

RETINOPATÍAS NEOVASCULARES: ETIOLOGÍA Y MODELOS DE ESTUDIO PARA LA BÚSQUEDA DE NUEVOS BLANCOS TERAPÉUTICOS

NEOVASCULAR RETINOPATHIES: ETIOLOGY AND MODELS OF STUDY FOR SEARCHING NEW THERAPEUTIC TARGETS

M.E. Ridano^{ab}, J.D. Luna Pinto^c, V.E. Lorenc^d, P.V. Subirada^{ab}, M.C. Paz^{ab}, V. Vaglianti^{ab}, P.F. Barcelona^{ab}, M.C. Sánchez^{ab*}.

^a Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Bioquímica Clínica. Córdoba, Argentina.

^b CONICET. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI), Córdoba, Argentina.

^c Centro Privado de Ojos Romagosa. Fundación VER. Córdoba, Argentina.

^d The Johns Hopkins School of Medicine. Departamento de Oftalmología. Baltimore, MD, Estados Unidos.

Recibido: 28/02/18; aceptado: 14/08/18

Las retinopatías neovasculares se encuentran dentro de las principales causas de ceguera. En estas patologías, el déficit visual es causado en parte por un desbalance de factores angiogénicos posterior a un evento isquémico, que provoca la formación de neovasos, hemorragias, entre otros, con reducción parcial o total de la visión. El factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) es la molécula más estudiada como responsable de la neovascularización retiniana inducida por isquemia en patologías oculares. Los tratamientos existentes para estas retinopatías (fotocoagulación, vitrectomía, inyección intraocular de anticuerpos monoclonales) intentan detenerlas pero solo en casos muy puntuales logran mejorarlas, por lo que la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos es un desafío en la actualidad. En esta revisión, proporcionaremos información sobre los conocimientos actuales de la etiología de las retinopatías neovasculares más prevalentes, los modelos de estudio de las mismas y los potenciales blancos terapéuticos nuevos que han surgido de investigaciones mediante la utilización de los mismos.

Palabras clave: retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, factor de crecimiento endotelial vascular.

Neovascular retinopathies are the main causes of blindness. In these pathologies, the visual deficit has been caused, at least in part, by an imbalance of angiogenic factors generated by ischemia, which produces neovessel formation and hemorrhages, with a partial or total reduction of vision. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) is the most studied molecule that mediates retinal neovascularization induced by ischemia in ocular pathologies. Treatments for these retinopathies (photocoagulation, vitrectomy, intraocular injection of monoclonal antibodies) try to stop them but only in very specific cases they improve it. Therefore, searching new therapeutic targets is a challenge at present. In this review, we will provide information about the current knowledge related to etiology of the most prevalent neovascular retinopathies, *in vivo* and *in vitro* models to study them and the new therapeutic candidates that have arisen.

Keywords: diabetic retinopathy, retinopathy of prematurity, vascular endothelial growth factor.

I. INTRODUCCIÓN

La retina es el tejido nervioso que recubre la parte posterior del ojo y cumple dos funciones de mayor importancia: I. realizar el proceso de fototransducción, y II. el procesamiento de la información visual. En los vertebrados, la retina neural tiene una estructura muy definida, compuesta por siete capas (Figura 1). Tres de ellas contienen cuerpos celulares con núcleos (la capa nuclear externa, ONL; la capa nuclear interna, INL; y la capa de células ganglionares, GCL), dos poseen procesos celulares y sinapsis neuronales (la capa plexiforme externa, OPL; y la capa plexiforme interna, IPL), una capa que posee los axones de las células ganglionares en su camino hacia el nervio óptico (capa

*csanchez@fcq.unc.edu.ar

de fibras nerviosas, NFL), y la más externa formada por los segmentos fotosensibles de los fotorreceptores (S) [1]. Más de 60 subtipos celulares están presentes en la retina [2], mayormente representados por neuronas y células gliales y en tercer lugar por las células vasculares. Los diferentes tipos de neuronas se encuentran conectadas en serie y están encargadas de la transmisión de la información visual desde los fotorreceptores hasta las células ganglionares, quienes llevarán la información a la corteza visual. Como parte del sistema nervioso la retina contiene varios tipos de células gliales: las microgliales y las macrogliales. Las células de la microglia, son células inmunes residentes de la retina, cuyas funciones se encuentran asociadas a

la iniciación de procesos inflamatorios y reparación tisular. Además, existen en la retina dos tipos de células macrogliales: los astrocitos y las células de Müller (CGM), quienes, entre otros aspectos, poseen un rol clave en la vascularización retiniana, encontrándose en contacto con los vasos sanguíneos de la retina neural [3].

