journal of Pathology*, 2002 ;5 :1683–1693.
20. A. B. El-Remessy, M. A. Behzadian, G. Abou-Mohamed, T. Franklin, R. W. Caldwell, and R. B. Caldwell, "Experimental diabetes causes breakdown of the blood-retina barrier by a mechanism involving tyrosine nitration and increases in expression of vascular endothelial growth factor and urokinase plasminogen activator receptor," *American Journal of Pathology*, 2003; 162: 1995–2004.

21. R. G. Tilton, K. Chang, G. Pugliese, et al., "Prevention of hemodynamic and vascular albumin filtration changes in diabetic rats by aldose reductase inhibitors," *Diabetes*, 1989 ;38:1258–1270.
22. L. P. Aiello, S.-E. Bursell, A. Clermont, et al., "Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective β -isoform-selective inhibitor," *Diabetes*, 1997 ; 46: 1473–1480.
23. R.G. Tilton, K. C. Chang, W. S. Lejeune, C. C. Stephan, T. A. Brock, and J. R. Williamson, "Role for nitric oxide in the hyperpermeability and hemodynamic changes induced by intravenous VEGF," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1999 ; 40 : 689–696.
24. K. Miyamoto, S. Khosrof, S.-E. Bursell, et al., "Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)," *American Journal of Pathology*, 2000 vol. 156, no. 5, pp. 1733–1739
25. M. Nakajima, M. J. Cooney, A. H. Tu, et al., "Normalization of retinal vascular permeability in experimental diabetes with genistein," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2001 vol. 42, 9: 2110–2114.
26. R. A. Kowluru, P. Koppolu, S. Chakrabarti, and S. Chen, "Diabetes-induced activation of nuclear transcriptional factor in the retina, and its inhibition by antioxidants," *Free Radical Research*, 2003 vol. 37, 11: 1169–1180.
27. L. Zheng, C. Szabo, and T. S. Kern, "Poly(ADP-ribose) polymerases involved in the development of diabetic retinopathy via regulation of nuclear factor- κ B," *Diabetes*, 2004 vol. 53, 11: 2960–2967.
28. G. Romeo, W.-H. Liu, V. Asnaghi, T. S. Kern, and M. Lorenzi, "Activation of nuclear factor- κ B induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes," *Diabetes*, 2003 vol. 51, 7 : 2241–2248.
29. L. Zheng, S. J. Howell, D. A. Hatala, K. Huang, and T. S. Kern, "Salicylate-based anti-inflammatory drugs inhibit the early lesion of diabetic retinopathy," *Diabetes*, 2007 vol. 56, 2:337–345.
30. R. A. Kowluru, J. Tang, and T. S. Kern, "Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia: VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy," *Diabetes*, 2001 vol. 50, 8:1938–1942.

31. R. A. Kowluru, R. L. Engerman, G. L. Case, and T. S. Kern, "Retinal glutamate in diabetes and effect of antioxidants," *Neurochemistry International*, 2001 vol. 38, 5: 385–390.
32. Y. Du, M. A. Smith, C. M. Miller, and T. S. Kern, "Diabetes induced nitrate stress in the retina, and correction by aminoguanidine," *Journal of Neurochemistry*, 2002 vol. 80, 5: 771–779.
33. A. do Carmo, C. Lopes, M. Santos, R. Proença, J. Cunha-Vaz, and A. P. Carvalho, "Nitric oxide synthase activity and L-arginine metabolism in the retinas from streptozotocin induced diabetic rats," *General Pharmacology*, 1998 vol. 30, 3: 319–324.
34. R. A. Kowluru, R. L. Engerman, and T. S. Kern, "Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia VIII. Prevention by aminoguanidine," *Current Eye Research*, 2000 vol. 21, 4: 814–819.
35. R. A. Kowluru, "Retinal metabolic abnormalities in diabetic mouse: comparison with diabetic rat," *Current Eye Research*, 2002 vol. 24, 2: 123–128.
36. A. M. Jousen, V. Poulaki, W. Qin, et al., "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," *American Journal of Pathology*, 2002 vol. 160, 2: 501–509.
37. J.-W. Park, S.-J. Park, S.-H. Park, et al., "Up-regulated expression of neuronal nitric oxide synthase in experimental diabetic retina," *Neurobiology of Disease*, 2006 vol. 21, 1: 43–49.
39. T. P. Misko, W. M. Moore, T. P. Kasten, et al., "Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine," *European Journal of Pharmacology*, 1993 vol. 233, 1: 119–125.
40. T. S. Kern and R. L. Engerman, "Pharmacological inhibition of diabetic retinopathy: aminoguanidine and aspirin," *Diabetes*, 2001 vol. 50, 7: 1636–1642.
41. H.-P. Hammes, S. Martin, K. Federlin, K. Geisen, and M. Brownlee, "Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991 vol. 88, 24: 11555–11558.

- 42-L. Zheng, Y. Du, C. Miller, et al., "Critical role of inducible nitric oxide synthase in degeneration of retinal capillaries in mice with streptozotocin-induced diabetes," *Diabetologia*, 2007 vol. 50, 9:1987–1996.
43. S. P. Ayalasmayajula, A. C. Amrite, and U. B. Kompella, "Inhibition of cyclooxygenase-2, but not cyclooxygenase-1, reduces prostaglandin E2 secretion from diabetic rat retinas," *European Journal of Pharmacology*, 2004 vol. 498, 1–3: 275–278.
44. S. Ishida, K. Yamashiro, T. Usui, et al., "Leukocytes mediate retinal vascular remodeling during development and vasoobliteration in disease," *Nature Medicine*, 2003 vol. 9, 6:781–788.
- 45.A. J. Barber, D. A. Antonetti, T. S. Kern, et al., "The Ins2Akita mouse as a model of early retinal complications in diabetes," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2005 vol. 46, 6: 2210–2218.
- 47.W. Chen, D. B. Jump, M. B. Grant, W. J. Esselman, and J. V. Busik, "Dyslipidemia, but not hyperglycemia, induces inflammatory adhesion molecules in human retinal vascular endothelial cells," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2003 vol. 44, 11: 5016–5022.
48. H. Sone, Y. Kawakami, Y. Okuda, et al., "Ocular vascular endothelial growth factor levels in diabetic rats are elevated before observable retinal proliferative changes," *Diabetologia*, 1997 vol. 40, 6,: 726–730.
49. C. Gerhardinger, L. F. Brown, S. Roy, M. Mizutani, C. L. Zucker, and M. Lorenzi, "Expression of vascular endothelial growth factor in the human retina and in nonproliferative diabetic retinopathy," *American Journal of Pathology*, 1998, vol. 152, 6: 1453–1462.
50. Y. Segawa, Y. Shirao, S.-I. Yamagishi, et al., "Upregulation of retinal vascular endothelial growth factor mRNAs in spontaneously diabetic rats without ophthalmoscopic retinopathy. A possible participation of advanced glycation end products in the development of the early phase of diabetic retinopathy," *Ophthalmic Research*, 1998 vol. 30, 6:: 333–339.
51. M. J. Tolentino, J. W. Miller, E. S. Gragoudas, et al., "Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate," *Ophthalmology*, 1996 vol. 103, 11: 1820–1828.
52. M. J. Tolentino, D. S. McLeod, M. Taomoto, T. Otsuji, A. P. Adamis, and G. A. Litty, "Pathologic features of vascular endothelial growth factor-induced retinopathy in the nonhuman primate," *American Journal of Ophthalmology*, 2002 vol. 133, 3: 373–385.

53. J. F. Arevalo, J. Fromow-Guerra, H. Quiroz-Mercado, et al., "Primary intravitreal bevacizumab (Avastin) for diabetic macular edema: results from the Pan-American Collaborative Retina Study Group at 6-month follow-up," *Ophthalmology*, 2007 vol. 114, 4: 743–750.
54. C. Starita, M. Patel, B. Katz, and A. P. Adamis, "Vascular endothelial growth factor and the potential therapeutic use of pegaptanib (macugen_) in diabetic retinopathy," *Developments in Ophthalmology*, 2007 vol. 39: 122–148.
55. R. Jorge, R. A. Costa, D. Calucci, L. P. Cintra, and I. U. Scott, "Intravitreal bevacizumab (Avastin) for persistent new vessels in diabetic retinopathy (IBEPE study)," *Retina* 2006 vol. 26, 9:1006–1013.
56. J. K. Krady, A. Basu, C. M. Allen, et al., "Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy," *Diabetes* 2005 vol. 54, 5: 1559–1565.
57. S. Mohr, A. Xi, J. Tang, and T. S. Kern, "Caspase activation in retinas of diabetic and galactosemic mice and diabetic patients," *Diabetes* 2002 vol. 51, 4: 1172–1179.
58. A. B. El-Remessy, M. Al-Shabrawey, Y. Khalifa, N.-T. Tsai, R. B. Caldwell, and G. I. Liou, "Neuroprotective and blood retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes," *American Journal of Pathology* 2006 vol. 168, 1: 235–244.
59. C. Harada, A. Okumura, K. Namekata, et al., "Role of monocyte chemoattractant protein-1 and nuclear factor κ B in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy," *Diabetes Research and Clinical Practice* 2006 vol. 74, 3: 249–256.
60. A. M. Jousen, V. Poulaki, N. Mitsiades, et al., "Suppression of Fas L-induced endothelial cell apoptosis prevents diabetic blood-retinal barrier breakdown in a model of streptozotocin-induced diabetes," *The FASEB Journal*, 2003 vol. 17, 1: 76–78.
61. J. Zhang, C. Gerhardinger, and M. Lorenzi, "Early complement activation and decreased levels of glycosylphosphatidylinositol-anchored complement inhibitors in human and experimental diabetic retinopathy," *Diabetes* 2002 vol. 51, 12:3499–3504.
62. X. Qin, A. Goldfine, N. Krumrei, et al., "Glycation inactivation of the complement regulatory protein CD59: a possible role in the pathogenesis of the vascular complications of human diabetes," *Diabetes* 2004 vol. 53, 10: 2653–2661.

