

Università degli studi di Pisa

Dipartimento di Biologia



UNIVERSITÀ DI PISA

Corso di laurea in Biologia Applicata alla Biomedicina
Curriculum Fisiopatologico Generale

Tesi di Laurea

***“Effetti antiangiogenici e neuroprotettivi di
UPARANT in un modello di retinopatia
diabetica”***

Candidato:

Francesco Ventrice

Relatore:

Dott. Maurizio Cammalleri

*Anno Accademico
2014/2015*

INDICE

<i>Abstract</i>	1
<i>Riassunto</i>	2
CAPITOLO 1	4
1.1 La Retina	4
1.1.1 <i>La visione ed il sistema visivo</i>	4
1.1.2 <i>La retina: morfologia e cenni sullo sviluppo</i>	6
1.1.3 <i>Funzione della retina</i>	10
1.1.4 <i>Vascolarizzazione della retina</i>	11
1.1.5 <i>La barriera emato-retinica (BRB)</i>	13
1.2. Le retinopatie proliferative.....	14
1.2.1 <i>La Retinopatia Diabetica</i>	16
1.2.2 <i>Alterazioni metaboliche nella patogenesi della DR</i>	19
1.2.3 <i>L'elettroretinografia</i>	21
1.2.4 <i>Terapie attualmente in uso nel trattamento della DR</i>	23
1.3. Il sistema uPA/uPAR	25
1.3.1 <i>L'attivatore urochinasi del plasminogeno (uPA)</i>	25
1.3.2 <i>L'uPAR: interazioni molecolari ed attività di membrana</i>	26
1.3.3 <i>Il sistema uPA/uPAR e la neangiogenesi retinica</i>	27
CAPITOLO 2	30
Scopo della tesi	30
CAPITOLO 3	31
Materiali e Metodi.....	31
3.1 <i>Animali</i>	31
3.2 <i>Induzione del diabete</i>	31
3.3 <i>Trattamento farmacologico</i>	32
3.4 <i>Immunoistochimica</i>	33
3.5 <i>Valutazione della barriera emato-retinica</i>	33
3.6 <i>Registrazioni elettroretinografiche</i>	34

3.7 Real Time RT-PCR.....	34
3.8 Analisi dei dati	35
CAPITOLO 4.....	36
Risultati	36
4.1. Validazione del modello diabetico	36
4.2 Effetto di UPARANT sui livelli di VEGF	40
4.3 Effetto di UPARANT sulla neovascolarizzazione retinica	41
4.4 Effetto di UPARANT sull'integrità della BRB	43
4.5 Effetto di UPARANT sulla funzione visiva.....	44
CAPITOLO 5	45
Discussione	45
5.1 Effetti di UPARANT sulla neoangiogenesi proliferativa	45
5.2 Effetto di UPARANT sulla BRB	46
5.3 Effetto di UPARANT sulla funzionalità visiva	47
CONCLUSIONI.....	49
Riferimenti bibliografici.....	50

Abstract

Diabetic retinopathy (DR) is the major ocular complication associated with diabetes and represents the leading cause of blindness in the working-age population of developed countries. Diabetes predominantly affects the microvascular circulation of the retina resulting in a range of structural changes unique to this tissue. Hyperglycemia induces the breakdown of the blood-retinal barrier (BRB) that leads to altered permeability, edema, hyperproliferation of endothelial cells and abnormal vascularization of the retina resulting in vision loss. Current therapies, both pharmacological and surgical, have shown low effectiveness and high risk of systemic side effects. So there is a strong need of new drugs specifically targeting angiogenesis-associated retinal diseases. In this regard, the uPA/uPAR system is a promising target for the development of anti-angiogenic drugs, as in the retina it contributes to promoting angiogenesis. Recently the tetrapeptide UPARANT has shown several advantages both *in vitro* and *in vivo*. This study investigates the effectiveness of UPARANT in a model of DR induced in rats. We found that UPARANT restores BRB integrity, reduces VEGF-mRNA levels, counteracts pathological neovascularization and recovers visual loss. Those findings suggest that UPARANT may help to establish uPAR as a target in the treatment of proliferative retinopathies.