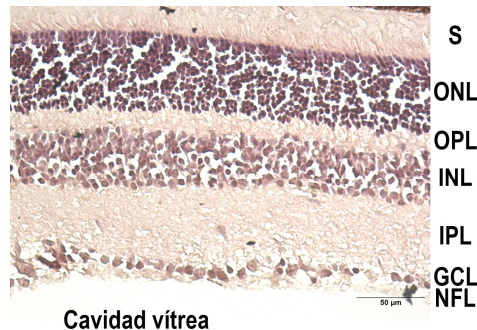


Figura 1. Estructura de la retina neural. Se muestra corte histológico de retina murina adulta coloreado con Hematoxilina-Eosina: segmentos fotosensibles de los fotorreceptores (S), capa nuclear externa (ONL), capa plexiforme externa (OPL), capa nuclear interna (INL), capa plexiforme interna (IPL), capa de células ganglionares (GCL) y capa de fibras nerviosas (NFL).

Para que la retina neural cumpla sus funciones de manera adecuada se necesita un desarrollo vascular organizado. En este sentido, la vasculatura retiniana da origen, de manera muy reproducible y conservada, a tres plexos vasculares: el plexo superficial (PS), el intermedio (PI) y el profundo (PP) (Figura 2). Cuando la generación de estos vasos dentro de la retina es anormal o se alteran por mecanismos patológicos, se producen enfermedades retinianas que conducen a la pérdida de la visión. Estas alteraciones pueden pasar de simples “anormalidades micro-vasculares intraretinianas” (del inglés, IRMA) a procesos más complejos como los “neovasos retinianos”, cuando su crecimiento alterado se produce en la superficie de la retina hacia el humor vítreo (Figura 3). Estos neovasos son tortuosos, dilatados y poseen uniones celulares débiles, por lo cual producen una pérdida de plasma hacia la cavidad vítrea. Estas pérdidas pueden generar que el vítreo se contraiga, degenera y eventualmente colapse, lo cual conlleva al desprendimiento de retina.

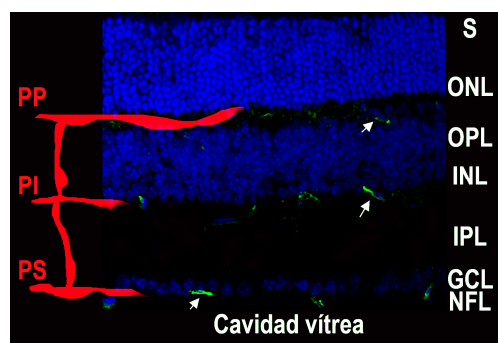


Figura 2. Plexos vasculares en la retina neural: plexo superficial (PS), intermedio (PI) y profundo (PP). Se muestra imagen de inmunofluorescencia para CD31 (verde), que se encuentra presente en las uniones entre las células endoteliales (flechas), y tinción nuclear con Hoechst (azul) en un corte de retina de ratón adulto. Además se representa en rojo la ubicación de los diferentes plexos vasculares.

encuentra presente en las uniones entre las células endoteliales (flechas), y tinción nuclear con Hoechst (azul) en un corte de retina de ratón adulto. Además se representa en rojo la ubicación de los diferentes plexos vasculares.