- 63.L. Zheng and T. S. Kern, "Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit development of early stages of diabetic retinopathy," *Diabetes*, 2005, Abstract 929-P.
- 64.M. Myśliwiec, K. Zorena, A. Balcerska, J. Myśliwska, P. Lipowski, and K. Raczyn´ska, "The activity of *N*-acetyl-beta- D-glucosaminidase and tumor necrosis factor-alpha at early stage of diabetic retinopathy development in type 1 diabetes mellitus children," *Clinical Biochemistry* 2006 vol. 39, 8:851–856.
65. N. Demircan, B. G. Safran, M. Soylu, A. A. Ozcan, and S. Sizmaz, "Determination of vitreous interleukin-1(IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy," *Eye* 2006 vol. 20, 12:1366–1369.
- 66.J.-M. González-Clemente, D. Mauricio, C. Richart, et al., "Diabetic neuropathy is associated with activation of the TNF- α system in subjects with type 1 diabetes mellitus," *Clinical Endocrinology* 2005 vol. 63, 5: 525–529.
67. J. Tang, S. Mohr, Y.-P. Du, and T. S. Kern, "Non-uniform distribution of lesions and biochemical abnormalities within the retina of diabetic humans," *Current Eye Research* 2003 vol. 27, 1: 7–13.
68. C. Baudoin, P. Passa, P. Sharp, and E. Kohner, "Effect of aspirin alone and aspirin plus dipyridamole in early diabetic retinopathy: a multicenter randomized controlled clinical trial," *Diabetes* 1989 vol. 38, 4 : 491–498.
69. Early Treatment Diabetic Retinopathy Research Group, "Effects of aspirin treatment on diabetic retinopathy," *Ophthalmol* 1991 vol. 98, supplement 5 : 757–765.

2.6 Proteómica

Proteómica es el estudio de las proteínas y en particular de su estructura y de su función. Las proteínas son partes vitales de los organismos vivos ya que son los componentes principales de las rutas metabólicas de las células. El término proteómica fue acuñado en 1997 como una analogía con genómica, el estudio de los genes. La palabra "proteoma" es la fusión de "proteína" y "genoma", y fue acuñada por Marc Wilkins en 1994. El proteoma es la dotación completa de proteínas, incluyendo las modificaciones hechas a un conjunto particular de proteínas, producidas por un organismo o sistema. Esto varía con el tiempo y con requisitos diferentes o debido al estrés que sufre una célula o un organismo.

La descripción del proteoma permite tener una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente. El estudio y comparación sistemáticos del proteoma en diferentes situaciones metabólicas o patológicas permite identificar aquellas proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlaciona con determinados estados fisiológicos. En el caso concreto del análisis proteómico asociado a patologías concretas, es posible identificar proteínas que permitirían diagnosticar la enfermedad o pronosticar la evolución de la misma. Dichas proteínas se conocen con el nombre genérico de biomarcadores.

2.6.1 Retinopatía diabética y biomarcadores

La retinopatía diabética es la causa más frecuente de pérdida visual en la población activa y una de las principales causas de ceguera. El factor etiológico principal en el desarrollo de la retinopatía diabética es la hiperglucemia, pero otros factores relacionados con la diabetes, como la presión arterial, perfil de lípidos, o el tabaquismo pueden influir en su desarrollo.

Se han identificado diversos mecanismos bioquímicos en la patogenia del daño vascular inducido por la hiperglucemia, incluida la formación de glucotoxinas a través de la vía de la aldosa reductasa, la inducción de alteraciones en la señalización celular por la activación de la proteína C quinasa, la formación acelerada de los productos finales de glicación avanzada y el aumento del estrés oxidativo.

Los componentes etiológicos clave de la retinopatía diabética son la inflamación inducida por la hipoxia y la angiogénesis. Diversos estudios han investigado las concentraciones de factores inflamatorios y angiogénicos en vítreo y suero y se ha demostrado que desempeñan un papel importante en la degeneración de los capilares retinianos en estos pacientes. Se ha observado un aumento de las concentraciones del factor de necrosis tumoral (TNF), la interleuquina (IL)-1 y otros mediadores de la inflamación en el vítreo de pacientes con retinopatía diabética

Las técnicas de proteómica recientemente desarrolladas y aplicadas en el vítreo de pacientes diabéticos y sujetos de control no diabéticos, han contribuido a la identificación de algunas proteínas patógenas nuevas y de biomarcadores clínicos y estos se han asociado con diferentes vías biológicas, tales como lípidos de transporte o el sistema, calicreína-cinina.

Estos estudios se han centrado en la concentración de proteínas específicas, especialmente moléculas que participan en la angiogénesis y proliferación celular, pero no en la función de la proteína. Funciones biológicas esenciales a menudo están reguladas mediante modificaciones post-traduccionales, especialmente de fosforilación. Por lo tanto, la detección de fosfoproteínas y sitios de fosforilación es importante para explorar exhaustivamente la función de un péptido o una proteína. En modelos biológicos humanos la fosforilación de proteínas es el resultado de la actividad de la enzima tirosina quinasa, que añade fosfato a tirosinas específicas en las proteínas de destino. El fosfato se elimina de tirosinas fosforiladas por acción de la enzima tirosina fosfatasa. La fosforilación reversible de tirosinas en las proteínas desempeña un papel clave en la regulación de muchos procesos diferentes en los organismos eucariotas, tales como el control de crecimiento, el control del ciclo celular, la

diferenciación, la forma y movimiento, la transcripción genética, la transmisión sináptica o la acción de la insulina.

Las tirosinas fosforiladas se caracterizan por vincularse a dominios especializados de otras proteínas y dichas interacciones se utilizan para iniciar vías de señalización intracelular. Así, la evaluación del grado de fosforilación de una proteína podría proporcionar información importante en la retinopatía diabética.

En los últimos años, el desarrollo de la tecnología proteómica ha abierto un nuevo enfoque en el estudio de las complicaciones microvasculares de la diabetes y muchos péptidos y proteínas han aparecido como mediadores putativos del daño vascular. Sin embargo, las alteraciones en la expresión de proteínas o de las cantidades de las mismas observadas en estos estudios no implican un papel mecanicista y podrían ser una causa más que una consecuencia de la lesión endotelial. La fosforilación de tirosinas es un mecanismo generalizado subyacente a la acción de una amplia gama de receptores de membrana diferentes, incluyendo las interleuquinas (17, 18) TNF (19), IGF II (20) o el VEGF.

En la actualidad, solo podemos especular sobre el papel de la fosforilación de tirosinas en la modulación de, por ejemplo, la acción de las interleuquinas. Sin embargo, los cambios relacionados con la diabetes en el estado de fosforilación de péptidos vítreos pueden ser importantes desde un punto de visto clínico y de investigación, independientemente de su importancia biológica específica.

3. INVESTIGACIONES Y RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS PUBLICADOS

3.1 Hipótesis

1. La diabetes mellitus puede inducir modificaciones post-traduccionales de determinados péptidos y proteínas angiogénicas e inflamatorias del humor vítreo relacionados con el desarrollo de retinopatía diabética.
2. La fosforilación de tirosinas podría estar implicada en el desarrollo de la retinopatía diabética
3. La nitrosilación de proteínas del humor vítreo podría estar en la base de las alteraciones eventualmente observadas en la fosfotirosinas.

3.2 Objetivos

1. Estudiar la fosforilación de tirosinas en un amplio conjunto de péptidos y proteínas relacionadas con procesos de angiogénesis y de la inflamación en unas muestras de humor vítreo de pacientes diabéticos con retinopatía
2. Comparar los resultados obtenidos con las muestras obtenidas de pacientes sin retinopatía diabética.
3. Estudiar el estado de nitrosilación de tirosinas de aquellos péptidos o proteínas vítreas en los que previamente se hubieran detectado alteraciones en las fosfoproteínas.
4. Comparar el estado de nitrosilación observado con el de muestras obtenidas de pacientes no diabéticos.

3.3 Artículo 1

Tyrosine Phosphorylation of Vitreous Inflammatory and Angiogenic Peptides and Proteins in Diabetic Retinopathy

Jordi L.Reverter, Jeroni Nadal, Joan Ballester, Laura Ramió-Lluch,, M. Montserrat Rivera, Josep M. Fernandez-Novell, Javier Elizalde, Santiago Abengoechea, Joan J. Guinovart, Joan Enric Rodríguez-Gil

Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2009; 50: 1378–1382

DOI:10.1167/iovs.08-2736

FACTOR IMPACTO 2009.....**3,431**

Resumen

El objetivo del presente estudio es evaluar el grado de fosforilación de proteínas vítreas en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y retinopatía diabética en comparación con un grupo de sujetos control sin diabetes, de sexo y edades similares.

A las muestras obtenidas durante la vitrectomía realizada por complicaciones derivadas de la retinopatía diabética en un grupo de pacientes y a las obtenidas en vitrectomías realizadas por agujero macular en los sujetos control, se aplicaron técnicas de *immunoblot* en un sistema de *micro-array* para la cuantificación de una amplia gama de quimioquinas, péptidos vasoactivos y proteínas. Se utilizaron anticuerpos anti-tirosina para la evaluación de la fosforilación de tirosinas y los resultados se expresaron como el porcentaje de variación en comparación con sujetos de control.