Riassunto

La retinopatia diabetica (DR) è la più comune complicazione del diabete mellito, che rappresenta ad oggi un'emergenza sanitaria mondiale per l'elevata prevalenza e il tasso di morbilità associato. La DR si sviluppa nel 75% dei pazienti con diabete mellito di tipo 1 e nel 50% dei pazienti con diabete di tipo 2 e costituisce la maggiore causa di cecità nei soggetti di età superiore a 50 anni. Dal punto di vista clinico si possono distinguere due forme di DR: una forma iniziale, definita "non proliferativa" (NPDR), che si caratterizza per la perdita dei periciti, disfunzione della barriera emato retinica e ispessimento della membrana basale dei capillari ed una "proliferativa" (PDR), caratterizzata da neovascolarizzazione retinica ed emorragia nel vitreo. Pertanto, la prevenzione ed il trattamento della DR rappresentano una grande sfida. I farmaci anti-VEGF intravitreali hanno rappresentato un importante passo in avanti nel trattamento delle retinopatie proliferative rispetto ai metodi chirurgici come l'ablazione vitrea e la fotocoagulazione mediante laser. Tuttavia questi farmaci non sono esenti dal presentare limitazioni ed effetti collaterali. Ad esempio, vi sono studi che riportano limitati benefici dei farmaci anti-VEGF rispetto alla fotocoagulazione laser nel trattamento della DR. Inoltre, le terapie anti-VEGF si limitano a contrastare i sintomi della patologia senza intervenire sulla causa dello stimolo neoangiogenico, richiedono ripetute iniezioni intravitreali che possono causare complicazioni come l'endofalmitide, la formazione di cataratta ed il distacco della retina. Tali complicanze hanno promosso numerose ricerche per lo sviluppo di nuovi agenti anti-angiogenici per il trattamento delle retinopatie proliferative.

Poiché il sistema uPA/uPAR è coinvolto nelle alterazioni della barriera emato retinica (BRB) che caratterizzano i ratti con DR e poiché in topi con OIR UPARAT riduce la neovascolarizzazione e le alterazioni della BRB con conseguente recupero della funzione retinica è ipotizzabile che UPARANT possa ridurre le anomalie vascolari che caratterizzano la DR migliorando quindi la funzione visiva. In ratti maschi Sprague Dawley di 8 settimane di età il diabete è stato indotto con una iniezione intraperitoneale di streptozotocina (STZ) alla dose di 60 mg/Kg. La glicemia è stata misurata dopo 72 ore ed i ratti sono stati considerati diabetici se i

livelli di glicemia erano superiori a 250 mg/dl. Il peso e la glicemia sono stati controllati ogni settimana. Dopo 8 settimane dalla somministrazione di STZ, UPARANT è stato iniettato intravitrealmente (4 μ l o 2 μ l una volta alla settimana per due settimane) alla dose di 10 μ g/ μ l. La barriera emato retinica è stata valutata mediante perfusione con Evans Blu, un colorante che si lega alle proteine plasmatiche e mette in evidenza l'eventuale fuoriuscita del plasma dai vasi danneggiati. La distribuzione e la morfologia dei capillari sono state valutate mediante immunistochemica e la funzione visiva è stata valutata mediante registrazioni elettroretinografiche.