II. Retinopatías neovasculares

Diversas patologías retinianas convergen en la neovascularización patológica (NV). Entre ellas, las de mayor incidencia mundial son la Retinopatía Diabética (del inglés, DR) y la Retinopatía del Prematuro (del inglés, ROP), mientras que con menor incidencia destacamos la oclusión venosa retiniana y la retinopatía asociada a anemia falciforme [4-6]. Este crecimiento anormal de vasos es producido por isquemia retiniana, por lo que estas enfermedades son denominadas retinopatías isquémicas proliferativas [7]. Se conoce que la hipoxia o isquemia [8, 9] es el estímulo inicial que desencadena una serie de eventos como el desbalance entre moléculas proangiogénicas (VEGF, bFGF, PDGF, etc.) y anti-angiogénicas (PEDF, TGFβ, Angiostatina, TIMP, etc.), entre otros [10], que van a estimular la proliferación y migración de las células endoteliales constituyentes de estos neovasos.

Retinopatía Diabética

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica de gran incidencia mundial. Existen dos tipos principales (1 y 2), siendo la tipo 2 la más frecuente (95%). La DR constituye una de las principales complicaciones que derivan del elevado nivel de glucosa en sangre que presentan muchos de estos pacientes por tiempo prolongado. Desde el punto de vista clínico, la DR presenta una etapa inicial no proliferativa, que se caracteriza por la presencia de microaneurismas, hemorragias intraretinianas y exudados; y una más avanzada o proliferativa, en la cual aparece NV, obliteración de capilares, hemorragias y edemas intensos.

Retinopatía del Prematuro

La ROP es una retinopatía vasoproliferativa que puede afectar la visión de infantes de bajo peso nacidos antes de término, razón por la cual en estos niños aún no ha concluido el desarrollo de su vasculatura retiniana. Si bien es prevenible, esta enfermedad sigue siendo la principal causa de ceguera en la infancia en el mundo entero [11]. La ROP es una patología de dos fases. El inicio de la primera fase se produce cuando el prematuro en la incubadora es expuesto a concentraciones de oxígeno mayores a las fisiológicas. Esta hiperoxia produce un arresto en el desarrollo vascular normal además de un incremento del estrés oxidativo en la retina. Luego que el prematuro sale de la incubadora, comienza la segunda fase caracterizada por la proliferación de neovasos inducida por la hipoxia relativa generada frente a la presión de oxígeno ambiental en relación al contexto hiperóxico de la incubadora [12]. Esta hipoxia es la responsable de desencadenar la expresión de factores proangiogénicos [13] que conducen a la NV característica de la ROP.

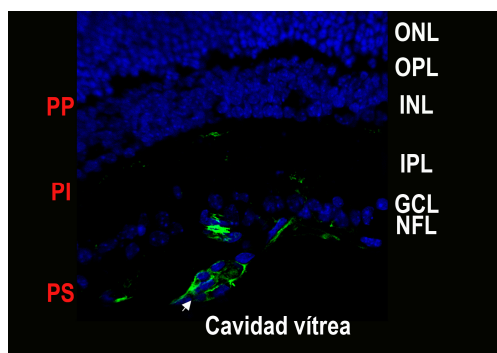


Figura 3. Neovascularización retiniana hacia la cavidad vítrea. Se muestra imagen de inmunofluorescencia para CD31 (verde) y tinción nuclear con Hoechst (azul) en un corte de retina de ratón en el día postnatal 17 cuando se genera la mayor cantidad de neovasos aberrantes (flecha) en el modelo de retinopatía inducida por oxígeno (OIR).

Métodos diagnósticos: Tomografía de coherencia óptica (OCT) y Angiografía OCT (AOCT)

Los pacientes con enfermedades neovasculares retinianas como DR y ROP pueden ser estudiados a distintos puntos de precisión con métodos diagnósticos que incluyen oftalmoscopia indirecta, angiografía fluoresceínica, ecografía ocular, fondo de ojos sin contraste, tomografía de coherencia óptica (OCT) y, en el último tiempo, con angiografía OCT (AOCT). Cada uno de ellos contempla indicaciones y usos de acuerdo a la población de pacientes que se desea estudiar.