Se analizaron muestras de ocho pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y de ocho pacientes control. La cantidad total de proteínas analizadas fue similar en los pacientes y sujetos de control. Por el contrario, la fosforilación de tirosinas disminuyó sensiblemente ($> 20\%$, $p < 0,05$) en pacientes diabéticos con respecto al grupo de control en el oncogén relacionado con el crecimiento, la citoquina humana I-309, la interleuquina IL-13, el factor estimulante de las colonias de monocitos, la quimioquina derivada de los macrófagos, el factor de las células madre, el factor de transformación del crecimiento, la angiogenina y la oncostatina M. Se observó una disminución significativa pero moderada de la fosforilación (entre 20% y 40%, $p < 0,05$) en el péptido epitelial activador de los neutrófilos, el factor estimulador de las colonias de los granulocitos, las interleuquinas IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-12,IL-p40p70 y la proteína-1 inflamatoria de los macrófagos en comparación con el grupo de control. La mayor disminución en el estado de fosforilación se detectó en la IL-1 α y la IL-1 β .

Podemos concluir que la retinopatía diabética se asocia a una disminución de la fosforilación de tirosinas de un amplio conjunto de proteínas del vítreo, lo que puede indicar una alteración del funcionalismo o de la acción de las mismas

to the simple determination of protein quantity, although there is a great lack of knowledge about the effects of tyrosine phosphorylation in peptides within the milieu of the eye.

The purpose of the present study was to evaluate tyrosine phosphorylation of a wide array of chemokines and vasoactive peptides by immunoblot analyses techniques applied to a mini-array system designed to quantify these proteins in vitreous samples obtained from patients with diabetic retinopathy and nondiabetic control subjects.

METHODS

Patients

We selected diabetic patients with diabetic retinopathy defined by fundus oculi performed by a specialized ophthalmologist and referred for vitrectomy, according to accepted clinical criteria.¹³ Those with active or recent vitreous hemorrhage, previous ocular surgery, inflammatory ocular disease or trauma were excluded. The diagnosis of type 2 diabetes mellitus was made according to the criteria of the American Diabetes Association.¹⁴ Demographic and clinical data, including age, sex, and history of clinical macrovascular disease and microvascular diabetic complications were recorded in all subjects. Blood samples were drawn by venipuncture between 0700 and 0800 hours after an overnight fast. Plasma glucose, total cholesterol, HDL cholesterol, and triglycerides were measured by routine clinical chemistry immediately after extraction. HbA1c was measured in blood samples with EDTA by high-pressure liquid chromatography using a fully automated analyzer (Adams Menarini HI-AUTO A1c 8160; Arkray, Kyoto, Japan) with an interassay coefficient of variation of 1.8% and 1.5% at HbA1c levels of 4.8% and 9.0%, respectively (reference range: 4%–5.8%).

The control group included vitreous obtained from otherwise healthy subjects with idiopathic macular hole without history of any ocular diseases or minor pathologic conditions.

The study was approved by the local Ethics Committee, in accordance with the Declaration of Helsinki and all participants gave their written informed consent before inclusion.

Vitreous Collection

Vitreous fluid was obtained from individuals undergoing pars plana vitrectomy in accordance with approved Human Discarded Specimen Research Protocols from the institutional review board. Undiluted samples were collected at the time of surgery, immediately placed on ice, spun at 15,000g for 1 minute to remove insoluble material, and stored at -80°C . Harvested vitreous samples were collected in tubes (0.8–1.0 mL) by using a surgical system (Accurus; Alcon, Fort Worth, TX). To maintain intraocular pressure, vitreous, was removed slowly with air interchange.

Processing Vitreous Samples for Array Analysis

One hundred fifty microliters of each vitreous humor sample was mixed immediately after thawing with 150 μL of the lysis buffer (1 \times cell lysis buffer) contained in a commercial human array antibody kit (RayBio Human Cytokine Antibody Array; RayBiotech, Inc., Norcross, GA). Cell lysis buffer was added (1 \times) with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM benzamide, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, and 1 mM Na_2VO_4 before mixing with the vitreous humor samples. The mixture of vitreous humor/lysis buffer was then homogenized by ultrasonication. Afterward, samples were centrifuged for 5 minutes at 5000g at 5°C and the resultant pellet was discarded. The total protein content of the obtained supernatants was measured to guarantee the presence of a minimum of 50 μg of total protein content per sample. Once the total protein content of the samples was determined, the samples were immediately used for the array analysis. Total protein content was analyzed by the Bradford method¹⁵ with a commercial kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Array Analysis Technique

The detection of the total content of each of the proteins analyzed was performed after rigorous adherence to the protocol provided by the kit used. Thus, they were incubated with the biotin-conjugated anti-cytokine antibody provided in the kit. This direct protocol was followed in 16 separate samples: 8 from healthy individuals and 8 from diabetic patients. At the same time, these 16 samples were simultaneously used for array analysis of tyrosine phosphorylation levels to make a direct comparison between the protein content and the tyrosine phosphorylation status. Moreover, another 16 separate samples—8 from healthy individuals and 8 from diabetic patients—were processed to determine only the tyrosine phosphorylation status. The proteins determined in the commercial array used were the following: epithelial neutrophil-activating peptide 78 (ENA 78); granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF); granulocyte-monocyte-stimulating colony factor (GM-CSF); growth-related oncogene (GRO); GRO- α ; human cytokine I-309 (I-309); IL-1 α , -1 β , -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -10, -12p40p70, -13, and -15; IFN- γ ; monocyte chemotactic protein (MCP)-1 -2, and -3; monocyte colony-stimulating factor (M-CSF); macrophage-derived chemokine (MDC); monokine induced by interferon (MIG)- γ ; macrophage inflammatory protein (MIP)-1 γ ; regulated on activation, normal T expressed and secreted cytokine (RANTES); stem cell factor (SCF); stromal-derived factor (SDF)-1; thymus- and activation-regulated chemokine (TARC); transforming growth factor (TGF)- β 1; tumor necrosis factor (TNF)- α and - β ; epidermal growth factor (EGF); insulin-like growth factor (IGF)-1; angiogenin; oncostatin M; thrombopoietin; vascular endothelial growth factor (VEGF); platelet-derived growth factor (PDGF)-88; and leptin.

Tyrosine phosphorylation analysis was performed by modification of the original protocol included in the commercial kit. For this purpose, the incubation of the array membranes with the samples used and further washing of the incubated membranes was performed according to the protocol included in the kit. After this, samples were incubated for 1 hour at 15°C temperature with an anti-phosphotyrosine antibody (PY-20; BD Transduction Laboratory, Temecula, CA) diluted at 1/20,000 (vol/vol) in the blocking buffer provided with the commercial kit. Thereafter, samples were washed three times, 5 minutes each, with the 1 \times wash buffer I included in the commercial kit, and 2 additional times for 5 minutes each, with 1 \times wash buffer II, also included in the commercial kit. Samples were then incubated for 1 hour at 15°C with a goat anti-mouse IgG-HRP secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) at a dilution of 1/2000 (vol/vol) in the blocking buffer provided in the commercial kit. Afterward, samples were washed according to the manufacturer's protocol. Finally, the membranes were incubated for 5 minutes with a chemiluminescence substrate (ECL Plus; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). They were then exposed to autoradiography films for 2 minutes on average. In all cases, the quantification of the positive spots obtained against a homogeneous background was performed with a commercial system (RayBio Analysis Tool; RayBiotech, Inc.) that was specifically designed for the analysis of the arrays used.

All chemical reagents were of analytical grade and were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Merck (Darmstadt, Germany), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA), and EMS (Fort Washington, PA).

Statistical Analyses

Data were analyzed with commercial software (Statistical Analysis System for Windows; SAS Institute, Cary, NC). Data were expressed as the mean \pm SD or the median and interquartile range, as appropriate. The comparison between biochemical data was performed with non-parametric tests. Determination of putative differences between healthy individuals and diabetic patients was performed by applying the GLM procedure included in the package. For an optimal application of the statistical procedures, data were previously normalized through an arcsin [$\sqrt{x/100}$] transformation, x being the transformed data. Differences were considered as significant with $P < 0.05$.

RESULTS

We included eight vitreous samples from eight male patients with type 2 diabetes and eight samples from eight male control subjects of a similar age (57 ± 8 vs. 57 ± 9 years; $P = \text{NS}$). The mean duration of diabetes was 15 ± 8.4 years. Diabetic patients presented proliferative diabetic retinopathy with significant macular edema in two. With respect to diabetic complications, 16% presented diabetic nephropathy, 11% cardiovascular and/or peripheral vascular disease, and 5% polyneuropathy. All the patients were treated with two doses of premixed insulin without oral hypoglycemic drugs and received similar doses of statin, aspirin, and ramipril. Blood glucose and HbA1c were increased in diabetic patients with respect to the control, as expected (187 ± 69 mg/dL vs. 91 ± 7 mg/dL, $P < 0.05$; 8.4 ± 1.8 vs. $4.6 \pm 0.3\%$, $P < 0.05$; respectively). No significant differences were observed in cholesterol (201 ± 30 mg/dL vs. 191 ± 48 mg/dL; $P = \text{NS}$), HDL-cholesterol (54 ± 12 mg/dL vs. 53 ± 11 mg/dL; $P = \text{NS}$), or triglycerides ($132 [81-155]$ mg/dL vs. $122 [75-140]$ mg/dL; $P = \text{NS}$), between patients and control subjects.