Risultati: il peso dei ratti di controllo aumenta seguendo la normale curva di crescita mentre il peso dei ratti STZ rimane relativamente costante, come atteso in animali che abbiano sviluppato il diabete. La glicemia nei ratti STZ, come atteso, aumenta di circa 4 volte rispetto ai ratti di controllo. In accordo con la letteratura, la retina dei ratti trattati con STZ è caratterizzata da un aumento dei vasi retinici rispetto a retine di ratti di controllo, inoltre è caratterizzata da disfunzione della BRB evidenziata mediante blu di Evans e da un alterato elettroretinogramma con una drastica riduzione della ampiezza delle onde a e b rispetto a ratti di controllo. L'iniezione intravitreale di UPARANT non ha effetto né sul peso, né sulla glicemia. Nei ratti trattati con 4 μ l di UPARANT abbiamo osservato una riduzione della vascolarizzazione retinica, un miglioramento della BRB con conseguente miglioramento della funzione visiva. Mentre un tale miglioramento non è stato osservato nei ratti trattati con 2 μ l di UPARANT. Questi risultati dimostrano l'efficacia di UPARANT quale farmaco antiangiogenico in un modello di DR.

CAPITOLO 1

1.1 La Retina

1.1.1 La visione ed il sistema visivo

La percezione del mondo, nella complessità di ogni sua sfaccettatura, è di fondamentale importanza nell'esistenza di tutti gli esseri viventi. La visione è un complesso processo neurologico di elaborazione delle informazioni: rende possibile la percezione di forma, colore, posizione degli oggetti ed è intimamente legato alla capacità uditiva, linguistica e motoria. Tutte queste prerogative rendono la vista la più importante capacità sensoriale. La rappresentazione di un'immagine si realizza solo quando il segnale è integrato dalle stazioni cerebrali superiori (Carlson, 2014). La ricezione e la trasduzione dell'informazione visiva sono infatti processi che si attuano tra i vari livelli dell'apparato visivo. Quest'ultimo è composto dagli occhi, dal nervo ottico, dal chiasma ottico, dal nucleo genicolato laterale del talamo e dalle aree della corteccia visiva (Fig. 1).

L'occhio, principale organo del sistema, è composto da tre strati rappresentati da tuniche di diversa natura. A partire dall'esterno si distinguono rispettivamente la tunica fibrosa, costituita dalla cornea anteriormente e dalla sclera posteriormente, lo strato vascolarizzato che comprende coroide, corpo ciliare e iride, ed infine la retina, vera e propria componente sensoriale della via ottica (Gray, 1918; Davson, 2012) (Fig. 2). La funzione dell'occhio è captare lo stimolo visivo (rappresentato dalla luce), regolarne l'intensità attraverso l'iride e focalizzarlo. L'immagine viene distorta, rimpicciolita e ribaltata attraverso un sistema regolabile di lenti (cornea, cristallino e corpo vitreo), dette "mezzi diottrici oculari", e proiettata sulla superficie curva della retina a livello della fovea. Quest'ultima si comporta come un trasduttore dell'energia dei fotoni, trasformando l'immagine in una serie di segnali nervosi che attraverso il nervo ottico vengono inviati ai centri superiori del cervello. Da entrambi

gli occhi, infatti, si dipartono i nervi ottici che, lasciando l'orbita oculare attraverso il canale ottico, raggiungono il chiasma ottico dove si sovrappongono parzialmente. Infine, da questa stazione intermedia, proiettano verso il corpo genicolato laterale del talamo.