OCT es una herramienta de diagnóstico no invasiva crucial en la evaluación de pacientes afectados por la DR u otras patologías coriorretinianas. Su aplicación principal en la DR es el estudio del edema macular diabético (DME) ya que proporciona información valiosa sobre estructuras importantes como la interfaz vitreoretiniana, las capas NFL y GCL y también respecto a la coroides (Figura 4) [14]. Además, permite la detección de otras lesiones que ocurren en entornos no proliferativos como micropseudoquistes, exudados duros, microaneurismas y exudados algodonosos; y en etapas proliferativas como NV, vitreosquisis, desprendimiento de retina traccional y hemorragia. La NV retiniana se observa como estructuras hiperreflexivas en la superficie de la retina que se adhieren a membrana limitante interna [15]. Sin embargo, AOCT supera significativamente a OCT en lo que respecta a análisis cuantitativos. Este método constituye una modalidad novedosa que muestra de forma segura, rápida y no invasiva la microvasculatura retiniana con una resolución que supera a la angiografía fluoresceínica [16]. Estudios recientes de AOCT han demostrado cambios vasculares retinianos en pacientes con DR, tales como perfusión capilar alterada, anomalías microvasculares intrarretinianas, NV, así como algunos tipos de microaneurismas [17, 18]. A pesar de la demostrada utilidad del OCT en la práctica clínica de adultos, se ha demorado su empleo en la población pediátrica. Actualmente existen escasos reportes del empleo de AOCT en bebés prematuros [19].

Los métodos diagnósticos brindan información valiosa respecto a las características y progresión de

estas patologías en humanos, sin embargo, es necesario conocer las bases celulares y moleculares que explican la patogénesis de las retinopatías neovasculares. En la actualidad, estudios demuestran que mucho antes de las lesiones vasculares, aparecen alteraciones en células neuronales y gliales de la retina. Es por ello que un mayor entendimiento de los mecanismos involucrados es esencial para el desarrollo de nuevas terapias, siendo los modelos animales una herramienta indispensable para ello [20].

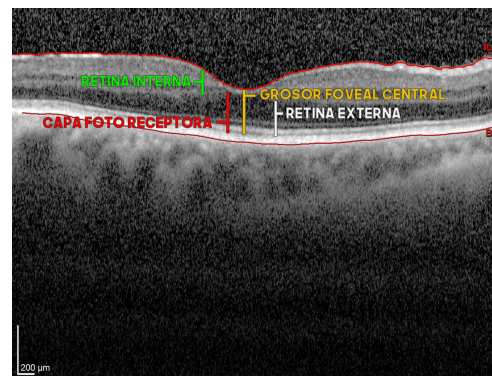


Figura 4. Imagen obtenida mediante OCT de una retina humana. Se señalan los parámetros más importantes que pueden medirse y evaluarse mediante este método. ILM: membrana limitante interna, del inglés Inner Limiting Membrane; BM: membrana de Bruch, del inglés Bruch's Membrane.

III. Modelos animales: Alcances y perspectivas

La mayoría de los estudios sobre DR han sido realizados en modelos animales que reproducen características de la DM tipo 1 siendo ésta la presentación menos frecuente en humanos. Estos modelos, realizados en diferentes animales, se basan principalmente en la inducción química de DM tipo 1 con estreptozotocina o aloxano, siendo los modelos en rata y ratón los más utilizados [21]. Existen también cepas de ratones que generan DM tipo 1 de manera espontánea. Entre ellos hay animales que presentan destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas o que presentan una mutación dominante en el gen de la insulina 2. Estos animales muestran además de alteraciones vasculares, cambios morfológicos en astrocitos y microglia así como pérdida de células ganglionares en su retina [22]. Numerosas alteraciones no vasculares (neuronales y gliales) han sido descritas mediante la utilización de estos modelos, así como el impacto en la funcionalidad retiniana, que preceden a los cambios vasculares como la pérdida de pericitos y aumento de permeabilidad vascular [23].