Presence of Interleukins and Other Cytokines in the Vitreous Humor of Healthy Individuals and Diabetic Patients

Simple array analysis showed the presence of a wide array of interleukins and other cytokines in the vitreous humors of healthy men. Notwithstanding, there was a great variation in the amount of each of these proteins. Thus, we performed an arbitrary classification of these proteins according to their mean intensity marks on the arrays when evaluated against the background. This classification was performed after the analysis of eight arrays from eight healthy individuals. After this classification, the proteins were classified as follows:

1. Proteins without any significant presence: IL-1 α , IL- β , and leptin did not show any significant mark in any of the arrays used.
2. Proteins with low presence: ENA-78; GCSF; GM-SCF; GRO; GRO- α ; I-309; IL-3, -6, -7, -10, -12p40p70, -15; IFN- γ ; MCP-2, -3; MCSF; MDC; MIG; RANTES; SCF; SDF-1; TARC; TGF- β ; TNF- α and - β ; angiogenin; oncostatin M; thrombopoietin; VEGF; and PDGF-88 showed an intensity mark below 10% over the background.
3. Proteins with medium presence: IL-5, -8, and IL-13; MCP-1; MIP-1 γ ; and IGF-1 showed an intensity mark between 10% and 30% over the background.
4. Proteins with high presence: IL-2 and -4 and EGF showed a mean intensity mark above 30% over the background.

Diabetic patients showed no significant differences with respect to the control group in the expression and presence of any of the proteins tested in the vitreous humor as shown in the analysis of eight arrays from separate diabetic patients compared with eight arrays from eight healthy individuals.

Tyrosine Phosphorylation Status of Interleukins and Other Immunomodulating Proteins in the Vitreous Humor of Healthy Individuals and Diabetic Patients

Analysis of the tyrosine phosphorylation from the proteins included in the arrays used showed the presence of the many phosphorylated interleukins and other cytokines in the vitreous humors of healthy men. On the other hand, and similar to that observed regarding protein content, there was a great variation in the amount of tyrosine phosphorylation of each of these proteins. Accordingly, we again performed an arbitrary classification of these phosphorylated proteins related to their

mean intensity marks on the arrays when evaluated against the background. This classification was performed after the analysis of eight arrays from eight healthy individuals. After this classification, proteins were classified as follows:

1. Proteins with no significant phosphorylation: These proteins did not show any significant mark in any of the arrays used. Only leptin did not show any signal of phosphorylation.
2. Proteins with low tyrosine phosphorylation levels: GRO- α ; IL-2, -4, and IL-15; IFN- γ ; MCP-2; SDF-1; TARC; TNF- β ; EGF; thrombopoietin; VEGF; and PDGF 88 showed an intensity mark below 30% over the background.
3. Proteins with medium tyrosine phosphorylation levels: GRO; I-309; IL-3, -5, -6, and -13; MCP-1; MCP-3; MCSF; MDC; MIG; SCF; TNF- α ; IGF-1; angiogenin; and oncostatin M showed an intensity mark between 30% and 60% over the background.
4. Proteins with high tyrosine phosphorylation levels: IL-1 α , -1 β , -7, -8, -10, and -12p40p70; MIP-1 γ ; RANTES; and TGF- β 1 showed an intensity mark above 60% over the background.

Vitreous from diabetic patients presented striking changes in the tyrosine phosphorylation patterns of the proteins studied. As shown in Table 1, diabetic patients showed a significant ($P < 0.05$) decrease in the intensity of tyrosine phosphorylation of many of the proteins analyzed with variations in the intensity of this decrease. Thus, proteins such as GRO, I-309, IL-13, MCSF, MDC, SCF, TGF- β 1, angiogenin, and oncostatin M demonstrated a significant ($P < 0.05$) decrease below 20% when compared with arrays from healthy individuals. Moreover, ENA-78; GCSF; GM-SCF; IL-5, -6, -7, -8, -10, and -12p40p70; MIG; MIP-1 γ ; and RANTES showed a significant ($P < 0.05$) decrease of between 20% to 40% in phosphorylation when compared with healthy individuals. Finally, both IL-1 α and -1 β showed the greatest decrease in phosphorylation status, reaching values of $54.8\% \pm 3.3\%$ (mean \pm SEM) for IL-1 α and $49.9\% \pm 3.3\%$ (mean \pm SEM) for IL-1 β when compared with arrays from healthy individuals. In all the cases, tyrosine phosphorylation values of their respective control proteins from healthy individuals were adjusted to an arbitrary value of 100.0. There were no significant changes in diabetic patients in tyrosine phosphorylation of GRO- α ; IL-2, -3, -4, and IL-15; IFN- γ ; MCP-1; MCP-2 and -3; SDF-1; TARC; TNF- α and - β ; EGF; IGF-1; thrombopoietin; VEGF; and PDGF-88. These results were also obtained in samples in which a simultaneous analysis of the total content for each protein was performed, thus indicating that the observed decrease in tyrosine phosphorylation was not due to a concomitant decrease in the total content of the proteins evaluated.

DISCUSSION

In our study, diabetic retinopathy was associated with a general decrease in the tyrosine phosphorylation status of angiogenic and inflammatory elements present in the vitreous fluid. In recent years, the development of proteome technology has opened a new approach to study microvascular diabetic complications,¹⁰ and many peptides and proteins have been emerged as putative mediators of vascular damage.¹⁶ However, the alterations in protein expression or quantity observed in these studies do not implicate a mechanistic role and may not be a cause but rather a consequence of the endothelial lesion. With the same caveats, our study could provide one more step in the comprehension of diabetic retinopathy, since the tyrosine phosphorylation status of many peptides and proteins is

TABLE 1. Comparison between Tyrosine Phosphorylation Intensity Values of Peptides and Proteins in Type 2 Diabetes Vitreous Fluid Samples versus Control Samples

Proteins	Healthy Individuals (n = 8)	Diabetic Patients (n = 8)
ENA-78	100.0 ± 3.0	61.3 ± 2.0*
GCSF	100.0 ± 2.4	68.2 ± 2.1*
GM-SCF	100.0 ± 3.9	63.4 ± 2.4*
GRO	100.0 ± 2.3	81.2 ± 3.4*
GRO-α	100.0 ± 3.8	103.8 ± 3.1
I-309	100.0 ± 4.0	86.3 ± 4.0*
IL-1α	100.0 ± 3.2	54.8 ± 3.3*
IL-1β	100.0 ± 4.1	49.9 ± 3.3*
IL-2	100.0 ± 3.1	97.3 ± 2.5
IL-3	100.0 ± 4.2	90.6 ± 3.7
IL-4	100.0 ± 4.3	88.9 ± 4.2
IL-5	100.0 ± 3.1	75.3 ± 2.8*
IL-6	100.0 ± 2.3	68.0 ± 2.4*
IL-7	100.0 ± 1.6	62.1 ± 2.1*
IL-8	100.0 ± 1.7	72.8 ± 2.8*
IL-10	100.0 ± 1.4	76.2 ± 3.2*
IL-12p40p70	100.0 ± 1.9	77.8 ± 3.5*
IL-13	100.0 ± 4.0	84.9 ± 3.6*
IL-15	100.0 ± 4.1	99.8 ± 4.6
IFN-γ	100.0 ± 3.3	107.8 ± 5.9
MCP-1	100.0 ± 2.1	105.3 ± 5.8
MCP-2	100.0 ± 2.6	99.2 ± 4.2
MCP-3	100.0 ± 1.5	96.9 ± 4.2
MCSF	100.0 ± 1.3	83.8 ± 3.6*
MDC	100.0 ± 1.4	81.3 ± 4.6*
MIG	100.0 ± 3.2	74.0 ± 2.9*
MIP-1γ	100.0 ± 2.9	71.7 ± 3.6*
RANTES	100.0 ± 2.1	77.6 ± 3.6*
SCF	100.0 ± 2.4	81.6 ± 3.6*
SDF-1	100.0 ± 2.9	94.5 ± 3.9
TARC	100.0 ± 4.3	96.3 ± 3.8
TGF-β1	100.0 ± 3.9	84.9 ± 4.8*
TNF-α	100.0 ± 4.1	90.1 ± 4.7
TNF-β	100.0 ± 4.5	109.0 ± 4.2
EGF	100.0 ± 3.2	91.6 ± 4.5
IGF-1	100.0 ± 3.7	90.3 ± 5.4
Angiogenin	100.0 ± 2.1	86.8 ± 3.4*
Oncostatin M	100.0 ± 2.6	82.5 ± 3.5*
Thrombopoietin	100.0 ± 4.8	98.5 ± 4.1
VEGF	100.0 ± 3.7	98.6 ± 3.9
PDGF-88	100.0 ± 3.6	103.8 ± 4.0

Results shown are means ± SEM. Results are expressed based on an adjustment of the results from healthy patients to an arbitrary, basal value of 100.0 in each protein.

* $P < 0.05$ type 2 diabetic patients versus control group.

directly linked to its function. In this way, tyrosine phosphorylation is a widespread mechanism underlying the action of a broad range of different membrane receptors, including most of the peptides analyzed in this study, such as interleukins,^{17,18} TNF,¹⁹ IGF II,²⁰ or VEGF.²¹ However, to our knowledge, there is a lack of literature regarding tyrosine phosphorylation of the peptides and proteins studied, despite that their structure, such as that of the interleukin family, showing different tyrosine residues that are susceptible to phosphorylation.^{22,23} Only in some of the peptides analyzed such as angiogenin, has the presence of phosphorylated tyrosine residues been previously described,²⁴ and this change in phosphorylation status could lead to changes in the specific activity of angiogenin. At present, we can only speculate about the role of tyrosine phosphorylation in modulating, for example, interleukin action. However, the diabetes-linked changes observed in the phosphorylation status of the peptides analyzed in our study may be important from a clinical and research point of view, regardless of their specific biological significance.