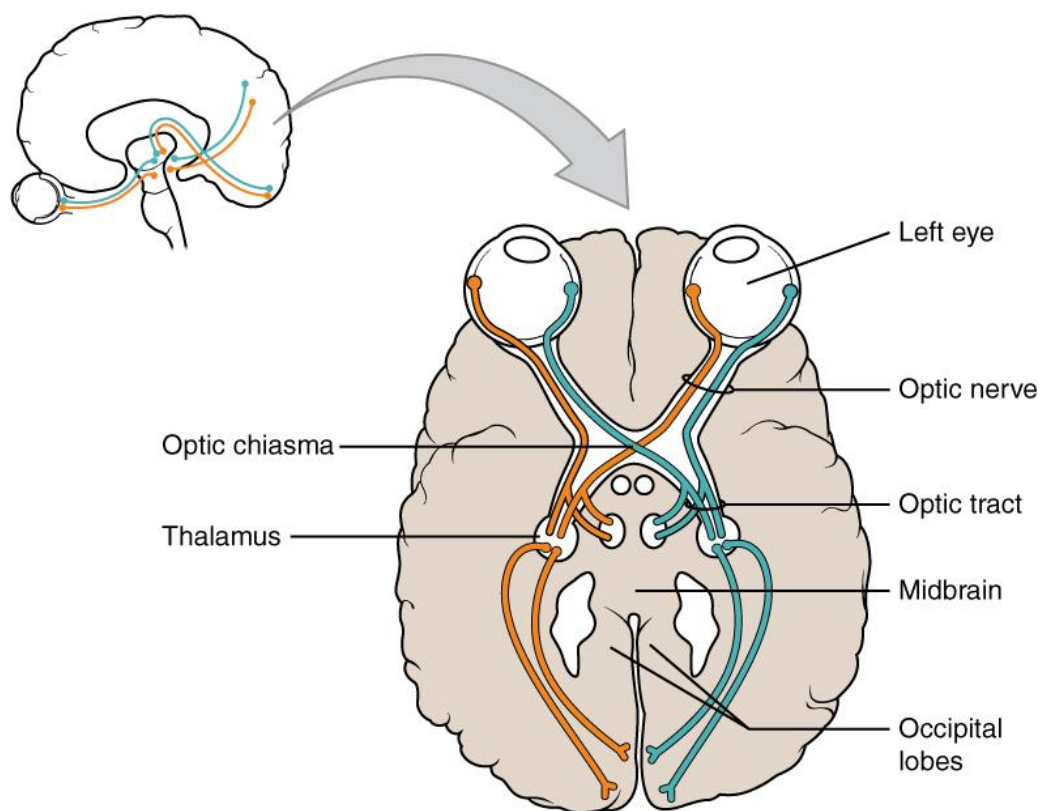


Figura 1. Rappresentazione della via ottica. Tratta da <https://cnx.org>.

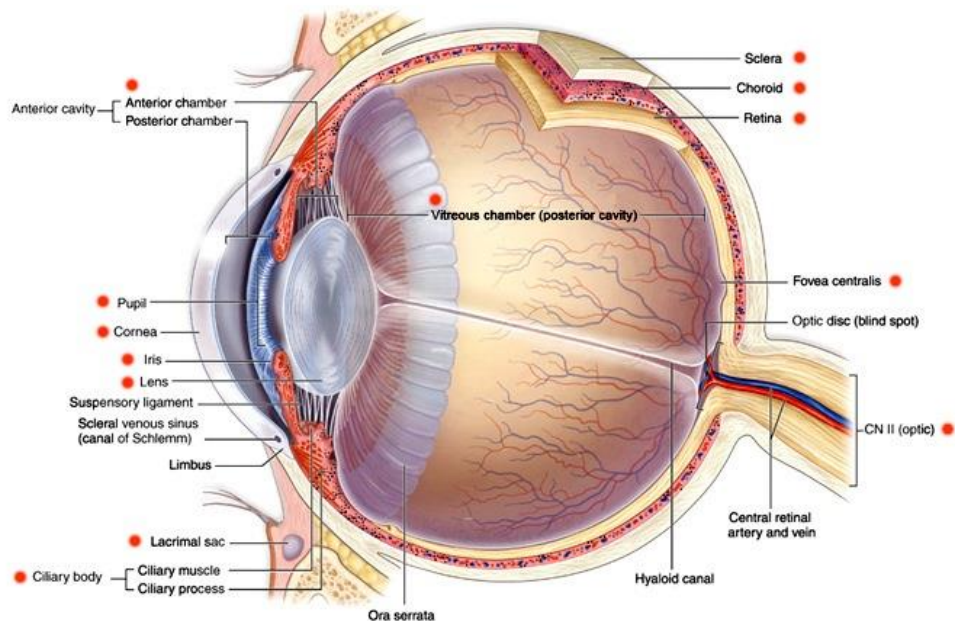


Figura 2. Anatomia e struttura dell'occhio. Tratta da <https://iris-pharma.com>.