Actualmente continúa siendo un desafío el diseño de un modelo ideal de DM tipo 2 que refleje el aporte del síndrome metabólico crónico al desarrollo de la DR. En éste sentido, se observaron alteraciones vasculares en la retina de ratas obesas (cepa Zucker), y en ratas WBN/Kob [24]. Interesantemente, la rata Otsuka Long-Evans Tokushima presenta manifestaciones clínico-patológicas que se asemejan bastante a las de la DM tipo 2 humana, con significativa disminución del espesor de

las capas celulares retinianas [24, 25]. Analizando modelos de ratas no obesas con DM tipo 2, las Goto-Kakizaki son de gran ayuda para el estudio de cambios en la microcirculación retiniana durante largos períodos de tiempo [24, 26]. En cambio, la cepa de ratas Torii desarrolla NV en ausencia de isquemia [24], lo cual no ocurre en individuos diabéticos. Nuestro grupo está trabajando en el diseño de un modelo experimental de síndrome metabólico empleando ratones deficientes en apolipoproteína E, que presentan hipercolesterolemia, tratados con sobrecarga de fructosa en el agua de bebida. Datos aún no publicados muestran que, a los cuatro meses de dieta, las retinas de estos ratones desarrollan alteraciones vasculares y neuronales de la DR temprana, incluidas el aumento en la permeabilidad vascular y la disminución en la respuesta funcional medida por electroretinografía.

Al presente, en la mayoría de los modelos animales estudiados solo ha sido posible observar el desarrollo de las etapas iniciales de la DR, pero no la progresión hacia lesiones más avanzadas como la NV observada en humanos. A fin de caracterizar las etapas y mecanismos moleculares asociados a la NV retiniana, múltiples grupos de investigación han utilizado el modelo de retinopatía inducida por oxígeno (del inglés, OIR) [27]. Diferentes especies animales han sido empleadas para reproducir este modelo, que simula las fases de desarrollo de la ROP, siendo actualmente mejor caracterizado en la cepa murina C57BL/6. A modo descriptivo, los ratones son introducidos en el día posnatal 7 (P7) en un ambiente de hiperoxia (75% de Oxígeno) que desencadena la detención del crecimiento vascular, vaso-obliteración y la consecuente generación de una zona avascular central en la retina. Los ratones son devueltos en el día P12 a las condiciones de aire normal (21% de Oxígeno). Este nuevo contexto es censado como un ambiente hipóxico, activando todas las vías moleculares que aumentan la expresión de factores proangiogénicos, observándose un pico de NV hacia el día P17. Además, estos ratones son capaces de resolver esta situación revirtiendo la NV y vaso-obliteración hacia el día P25. Sin embargo, nuestro grupo ha observado que no se revierten las alteraciones neuronales ni gliales, así como tampoco la consecuente pérdida en la respuesta funcional de la retina [28]. Este modelo, ha permitido identificar muchos factores claves, tanto para el desarrollo vascular fisiológico como patológico [29], además de ser una herramienta fundamental para el estudio de potenciales blancos terapéuticos.

IV. Modelos *in vitro*: Células de Müller

La NV es un proceso dinámico influenciado por diversos mecanismos reguladores. A fin de lograr determinar la contribución de todas las vías pro y anti-angiogénicas, así como su relación con los mecanismos de estrés y muerte neuronal y glial, es necesario conocer minuciosamente los mecanismos moleculares involucrados. Para este fin, la utilización de modelos *in vitro* como métodos alternativos permite una evaluación

más robusta de los resultados y reduce los tiempos y los costos en la mayoría de los casos. Además, existe una fuerte tendencia mundial de reemplazar, siempre que sea posible, los animales de experimentación por metodologías *in vitro*.

Las CGM participan activamente en el desarrollo de la retina y contribuyen a la homeostasis tisular a través de muchos mecanismos intracelulares. Estas células interactúan con neuronas, astrocitos, microglia y células endoteliales con el fin de modular diferentes eventos [30]. Por estos motivos, su estudio mediante cultivo celular primario o a través de líneas celulares inmortalizadas tales como las MIO-M1, permite avanzar en el conocimiento de aspectos moleculares detallados en relación a los mecanismos de acción de los blancos terapéuticos, tal como nuestro grupo ha descrito para el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) [31].