It is noteworthy that the decrease observed in the overall tyrosine phosphorylation of the peptides studied was not associated with significant changes in the total protein content of most of the proteins evaluated. However, results published by other authors indicate that diabetic retinopathy can be associated with changes in the total content of many of the peptides analyzed in vitreous humor, such as interferon-induced protein (IP)-10; MCP-1; VEGF; TNFα; IL-1β, -6, and -8; and even leptin.²⁵⁻³³ A possible explanation for these differences could be related to the fact that our study was performed using laboratory technology that is unable to detect smaller changes in total protein content than those used by the previously reported works and by the statistical power of the number of samples. However, it should be pointed out that, despite these shortcomings, an overall decrease in tyrosine phosphorylation status was detected. From a practical point of view, these results demonstrate that changes in the tyrosine phosphorylation status of these peptides can be detected even in conditions in which no changes in the total protein content were observed, thus, yielding a new approach to detect functional alterations in the vitreous humor components that can be detected in conditions in which variations of total protein content are not appreciated. These results indicate that analysis of changes in tyrosine phosphorylation vitreous humor peptides could be a sensitive biomarker of the presence of ocular alterations related to diabetic retinopathy.

Our results lead to a discussion of the probable cause(s) by which the diverse analyzed peptides demonstrate a decrease in their tyrosine phosphorylation status. In view of our data, there are at least two hypothetical explanations. The first would be a diabetes-related malfunction in the phosphodephosphorylation mechanisms in cells that synthesize and secrete these peptides. Phosphodephosphorylation of tyrosine residues is a posttranscriptional phenomenon, which is always performed through a whole battery of separate protein kinases and phosphatases under an intracellular basis.¹² The presence of changes in the tyrosine phosphorylation status of peptides present in an extracellular milieu, such as the vitreous humor, would indicate that some alteration in the functioning of these protein kinases and phosphatases occurs in the cells producing and secreting the peptides analyzed. In fact, a relationship has already been described between diabetes and alteration of phosphodephosphorylation mechanisms in metabolic pathways. Thus, it is well known that diabetes alters not only the basal activity but also the insulin-stimulated activation of several important tyrosine kinases such as Akt and glycogen synthase kinase (GSK)-3.³⁴ These alterations induce concomitant modifications in the normal functioning of most of the metabolic pathways controlled by these kinases.

Another possible explanation for the decrease observed in tyrosine phosphorylation status is a reduction in phosphorylated residues by nitration, related to the well-documented excess of peroxynitrites in the milieu of the eye in diabetes.³⁵ In this regard, it has been described that diabetes induces retinal degeneration through a peroxynitrite-mediated inhibition in the signaling of the nerve growth factor (NGF).³⁵ This effect is mediated by a decreased phosphorylation of the NGF tyrosine kinase receptor, which prevents the normal signaling of NGF in retinal cells.^{35,36} Thus, the overall decrease on tyrosine phosphorylation observed could be the consequence of the presence of high levels of superoxide radicals and peroxynitrites, affecting the final signaling of these phosphorylated peptides in their target cells. Our study was not designed to investigate the physiopathological mechanisms of protein phosphodephosphorylation, because we did not know the phosphorylation status of vitreous proteins in diabetes mellitus in advance. Future experiments are being designed to address this question.

In conclusion, our results indicate that diabetic retinopathy involves changes in the tyrosine phosphorylation status of many angiogenic and inflammatory elements present in the vitreous fluid. Further research on this topic could provide additional understanding of the pathologic mechanisms of diabetic retinopathy.

References

- Aiello LP, Gardner TW, King GL, et al. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 1998;21:143-156.
- Frank RN. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med*. 2004;350:48-58.
- Aronson D. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Adv Cardiol*. 2008;45:1-16.
- Jo N, Wu GS, Rao NA. Upregulation of chemokine expression in the retinal vasculature in ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:4054-4060.
- Mitamura Y, Harada C, Harada T. Role of cytokines and trophic factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev*. 2005;1:73-81.
- Yuuki T, Kanda T, Kimura Y, et al. Inflammatory cytokines in vitreous fluid and serum of patients with diabetic vitreoretinopathy. *J Diabetes Complications*. 2001;15:257-259.
- Jo N, Wu GS, Rao NA. Upregulation of chemokine expression in the retinal vasculature in ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:4054-4560.
- Kim T, Kim SJ, Kim K, et al. Profiling of vitreous proteomes from proliferative diabetic retinopathy and nondiabetic patients. *Proteomics*. 2007;7:4203-4215.
- García-Ramírez M, Canals F, Hernández C, et al. Proteomic analysis of human vitreous fluid by fluorescence-based difference gel electrophoresis (DIGE): a new strategy for identifying potential candidates in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 2007;50:1294-1303.
- Gao BB, Chen X, Timothy N, Aiello LP, Feener EP. Characterization of the vitreous proteome in diabetes without diabetic retinopathy and diabetes with proliferative diabetic retinopathy. *J Proteome Res*. 2008;7:2516-2525.
- Cohen P. Protein phosphorylation and hormone action. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1988;22:234:115-144.
- Schlessinger J. Cell signalling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000;103:211-225.
- Mohamed Q, Gillies MC, Wong TY. Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *JAMA*. 2007;298:902-916.
- Standards of medical care in diabetes-2007; American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2007;30:S42-S47.
- Bradford MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254.
- Merchant ML, Klein JB. Proteomics and diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 2007;27:627-636.
- Bagley CJ, Woodcock JM, Guthridge MA, Stomski FC, López AF. Structural and functional hot spots in cytokine receptors. *Int J Hematol*. 2001;73:299-307.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003;374:1-20.
- Darnay BG, Aggarwal BB. Inhibition of protein tyrosine phosphatases causes phosphorylation of tyrosine-331 in the p60 TNF receptor and inactivates the receptor-associated kinase. *FEBS Lett*. 1997;410:361-367.
- Corvera S, Witehead RE, Mottola C, Czech MP. The insulin-like growth factor II receptor is phosphorylated by a tyrosine kinase in adipocyte plasma membranes. *J Biol Chem*. 1986;261:7675-7679.
- Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res*. 2000;60:203-212.
- Robb RJ, Kutny RM, Panico M, Morris HR, Chowdhry V. Amino acid sequence and post-translational modification of human interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984;81:6486-6490.
- Fiskerstrand C, Sargan D. Nucleotide sequence of ovine interleukin-1 beta. *Nucleic Acids Res*. 1990;18:7165.
- Tanigawa K, Fujihara M, Sakamoto R, Yanahira S, Ohtsuki K. Characterization of bovine angiogenin-1 and lactogenin-like protein as glycyrrhizin-binding proteins and their in vitro phosphorylation by C-kinase. *Biol Pharm Bull*. 2001;24:443-447.
- Cicik E, Tekin H, Akar S, et al. Interleukin-8, Nitric oxide and glutathione status in proliferative vitreoretinopathy and proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res*. 2003;35:251-255.
- Funatsu H, Yamashita H, Ikeda T, Mimura T, Eguchi S, Hori S. Vitreous levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2003;110:1690-1696.
- Er H, Doğanay S, Ozerol E, Yürekli M. Adrenomedullin and leptin levels in diabetic retinopathy and retinal diseases. *Ophthalmologica*. 2005;219:107-111.
- Funatsu H, Yamashita H, Noma H, et al. Aqueous humor levels of cytokines are related to vitreous levels and progression of diabetic retinopathy in diabetic patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2005;243:3-8.
- Demircan N, Safran BG, Soylu M, Ozcan AA, Sizmaz S. Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye*. 2006;20:1366-1369.
- Maier R, Weger M, Haller-Schober EM, et al. Multiplex bead analysis of vitreous and serum concentrations of inflammatory and proangiogenic factors in diabetic patients. *Mol Vis*. 2008;14:637-643.
- Noma H, Funatsu H, Yamasaki M, et al. Aqueous humour levels of cytokines are correlated to vitreous levels and severity of macular oedema in branch retinal vein occlusion. *Eye*. 2008;22:42-48.
- Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes*. 1998;47:1281-1286.
- Eldar-Finkelman H, Shreyer SA, Shinohara MM, LeBoeuf RC, Krebs EG. Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes- and obesity-prone C57BL/6J mice. *Diabetes*. 1999;48:1662-1666.
- Shao J, Yamashita H, Qiao L, Friedman JE. Decreased Akt kinase activity and insulin resistance in C57BL/KsJ-Lepr^{db/db} mice. *J Endocrinol*. 2000;167:107-115.
- Ali TK, Matragoon S, Pillai BA, Liou GI, El-Remessy AB. Peroxynitrite mediates retinal neurodegeneration by inhibiting nerve growth factor survival signaling in experimental and human diabetes. *Diabetes*. 2008;57:889-898.
- Jonnala RR, Buccafusco JJ. Inhibition of nerve growth factor signaling by peroxynitrite. *J Neurosci Res*. 2001;63:27-34.

3.4 Artículo 2

Diabetic Retinopathy Is Associated With Decreased Tyrosine Nitrosylation of Vitreous Interleukins IL-1 α , IL-1 β and IL-7

Jordi L. Reverter, Jeroni Nadal, Joan Ballester, Laura Ramió-Lluch, M. Montserrat Rivera, Josep M. Fernandez-Novell, Javier Elizalde, Santiago Abengoechea, Joan Enrique Rodriguez

Ophthalmic Research. 2011; 46: 169-174

DOI 10.1159/000323812

FACTOR IMPACTO 2010**1,29**

Resumen

El objetivo del estudio fue evaluar simultáneamente el estado de nitrosilación y fosforilación de tirosinas de interleuquinas del vítreo de pacientes con retinopatía diabética en las que previamente se detectó una anormalidad de la fosforilación de tirosinas.