1.1.2. La retina: morfologia e cenni sullo sviluppo

La retina è un sottile strato di tessuto nervoso che riveste la superficie interna del bulbo oculare.

Nonostante la sua localizzazione periferica, tale porzione neurale è una parte integrante del sistema nervoso centrale (SNC) connessa, tramite il nervo ottico, al mesencefalo (Purves et al., 2001). Analogamente ad altre porzioni del SNC, la retina deriva dal tubo neurale ed in particolare da estroflessioni ai lati della regione anteriore, detta diencefalo, da cui si generano le vescicole ottiche. Ognuna di esse nelle fasi successive dello sviluppo embrionale si ripiega formando la coppa ottica, la cui porzione interna in seguito si differenzia nella retina (Yang, 2004; Gilbert, 2000). Al completamento dell'embriogenesi essa appare come una struttura laminare in cui si riconoscono diversi strati di cellule. Sebbene a prima vista, la retina appaia come

un disordinato insieme di neuroni, tanto da somigliare ad una rete intricata (da cui il nome “retina”), ad un esame più approfondito si evince invece una rigorosa organizzazione strutturale, basata su una precisa ed ordinata correlazione interneuronale. La funzione di tale circuito neurale, ovvero la conversione dell’energia fotochimica in un flusso di segnali nervosi diretti ai centri superiori attraverso il nervo ottico, è quindi fortemente supportata dall’architettura tissutale (Fig. 3).

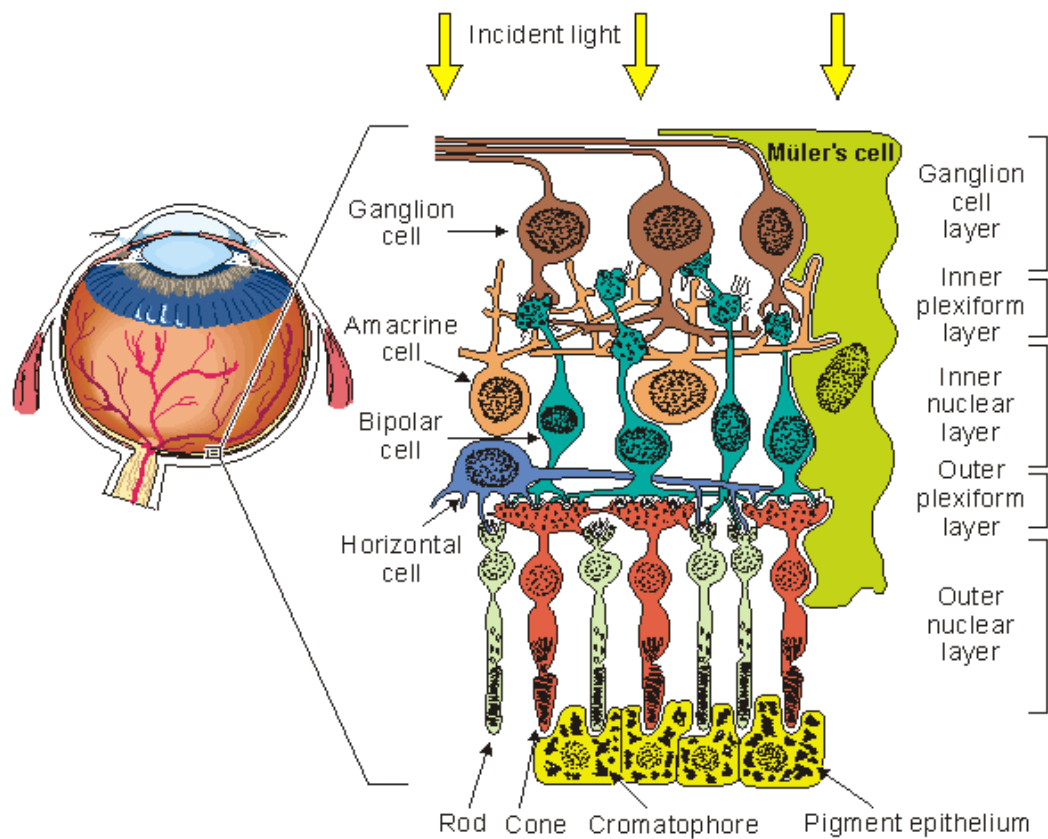


Figura 3. Struttura della circuiteria retinica Tratta da *Bioelectromagnetism: Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields*. 1995.