Resultados de recientes investigaciones han centrado su atención en el papel de las CGM en la RD, demostrando que las CGM muestran diferentes respuestas de acuerdo con la severidad del daño y, por lo tanto, desencadenan distintos eventos a lo largo del curso de la enfermedad. En general, estas células participan en procesos de inflamación, gliosis, síntesis y secreción de factores tróficos (como VEGF) y antioxidantes en la retina diabética, presentando un papel protector / perjudicial según se trate de etapas tempranas o tardías de la enfermedad. Es posible proponer que la modulación adecuada de la respuesta de las CGM constituya una terapia prometedora para la RD, tratando de restablecer los niveles de factores tróficos, disminuyendo la inflamación crónica, evitando la NV y activando vías de protección para de este modo poder garantizar la preservación neuronal y vascular [32].

V. Blancos terapéuticos

Diferentes estrategias terapéuticas tales como el láser e inclusive la vitrectomía, forman parte de los tratamientos utilizados históricamente en las retinopatías neovasculares. Constituyendo éstas, las principales herramientas para enlentecer la progresión de la enfermedad hacia la ceguera. En el desarrollo de la pérdida de visión producida en la ROP y la DR proliferativa intervienen varios factores de crecimiento [33, 34], siendo el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) la molécula más estudiada como mediadora de la NV en patologías oculares [10, 35]. Evidencias derivadas de modelos experimentales y estudios clínicos, han proporcionado información sobre los mecanismos de lesión vascular que conducen a la NV, lo cual ha llevado al descubrimiento y la implementación de terapias oculares anti-VEGF [36]. Actualmente, el Bevacizumab (Avastin, Genentech, San Francisco, CA), ranibizumab (Lucentis, Genentech, San Francisco, CA) y aflibercept (Eylea; Regeneron Pharmaceuticals, Tarrytown, NY) son los fármacos, administrados vía intravítrea, más utilizados en estas patologías oculares. Sin embargo, el beneficio clínico conferido por estas terapias es variable y los resultados

están siendo cuestionados [33, 36]. En este sentido, existen muchos pacientes no respondedores, sugiriendo que existen otros mediadores vasculares importantes para el desarrollo de la NV ocular.

Recientes estudios orientados a mejorar las terapias antiangiogénicas incluyen nuevos blancos terapéuticos potenciales tales como: miembros de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), de la subfamilia de VEGF, de las familias del factor de crecimiento epidérmico, del factor de crecimiento fibroblástico y de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β 1, etc.). Así también de angiopoyetinas, galectinas, integrinas, así como el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), factor de crecimiento de hepatocitos, endotelinas, factores inducibles por hipoxia, factores de crecimiento similares a la insulina, citoquinas, metaloproteinasas de matriz y sus inhibidores y proteínas de glucosilación [37]. En este sentido, utilizando el modelo murino de OIR y modelos animales de DR, investigadores de nuestro grupo han realizado importantes avances en el estudio de IGF-1 [38], del pro-factor de crecimiento neuronal (NGF) y su receptor p75NTR [39] y de Galectina-1 [28], como blancos moleculares con potencial terapéutico para estas patologías, además de la proteína de fase aguda α 2Macroglobulina (α 2M) como un biomarcador interesante de la progresión de la RD [39].

Existe una red intrincada de factores que desencadenan la NV retiniana, por lo cual la modulación de diferentes moléculas de esta red parece ser más efectivo que utilizar un único blanco terapéutico. La investigación en esta área es sumamente necesaria para acelerar el descubrimiento de nuevas terapias y establecer la efectividad de las mismas. Identificar las moléculas de mayor participación en los estímulos angiogénicos y estudiar la mejor combinación de blancos moleculares permitirá intervenir en las complejas interacciones relacionadas con la NV [37]. Además, gracias al aumento sustancial en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas en los últimos años, hoy se conoce que es necesario que éstas apunten, no sólo a eliminar la NV, sino también a promover la normalización de la vasculatura retiniana a fin de rescatar a las neuronas y células gliales de la muerte por falta de oxígeno y nutrientes.