Se realizó inmunoprecipitación específica de las interleuquinas IL-1 α , IL-1 β , IL-2 e IL-7 en muestras obtenidas mediante vitrectomía realizada por retinopatía diabética proliferativa en pacientes (n = 12) y por agujero macular en controles (n = 12). Los niveles de nitrosilación y fosforilación de tirosinas se analizaron por *Western blot* con los respectivos anticuerpos específicos y se correlacionaron entre sí y con la cantidad total de proteína de las interleuquinas inmunoprecipitadas. Se determinaron los valores medios de la relación fosforilación/nitrosilación de estas proteínas en el humor vítreo del grupo de control y de los pacientes diabéticos.

La diabetes se asoció a una disminución de la nitrosilación de tirosinas de IL-1 α , IL-1 β y IL-7 y a un aumento de la relación fosforilación/nitrosilación de tirosinas con respecto a los controles en la IL-1 α ($1,58 \pm 0,22$ vs. $2,74 \pm 0,39$, respectivamente; $p < 0,05$) y en la IL-7 ($2,15 \pm 0,01$ vs. $3,26 \pm 0,57$, respectivamente; $p < 0,05$). No se observaron cambios significativos en la nitrosilación de tirosinas o en la relación fosforilación/nitrosilación de tirosinas en la IL-2.

Ante estos resultados se puede concluir que la retinopatía diabética proliferativa se asocia con cambios concomitantes y simultáneos en la fosforilación y nitrosilación de tirosinas de interleuquinas proinflamatorias específicas presentes en el humor vítreo como son la IL-1 α , la IL-1 β y la IL-7. Estos cambios podrían estar relacionados con el aumento de la actividad proinflamatoria detectado en la retinopatía inducida por la diabetes

Diabetic Retinopathy Is Associated with Decreased Tyrosine Nitrosylation of Vitreous Interleukins IL-1 α , IL-1 β , and IL-7

Jordi L. Reverter^a Jeroni Nadal^b Joan Ballester^c Laura Ramió-Lluch^c
M. Montserrat Rivera^c Josep M. Fernández-Novell^d Javier Elizalde^b
Santiago Abengoechea^b Joan-Enrique Rodriguez^c

^aEndocrinology and Nutrition Department, Germans Trias i Pujol University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, ^bDepartment of Vitreous and Retinal Surgery, Institut Universitari Barraquer, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, ^cDepartment of Medicine and Surgery, School of Veterinary Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, and ^dDepartment of Biochemistry and Molecular Biology and IRB Barcelona, Barcelona Science Park, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Key Words

Diabetic retinopathy · Vitreous interleukins · Tyrosine nitrosylation

Abstract

Objective: To simultaneously evaluate tyrosine nitrosylation and phosphorylation levels of vitreous interleukins of patients with diabetic retinopathy, in which abnormal tyrosine phosphorylation has been previously described. **Research Design and Methods:** Specific immunoprecipitation of interleukins IL-1 α , IL-1 β , IL-2 and IL-7 was carried out in samples obtained during vitrectomy performed for proliferative diabetic retinopathy in patients (n = 12) and for macular hole in controls (n = 12). Tyrosine nitrosylation and phosphorylation levels of the immunoprecipitated interleukins were analysed by Western blot with the respective specific antibodies and correlated. The results were also correlated with the total amount of immunoprecipitated interleukin protein. The mean phosphorylation/nitrosylation ratios of these proteins in vitreous humour of both the control group and diabetic

patients were determined. **Results:** Diabetes was associated with decreased tyrosine nitrosylation of IL-1 α , IL-1 β and IL-7 and an increased tyrosine phosphorylation/nitrosylation ratio with respect to controls in IL-1 α (1.58 ± 0.22 vs. 2.74 ± 0.39 , respectively; $p < 0.05$) and IL-7 (2.15 ± 0.01 vs. 3.26 ± 0.57 , respectively; $p < 0.05$). No significant changes were observed in nitrotyrosine or in the tyrosine phosphorylation/nitrosylation ratio of IL-2. **Conclusions:** Proliferative diabetic retinopathy is associated with concomitant and simultaneous changes in both tyrosine phosphorylation and tyrosine nitrosylation status of specific pro-inflammatory interleukins present in the vitreous fluid such as IL-1 α , IL-1 β and IL-7. These changes could be related to the increase in pro-inflammatory activity detected in diabetes-induced retinopathy.

Copyright © 2011 S. Karger AG, Basel

J.L.R. and J.N. contributed equally to this work.

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2011 S. Karger AG, Basel
0030-3747/11/0464-0169\$38.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/or

Jordi L. Reverter, MD, PhD
Endocrinology and Nutrition Department
Germans Trias i Pujol University Hospital, Via Canyet
ES-08916 Badalona (Spain)
Tel. +34 934 978 860, E-Mail reverter.germanstrias@gencat.cat

Introduction

Diabetic retinopathy occurs in about 95% of patients with type 1 diabetes and in 60% of type 2 diabetic patients, and is the main cause of legal blindness in adults [1]. Although the major risk factors are hyperglycaemia, high blood pressure levels and long-term duration of diabetes [2], the molecular mechanisms involved in the onset and progression of retinal damage remain unclear. Previous studies have demonstrated that hypoxia-induced inflammation plays an important role in the degeneration of retinal capillaries in the diabetic state [3, 4]. In this sense, increased levels of inflammatory mediators such as tumour necrosis factor, interleukins and others have been described in the vitreous humour of diabetic patients with diabetic retinopathy [5]. We have recently reported modifications in the phosphorylation status of many vitreous inflammatory and angiogenic proteins from diabetic patients without changes in protein concentrations (mainly in IL-1 α and IL-1 β) [6], which may indicate an alteration in protein functionality or action even before or in the absence of significant quantitative variations. Post-translational protein modifications such as tyrosine phosphorylation play a key role in regulating many different processes in organisms and may be involved in the pathogenesis of diabetic retinopathy [7]. As protein tyrosine nitrosylation alters the structure and function of proteins and may prevent tyrosine phosphorylation [8], the investigation of nitrosylation status in proteins with decreased tyrosine phosphorylation is of interest. It is of note that protein tyrosine nitrosylation is a common post-translational modification occurring under conditions of oxidative stress in a number of diseases [9]. Since diabetes is a state of oxidative stress [10, 11], protein tyrosine nitrosylation could have important implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy [12]. In this sense, nitric oxide and nitric oxide-related reactive nitrogen species are important inflammatory mediators [13], and increased production of superoxide and nitric oxide have been reported in diabetic retina [14]. Thus, it is not clear whether the changes described in the tyrosine phosphorylation levels of specific proteins such as interleukins in diabetes are a consequence of intrinsic alterations in phosphorylation or a consequence of the increased nitrosylation induced by oxidative stress.

The main aim of the present study was to evaluate the relative amount of tyrosine nitrosylation and tyrosine phosphorylation levels of vitreous interleukins that previously showed marked (IL-1 α and IL-1 β), moderate (IL-

7) and no modification (IL-2) in phosphorylation status [6] by immunodetection in vitreous samples obtained from patients with diabetic proliferative retinopathy and non-diabetic controls.

Subjects and Methods

Patients

We consecutively selected type 2 diabetic patients with diabetic proliferative retinopathy defined by fundus oculi performed by a specialized ophthalmologist and referred to vitrectomy according to accepted clinical criteria [15]. The diagnosis of type 2 diabetes mellitus was made in accordance with the criteria of the American Diabetes Association [16]. Patients with active or recent vitreous haemorrhage, previous ocular surgery, inflammatory ocular disease or trauma were excluded. Demographic and clinical data, including age, sex and history of clinical macrovascular disease and microvascular diabetic complications of the subjects were recorded. Blood samples were drawn by venepuncture between 07:00 and 08:00 h after an overnight fast. Plasma glucose, total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides were measured by routine clinical chemistry immediately after extraction. HbA1c was measured in blood samples with EDTA by high-pressure liquid chromatography using a fully automated Adams Menarini HI-AUTO[®] A1c 8160 analyser manufactured by Arkray (Kyoto, Japan) with an inter-assay coefficient of variation of 1.8 and 1.5% at HbA1c levels of 4.8 and 9.0%, respectively (reference range: 4–5.8%).

Vitreous samples obtained from otherwise healthy subjects with idiopathic macular hole without a history of any ocular disease or minor pathologic conditions served as the control group.

The study was approved by the local Ethics Committee in accordance with the Declaration of Helsinki, and all participants gave their written informed consent prior to inclusion.

Vitreous Fluid Collection

Vitreous fluid was obtained from individuals undergoing pars plana vitrectomy according to approved Human Discarded Specimen Research Protocols from the institutional review board. Undiluted samples were collected at the time of surgery, immediately placed on ice, spun at 15,000 g for 1 min to remove insoluble material and stored at –80°C. Harvested vitreous samples were collected in tubes (0.8–1.0 ml) using an Accurus[®] Surgical System (Alcon, Fort Worth, Tex., USA). In order to maintain intra-ocular pressure, vitreous was removed slowly with air interchange.