Al di sotto dell'epitelio pigmentato retinico (RPE) si trovano infatti i cinque strati che compongono la struttura della retina: tre strati nucleari, contenenti i somi dei neuroni, intervallati da due strati plessiformi, in cui tali neuroni sinaptano (Kolb, 1991). Il "foglietto" più prossimo al RPE è lo strato nucleare esterno (ONL). In esso risiedono i corpi cellulari di coni e bastoncelli e la sua funzione principale è convertire l'energia luminosa, proiettata sui fotorecettori, in un segnale elettrochimico. Lo strato plessiforme esterno (OPL), invece, ospita le terminazioni sinaptiche dei fotorecettori ed i dendriti delle cellule bipolari. I corpi cellulari delle cellule bipolari, delle cellule orizzontali, delle cellule amacrine e delle cellule di Müller si trovano nel sottostante strato nucleare interno (INL). A ridosso di esso si trova lo strato plessiforme interno (IPL) che contiene le sinapsi tra i neuriti delle cellule bipolari ed i dendriti delle cellule ganglionari ed amacrine. Infine, nello strato più interno (GCL) risiedono i corpi cellulari delle cellule ganglionari, i cui assoni formano le fibre del nervo ottico. Queste, attraverso il disco ottico, lasciano la cavità oculare e proiettano verso la corteccia visiva. (Gabriel, 2013).

La retina possiede anche una componente gliale rappresentata in larga parte da astrociti e cellule di Müller. Gli astrociti rivestono gli assoni delle cellule ganglionari ed i vasi in prossimità del nervo ottico, mentre le cellule di Müller hanno i somi nell'INL e prolungamenti che si estendono per tutto lo spessore della retina. Le cellule di Müller sono decisamente le componenti più importanti della glia in quanto svolgono nella retina molte delle mansioni che astrociti, oligodendrociti e cellule ependimali ricoprono in altre regioni del SNC. Ad esempio sono in grado di modulare l'attività neuronale regolando la concentrazione extracellulare di sostanze neuroattive come K^+ , H^+ , glutammato e GABA. Questo permette di instaurare una comunicazione bidirezionale con i neuroni retinici che rivela il loro ruolo attivo nel mantenimento della funzionalità della retina (Newman et al., 1996) e lascia ipotizzare un coinvolgimento nel mantenimento dell'omeostasi tissutale (Nakahara et al., 2013, Kern, 2014). Le cellule di Müller svolgono, inoltre, altri rilevanti ruoli nell'ambito della fisiologia e del mantenimento della struttura retinica. Le giunzioni aderenti tra esse ed i segmenti interni dei fotorecettori formano la membrana limitante esterna (OLM), che separa i segmenti esterni dei recettori da quelli interni,

mentre gli astrociti ed i processi terminali delle cellule di Müller compongono la membrana limitante interna (ILM), che separa la retina dall'umor vitreo. Negli strati plessiformi, invece, contattano neuroni e cellule endoteliali dei vasi retinici controllando il rifornimento di substrati metabolici e regolando la formazione ed il mantenimento della barriera emato-retinica (BRB) (Reichenbach et al., 2007). La BRB, gli astrociti, i periciti, le cellule di Müller e la lamina basale formano un complesso funzionale chiamato unità neurovascolare (NVU) (Klaassen et al., 2013) (Fig. 4). La NVU regola selettivamente il trasporto di molecole attraverso la BRB e, essendo formata da varie tipologie cellulari funzionalmente interconnesse, rappresenta un vero e proprio centro di controllo neuronale del flusso sanguigno che si esplica mediante il rilascio di sostanze vasoattive.