VI. Conclusiones y Perspectivas

Las retinopatías neovasculares se encuentran dentro de las principales causas de ceguera [40-42] y, si bien no se dispone de estadísticas actualizadas, se estima que existen ~1.800.000 personas diabéticas en nuestro país. Además, la mitad de los 50.000-60.000 niños ciegos a causa de la ROP, viven en América Latina [43]. En la actualidad, los tratamientos existentes para las retinopatías (fotocoagulación, vitrectomía, inyección intraocular de anticuerpos monoclonales contra VEGF) intentan detenerlas pero sólo en casos puntuales logran mejorarlas y pese a que los inhibidores de VEGF se han establecido como el pilar del tratamiento actual [36], el manejo clínico de estas enfermedades es todavía

limitado [33]. Además, la potencial resistencia a la terapia antiangiogénica debido a factores genéticos aparece como otro parámetro importante que no puede ser pasado por alto [44]. En este contexto, resulta crucial la generación de nuevos conocimientos que permitan ampliar el espectro de potenciales blancos terapéuticos, tanto a nivel celular como molecular; dando lugar al desarrollo de nuevas estrategias orientadas a recuperar la función retiniana en desordenes neovasculares. Si bien se han reportado numerosas moléculas con potencialidad terapéutica, aún no se ha logrado su profunda caracterización para avanzar hacia su implementación en la clínica oftalmológica. A tal fin, es indispensable el empleo de modelos *in vivo* e *in vitro*, con sus respectivas ventajas y desventajas, cuya elección dependerá de los objetivos y alcances particulares de cada estudio.

VII. REFERENCIAS

1. Kolb, H., Simple Anatomy of the Retina, in Webvision: The Organization of the Retina and Visual System, H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, Editors. 1995: Salt Lake City (UT).
2. Kolb, H., et al., Cellular organization of the vertebrate retina. *Prog Brain Res*, 2001. 131: p. 3-26.
3. De Hoz, R., et al., Retinal Macroglial Responses in Health and Disease. *Biomed Res Int*, 2016. 2016: p. 2954721.
4. Barber, A.J., et al., Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest*, 1998. 102(4): p. 783-91.
5. Lachapelle, P., et al., Persistent functional and structural retinal anomalies in newborn rats exposed to hyperoxia. *Can J Physiol Pharmacol*, 1999. 77(1): p. 48-55.
6. Sapiéha, P., et al., Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *J Clin Invest*, 2010. 120(9): p. 3022-32.
7. Campochiaro, P.A., Ocular neovascularization. *J Mol Med (Berl)*, 2013. 91(3): p. 311-21.
8. Michaelson, I.C., Intra-mural new vessels in an occluded retinal vein: A clinical description. *Br J Ophthalmol*, 1948. 32(3): p. 164-6.
9. Ashton, N., Retinal vascularization in health and disease: Proctor Award Lecture of the Association for Research in Ophthalmology. *Am J Ophthalmol*, 1957. 44(4 Pt 2): p. 7-17.
10. Das, A. and P.G. McGuire, Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. *Prog Retin Eye Res*, 2003. 22(6): p. 721-48.
11. Hellstrom, A., L.E. Smith, and O. Dammann, Retinopathy of prematurity. *Lancet*, 2013. 382(9902): p. 1445-57.
12. Hartnett, M.E. and J.S. Penn, Mechanisms and management of retinopathy of prematurity. *N Engl J Med*, 2013. 368(12): p. 1162-3.
13. Jousseaume, A.M., et al., In vivo retinal gene expression in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001. 42(12): p. 3047-57.
14. Otani, T., S. Kishi, and Y. Maruyama, Patterns of diabetic macular edema with optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol*, 1999. 127(6): p. 688-93.
15. Muqit, M.M. and P.E. Stanga, Fourier-domain optical coherence tomography evaluation of retinal and optic nerve head neovascularisation in proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*, 2014. 98(1): p. 65-72.
16. Stanga, P.E., et al., Swept-Source Optical Coherence Tomography Angio (Topcon Corp, Japan): Technology Review. *Dev Ophthalmol*, 2016. 56: p. 13-7.
17. Hwang, T.S., et al., Optical Coherence Tomography Angiography Features of Diabetic Retinopathy. *Retina*, 2015. 35(11): p. 2371-6.