Processing Vitreous Humour Samples for Specific Immunoprecipitation and Subsequent Western Blot Analysis

After thawing, the samples were immediately diluted to a final volume of 1 ml with an ice-cold 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 600 mM sucrose, 10 μ g/ml leupeptin, 1 mM benzamide, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride and 1 M Na₂VO₄ (lysis buffer). The samples were homogenised by ultrasonication, incubated with 40 μ g/ml DNAase-1 for 2 h at 15°C and were then centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C in order to eliminate debris. Afterwards, the samples were divided into two aliquots of 500 μ l in order to perform the immunoprecipitation of two sepa-

rate interleukins per sample. Thereafter, 12.5 µl of a commercial presentation of Protein G-Sepharose (Protein G Sepharose 4 Fast Flow; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) diluted in lysis buffer (dilution 1:1, v:v) was added to each aliquot and samples were incubated for 1 h at 4°C with continuous shaking. The samples were then centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C and the resultant pellet was discarded. The chosen specific antibodies against one of the interleukins analysed (final dilution, 1:150) were then added to the supernatants obtained and the samples were incubated with the antibody for 1 h at 4°C with continuous shaking. Next, 30 µl of the previously described commercial presentation of Protein G-Sepharose diluted 1:1 (v:v) in lysis buffer was added to the samples and incubation was maintained for 1 h at 4°C with continuous shaking. Subsequently, samples were divided into two aliquots of the same volume in order to perform the analysis for phosphotyrosine in one aliquot and the analysis for nitrotyrosine in the other. Aliquots were again centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C. The pellets obtained were resuspended in 1 ml of lysis buffer and thereafter centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C. The supernatants were discarded, and the pellets were subjected to two more steps of resuspension/centrifugation in order to completely wash the immunoprecipitates. The final pellets were resuspended in 1 ml of 50 mM Tris buffer (pH 8.0) at 4°C and another centrifugation at 12,000 g for 10 min at 4°C was carried out. The pellets were finally resuspended in 20 µl of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) added to 100 mM dithiothreitol and 1% (w:v) sodium dodecyl sulphate. At this step, the samples were heated at 95°C for 3 min and were subsequently centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C. The supernatants obtained were stored at -80°C until Western blot analysis.

Western blot analysis was carried out following the standard protocol of transferring the sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (polyacrylamide gel percentage of 10%, w:v) to nitrocellulose membranes. The transferred samples were tested by applying either an anti-phosphotyrosine antibody (Chemicon International, Temecula, Calif., USA) or an anti-nitrotyrosine antibody (Abcam, Cambridge, UK) at final dilutions of 1:1,000 (v/v) and 1:1,400 (v/v), respectively. Immunoreactive proteins were detected using peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Amersham, UK). The reaction was developed with an ECL-Plus detection system (Amersham). After this, the nitrocellulose membranes were stripped using a standard protocol and were subsequently utilized for a new Western blot analysis, this time against one of the interleukins analysed using the appropriate specific primary antibody (all from Abcam at a final dilution of 1:1,000 v/v). Again, immunoreactive proteins were detected using peroxidase-conjugated secondary antibodies specified to each primary antibody (Amersham). The reaction was developed with an ECL-Plus detection system (Amersham). The intensity of the marks obtained was quantified using specific software for image analysis of blots and arrays (Multi Gauge® v3.0; Fujifilm Europe, Düsseldorf, Germany), in which the background, defined as the surrounding area of the bands analysed of a 1 mm width, was utilized to adjust the intensity values of the bands analysed in all of the samples. The adjustment of the intensities of each band was calculated applying the following formula: $(P-NI/BP-NI)/(LI/BI)$, where P-NI is the intensity value (in arbitrary units) obtained from the phosphotyrosine or nitrotyrosine band, BP-NI is the intensity of the corresponding

background of the phosphotyrosine or nitrotyrosine band analysed, LI is the intensity value obtained from the specific interleukin band and BI is the intensity of the corresponding background of the interleukin band analysed. The adjusted phosphotyrosine/nitrotyrosine relationship was calculated applying the following formula: $(PI/B-PI)/(NI/BNI)$, where PI is the value (in arbitrary units) obtained from the phosphotyrosine band, BPI is the intensity of the corresponding background of the phosphotyrosine band analysed, NI is the intensity value obtained from the corresponding nitrotyrosine interleukin band and BNI is the intensity of the corresponding background of the nitrotyrosine band analysed.

Finally, there were two separate types of negative controls. The first was lysis buffer without samples that were treated with the immunoprecipitating antibodies. The second negative control was performed with samples treated with Protein G-Sepharose but without the addition of the immunoprecipitating antibody in order to discard putative unspecific precipitation of proteins that could be fixed to the Protein G-Sepharose beads.

Statistical Analyses

Data were analysed using the Statistical Analysis System (SAS Inc., Cary, N.C., USA) package for Windows. Data were expressed as means and standard deviation or median and interquartile range, as needed. Comparison between biochemical data was performed with non-parametric tests. Differences between healthy individuals and diabetic patients were tested by applying the GLM procedure included in the SAS package. For an optimal application of the statistical procedures, data were previously normalized through an ln transformation, x being the transformed data. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

We included 12 vitreous samples from 12 type 2 diabetic patients (50% women) and 12 vitreous samples from 12 controls (50% women) with a similar age (64 ± 14 vs. 60 ± 11 years, respectively; $p > 0.05$). The duration of diabetes was 16 ± 9 years. All patients presented proliferative diabetic retinopathy, 22% presented diabetic nephropathy (microalbuminuria with normal serum creatinine), 10% cardiovascular and/or peripheral vascular disease and 6% polyneuropathy. All the patients were treated with insulin, simvastatin, ramipril and aspirin at similar doses. Diabetic patients and controls showed similar systolic [124 ± 5 vs. 120 ± 7 mm Hg, respectively ($p > 0.05$)] and diastolic blood pressure [67 ± 4 vs. 71 ± 6 mm Hg, respectively ($p > 0.05$)]. As expected, blood glucose and HbA1 were increased in diabetic patients with respect to the control group [137 ± 63 vs. 94 ± 7 mg/dl ($p < 0.05$) and 7.4 ± 1.7 vs. $4.7 \pm 0.6\%$ ($p < 0.05$), respectively]. No significant differences were observed in total cholesterol (199 ± 41 vs. 192 ± 47 mg/dl), HDL cholesterol (56 ± 10 vs. 55 ± 11 mg/dl)

Table 1. Mean \pm SD values of phosphotyrosine and nitrotyrosine in the vitreous fluid interleukins IL-1 β , IL-7, IL-1 α and IL-2 from 12 diabetic patients (DM) and 12 non-diabetic controls

	IL-1 β		IL-7		IL-1 α		IL-2	
	control	DM	control	DM	control	DM	control	DM
Phosphotyrosine/ interleukin ratio	1.66 \pm 0.29	1.56 \pm 0.20	2.00 \pm 0.12	0.87 \pm 0.01*	1.89 \pm 0.31	1.44 \pm 0.19*	1.54 \pm 0.25	1.12 \pm 0.18
Nitrotyrosine/ interleukin ratio	1.42 \pm 0.05	0.92 \pm 0.10*	0.98 \pm 0.05	0.52 \pm 0.04*	1.37 \pm 0.07	0.91 \pm 0.02*	0.10 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01
Phosphotyrosine/ nitrotyrosine ratio	2.01 \pm 0.25	2.21 \pm 0.03	2.15 \pm 0.01	3.26 \pm 0.57*	1.58 \pm 0.22	2.74 \pm 0.39*	14.72 \pm 8.03	13.79 \pm 9.91

* p < 0.05 with respect to control group.

or triglycerides [141 (67–145) vs. 132 (78–151) mg/dl] between patients and non-diabetic control subjects (p > 0.05 in all cases).

Tyrosine Phosphorylation and Nitrosylation of Interleukins from Vitreous Fluid

As shown in table 1, IL-1 β isolated from vitreous fluid from diabetic patients showed a significant decrease in the nitrotyrosine/interleukin ratio mark. IL-1 β phosphotyrosine/nitrotyrosine ratio was increased in the diabetic group but without significant differences with respect to the control group. Vitreous IL-7 from diabetic patients showed a significant decrease in the mean values of both tyrosine phosphorylation/interleukin and nitrosylation/interleukin ratios compared to controls. The more intense decrease in nitrotyrosine/interleukin ratio compared to the phosphotyrosine/interleukin ratio led to a significant increase in the mean IL-7 phosphotyrosine/nitrotyrosine ratio in diabetic patients with respect to the control group (3.26 \pm 0.57 vs. 2.15 \pm 0.01, respectively; p < 0.05).

The results obtained in IL-1 α were similar to those obtained in IL-1 β and IL-7 (table 1). Thus, decreased phosphotyrosine/interleukin and nitrotyrosine/interleukin ratios were found in samples obtained from diabetic patients as well as a significant increase in the phosphotyrosine/nitrotyrosine ratio (1.58 \pm 0.22 in non-diabetic controls vs. 2.74 \pm 0.39 in diabetic patients; p < 0.05).

Remarkably, no significant differences were observed in IL-2 phosphotyrosine/interleukin, nitrotyrosine/interleukin or in phosphotyrosine/nitrotyrosine ratios in samples obtained from diabetic patients with respect to the control group (table 1).

Discussion

The present results indicate that the observed and previously described decrease in tyrosine phosphorylation levels in vitreous humour interleukins IL-1 α , IL-1 β and IL-7 in diabetic patients is associated with a concomitant decrease in the tyrosine nitrosylation status of these interleukins. This suggests that tyrosine nitrosylation, which may compete with tyrosine phosphorylation, is not responsible for the diabetes-related decreased phosphotyrosine levels of several specific vitreous humour interleukins. This is of interest since retinal abnormalities in diabetic retinopathy have been related to cytokine-linked inflammatory mechanisms [17, 18] that include increased production of pro-inflammatory cytokines, increased vascular permeability and leukostasis [19]. To our knowledge, there are few data on the modulation of cytokine activity through changes in phosphorylation/nitrosylation levels in diabetic retinopathy, although this mechanism has been well defined in other proteins [7, 20]. As the activity of at least some interleukins can be modified by phospho/dephosphorylation, the previously described changes in phosphorylation levels of vitreous interleukins such as IL-1 α and IL-1 β related to diabetes [6] could be due to interleukin nitrosylation, which, in turn, could modify the activity of these cytokines and compete with phosphorylation. Biological nitrosylation of protein tyrosine is a phenomenon that is associated with a wide range of pathological conditions, including ocular inflammation [21], and protein nitrosylation is a post-translational modification biomarker of oxidative stress [22]. At present, the role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic micro- and macrovascular com-

plications is under active investigation [23, 24], and the evidence for protein nitrosylation in vivo is solid [9], although there is some discussion as to the main nitrating mechanism involved [25]. Increased nitrosative stress has been suggested in diabetic retinopathy in animal models [26, 27], but to our knowledge few data are available in humans. Regarding our results, the decrease in nitrotyrosine observed in diabetic vitreous fluid seems to be in opposition to the evidence for nitrosative stress in diabetic retinopathy [28]. However, previous investigations have suggested that nitrosylation reduces the function of pro-inflammatory cytokines such as IL-8 [29] and enhances the effect of the anti-inflammatory cytokine IL-10 [30]. As IL-7 is a multipotent growth factor known to provide survival signals for T cells [31], and IL-1 α and IL- β are pro-inflammatory cytokines that play an important role in the development of diabetes-induced retinal pathology [4], it can be hypothesized that alterations in their nitrosative status could increase their inflammatory activity.

Nonetheless, to establish whether nitrosylation of interleukins or other proteins is responsible for the specific pathologic features of diabetic retinopathy or is an epiphenomenon is somewhat more difficult. From our results we cannot infer a mechanistic role and they do not allow a more in-depth explanation regarding the precise mechanisms involved in this concomitant effect of both tyrosine nitration and tyrosine phosphorylation. However, the functions of nitrotyrosine-containing proteins such as interleukins and others may be susceptible to modulation by nitrosylation [12], and could have biological significance in diabetic retinopathy. Thus, it is important to remark that not all of the interleukins studied show diabetes-related changes in their nitrosylation status. IL-2 did not show significant differences in the intensity of either nitrotyrosine or phosphotyrosine levels when comparing control and diabetic samples [6], thereby suggesting that the diabetes-linked changes in both nitrotyrosine and phosphotyrosine levels are not uniquely related to a structural similarity of all interleukins since in this case the changes observed would be similar in all of the cytokines studied. Furthermore, these differences also indicate that separate interleukins may modify their action separately in the diabetic state provided that the modifications in the nitrosylation/phosphorylation levels can be related to changes in the actions of these peptides.

The present study did not include subjects with diabetes without retinopathy or subjects with underlying diabetic retinopathy for ethical reasons because vitrectomy

is not usually performed in early phases of retinopathy. Thus, to clarify whether decreased nitration of the studied vitreous interleukins is a marker of diabetes, diabetic retinopathy in general, or proliferative diabetic retinopathy, further in vitro experiments are needed in order to establish the possible actions of the different interleukins depending upon the levels of nitrosylation and phosphorylation.

In conclusion, our results show that diabetic retinopathy involves concomitant and correlated changes in both tyrosine phosphorylation and tyrosine nitrosylation status of specific pro-inflammatory interleukins present in vitreous fluid. These changes could be related to the increase in inflammatory activity detected in diabetes-induced retinopathy [17, 32]. Further studies regarding structural and functional changes in different interleukins designed to explore the effect of the activation or inhibition of nitrosylation could provide additional, important understanding of the pathological mechanisms of diabetic retinopathy.

Acknowledgements

We thank Nora Mestre and Gloria Oliva for their valuable help in the processing of the samples and Ms Donna Pringle for her valuable contribution to the preparation of the manuscript.

Disclosure Statement

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

References

- 1 Frank RN: Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 2004;350:48–58.
- 2 Lachin JM, Genuth S, Nathan DM, Zinman B, Rutledge BN, DCCT/EDIC Research Group: Effect of glycemic exposure on the risk of microvascular complications in the diabetes control and complications trial-revisited. *Diabetes* 2008;57:995–1001.
- 3 Goldberg RB: Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3171–3182.
- 4 Kern TS: Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res* 2007;2007:95103.

- 5 Funatsu H, Noma H, Mimura T, Eguchi S, Hori S: Association of vitreous inflammatory factors with diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2009;116:73–79.
- 6 Reverter JL, Nadal J, Fernández-Novell JM, et al: Tyrosine phosphorylation of vitreous inflammatory and angiogenic peptides and proteins in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:1378–1382.
- 7 Yeo WS, Lee SJ, Lee JR, Kim KP: Nitrosative protein tyrosine modifications: biochemistry and functional significance. *BMB Rep* 2008;41:194–203.
- 8 Ischiropoulos H: Biological tyrosine nitrosylation: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 1998;356:1–11.
- 9 Turko IV, Murad F: Protein nitrosylation in cardiovascular diseases. *Pharmacol Rev* 2002;54:619–634.
- 10 Piconi L, Quagliaro L, Ceriello A: Oxidative stress in diabetes. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41:1144–1149.
- 11 Silva KC, Rosales MA, Biswas SK, Lopes de Faria JB, Lopes de Faria JM: Diabetic retinal neurodegeneration is associated with mitochondrial oxidative stress and is improved by an angiotensin receptor blocker in a model combining hypertension and diabetes. *Diabetes* 2009;58:1382–1390.
- 12 Zhan X, Du Y, Crabb JS, Gu X, Kern TS, Crabb JW: Targets of tyrosine nitrosylation in diabetic rat retina. *Mol Cell Proteomics* 2008;7:864–874.
- 13 Du Y, Sarthy VP, Kern TS: Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:R735–R741.
- 14 Du Y, Miller CM, Kern TS: Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells. *Free Radic Biol Med* 2003;35:1491–1499.
- 15 Mohamed Q, Gillies MC, Wong TY: Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *JAMA* 2007;298:902–916.
- 16 American Diabetes Association: Diagnosis and classification of diabetes mellitus (Position Statement): *Diabetes Care* 2007;30 (suppl 1):S42–S47.
- 17 Jousen AM, Poulaki V, Le ML, et al: A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J* 2004;18: 1450–1452.
- 18 Devaraj S, Cheung AT, Jialal I, et al: Evidence of increased inflammation and microcirculatory abnormalities in patients with type 1 diabetes and their role in microvascular complications. *Diabetes* 2007;56:2790–2796.
- 19 Miyamoto K, Hiroshiba N, Tsujikawa A, Ogura Y: In vivo demonstration of increased leukocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:2190–2194.
- 20 Rajala RV, Wiskur B, Tanito M, Callegan M, Rajala A: Diabetes reduces autophosphorylation of retinal insulin receptor and increases protein-tyrosine phosphatase-1B activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:1033–1040.
- 21 Aulak KS, Miyagi M, Yan L, et al: Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12056–12061.
- 22 Sies H: Oxidative stress: from basic research to clinical application: *Am J Med* 1991;91: 31S–38S.
- 23 Zheng L, Kern TS: Role of nitric oxide, superoxide, peroxynitrite and PARP in diabetic retinopathy. *Front Biosci* 2009;14:3974–3987.
- 24 Ceriello A: Nitrotyrosine: new findings as a marker of postprandial oxidative stress. *Int J Clin Pract* 2002;129:51–58.
- 25 Peluffo G, Radi R: Biochemistry of protein tyrosine nitrosylation in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res* 2007;75:291–302.
- 26 Pacher P, Obrosova IG, Mabley JG, Szabó C: Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. *Curr Med Chem* 2005;12:267–275.
- 27 Leal EC, Manivannan A, Hosoya K, et al: Inducible nitric oxide synthase isoform is a key mediator of leukostasis and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:5257–5265.
- 28 Du Y, Smith MA, Miller CM, Kern T: Diabetes-induced nitrosative stress in the retina, and correction by aminoguanidine. *J Neurochem* 2002;80:771–779.
- 29 Sato E, Simpson KL, Grisham MB, Koyama S, Robbins RA: Reactive nitrogen and oxygen species attenuate interleukin-8-induced neutrophil chemotactic activity in vitro. *J Biol Chem* 2000;275:10826–10830.
- 30 Freels JL, Nelson DK, Hoyt JC, et al: Enhanced activity of human IL-10 after nitrosylation in reducing human IL-1 production by stimulated peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 2002;169:4568–4571.
- 31 Kittipatarin C, Khaled AR: Interlinking interleukin-7. *Cytokine* 2007;39:75–83.
- 32 Bodaghi B, de Kozak Y, Lehoang P, Rao NA: Editorial. *Ophthalmic Res* 2008;40:113–114.

4. CONCLUSIONES

1. La retinopatía diabética se asocia con alteraciones del estado de fosforilación de tirosinas de proteínas inflamatorias del grupo de las interleuquinas, lo que podría estar en la base fisiopatológica de la afectación retiniana.
2. La nitrosilación de tirosinas no es la causa de las modificaciones en la fosforilación.
3. Las alteraciones de la nitrosilación de interleuquinas es una modificación post-traducciona que también podría tener una implicación en la etiopatogenia de la retinopatía diabética.
4. Los mecanismos de fosfo-defosforilación y de nitro-denitrosilación podrían ser dianas terapéuticas en un futuro.
5. Estos hallazgos abren una vía de investigación futura que podría basarse en la creación de modelos experimentales en los que se evaluara los efectos que la modificación de los mecanismos de fosfo/nitrosilación de tirosinas sobre la aparición o la progresión de la retinopatía diabética.