18. Liu G, X.D., Wang F., New insights into diabetic retinopathy by OCT angiography. *Diabetes Res Clin Pract.* , 2018(142): p. 243-253.
19. Vinekar, A., et al., Monitoring neovascularization in aggressive posterior retinopathy of prematurity using optical coherence tomography angiography. *J AAPOS*, 2016. 20(3): p. 271-4.
20. Subirada Caldarone, P.L.V.S.M., Modelos animales de retinopatía diabética: comprensión de la patogénesis y potencial utilización en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. *Bitácora digital, Facultad de Ciencias Químicas (UNC)*, 2013: p. 1-5.
21. Lai, A.K. and A.C. Lo, Animal models of diabetic retinopathy: summary and comparison. *J Diabetes Res*, 2013. 2013: p. 106594.
22. Gastinger, M.J., et al., Dendrite remodeling and other abnormalities in the retinal ganglion cells of *Ins2 Akita* diabetic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008. 49(6): p. 2635-42.
23. Mordes, J.P., et al., Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. *ILAR J*, 2004. 45(3): p. 278-91.
24. Robinson, R., et al., Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals. *Dis Model Mech*, 2012. 5(4): p. 444-56.
25. Kawano, K., et al., Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. Diabetes*, 1992. 41(11): p. 1422-8.
26. Goto, Y., et al., Development of diabetes in the non-obese NIDDM rat (GK rat). *Adv Exp Med Biol*, 1988. 246: p. 29-31.
27. Smith, L.E., et al., Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994. 35(1): p. 101-11.
28. Ridano, M.E., et al., Galectin-1 expression imprints a neurovascular phenotype in proliferative retinopathies and delineates responses to anti-VEGF. *Oncotarget*, 2017. 8(20): p. 32505-32522.
29. Stahl, A., et al., The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010. 51(6): p. 2813-26.
30. Sorrentino, F.S., et al., The importance of glial cells in the homeostasis of the retinal microenvironment and their pivotal role in the course of diabetic retinopathy. *Life Sci*, 2016. 162: p. 54-9.
31. Lorenc, V.E., et al., IGF-1 Regulates the Extracellular Level of Active MMP-2 and Promotes Muller Glial Cell Motility. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015. 56(11): p. 6948-60.
32. Subirada, P.V., et al., A journey into the retina: Muller glia commanding survival and death. *Eur J Neurosci*, 2018. 47(12): p. 1429-1443.
33. Diabetic Retinopathy Clinical Research, N., et al., Aflibercept, bevacizumab, or ranibizumab for diabetic macular edema. *N Engl J Med*, 2015. 372(13): p. 1193-203.
34. Durham, J.T. and I.M. Herman, Microvascular modifications in diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep*, 2011. 11(4): p. 253-64.
35. Aiello, L.P., Vascular endothelial growth factor and the eye: biochemical mechanisms of action and implications for novel therapies. *Ophthalmic Res*, 1997. 29(5): p. 354-62.
36. Tah, V., et al., Anti-VEGF Therapy and the Retina: An Update. *J Ophthalmol*, 2015. 2015: p. 627674.
37. Cabral, T., et al., Retinal and choroidal angiogenesis: a review of new targets. *Int J Retina Vitreous*, 2017. 3: p. 31.
38. Lorenc, V.E., et al., IGF-1R Regulates the Extracellular Level of Active MMP-2, Pathological Neovascularization, and Functionality in Retinas of OIR Mouse Model. *Mol Neurobiol*, 2017.
39. Barcelona, P.F., et al., p75NTR and Its Ligand ProNGF Activate Paracrine Mechanisms Etiological to the Vascular, Inflammatory, and Neurodegenerative Pathologies of Diabetic Retinopathy. *J Neurosci*, 2016. 36(34): p. 8826-41.
40. Friedlander, M., et al., Progenitor cells and retinal angiogenesis. *Angiogenesis*, 2007. 10(2): p. 89-101.
41. Simo, R., et al., Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev*, 2006. 2(1): p. 71-98.
42. Campochiaro, P.A., Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases. *Prog Retin Eye Res*, 2015. 49: p. 67-81.
43. *Oftalmológico, P.I., Oct N° 44*, 2006.
44. Tranos, P., et al., Resistance to antivascular endothelial growth factor treatment in age-related macular degeneration. *Drug Des Devel Ther*, 2013. 7: p. 485-90.