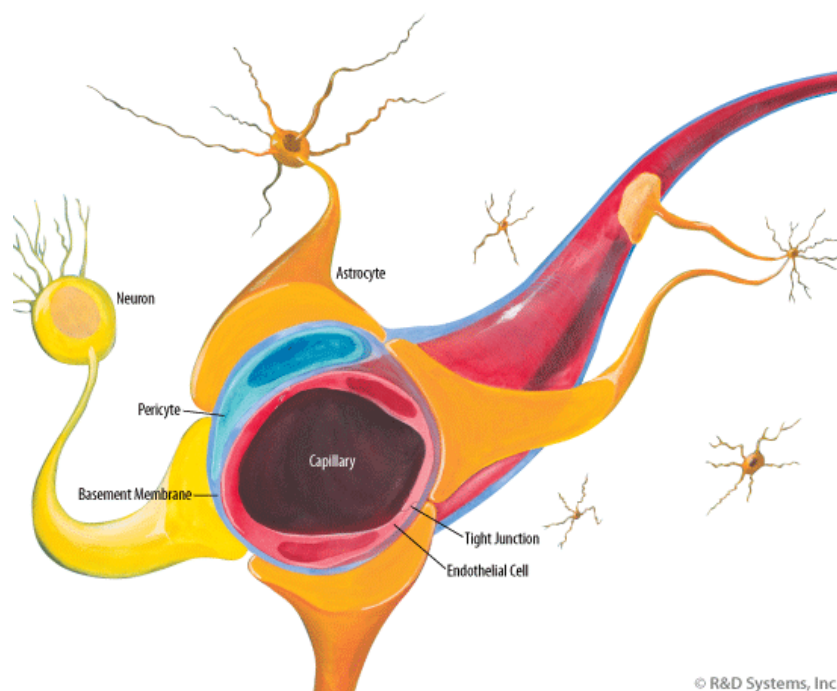


Figura 4. Unità neurovascolare (NVU). Tratta da <https://rndsystems.com>.

1.1.3 Funzione della retina

La retina è un tessuto di natura nervosa specializzato per la visione, in grado di convertire la luce visibile in segnali neuronali percepiti dal cervello (Shin, 2014). Sebbene rappresenti la porzione sensoriale dell'apparato visivo non si limita solamente alla ricezione degli impulsi luminosi ma ne opera una prima elaborazione attraverso la rigorosa organizzazione della propria circuiteria interna. La luce, proiettata sulla retina a livello della fovea grazie al sistema di lenti regolabili, colpisce i segmenti esterni dei fotorecettori. Si instaura un flusso di informazioni che parte da essi e si dirige verso le cellule bipolari e da queste fino alle cellule ganglionari, i cui assoni formano il nervo ottico. Questo sistema "verticale" glutammatergico rappresenta la principale circuiteria retinica. Esistono anche altre due vie "orizzontali", delineate dalle cellule orizzontali e da quelle amacrine, che hanno funzione prettamente modulatoria sulla via principale (Purves et al., 2001). I fotorecettori, ovvero coni e bastoncelli, sono gli elementi chiave del processo di fototrasduzione. Non sono equamente distribuiti sulla superficie della retina e per questa ragione in essa si distinguono una regione centrale rappresentata dalla macula lutea, dalla fovea e dalla foveola (Cuenca et al., 2014), ad alta densità di coni e responsabile della percezione "fotopica", ed una porzione periferica, relativamente più ricca in bastoncelli e deputata alla visione "scotopica". I fotorecettori mediano la trasduzione degli stimoli luminosi in segnali nervosi tramite un meccanismo molecolare innescato dal cambiamento conformazionale di un pigmento fotosensibile di natura lipoproteica, la rodopsina, situato principalmente nei dischi dei bastoncelli.

1.1.4. Vascolarizzazione della retina

Per far fronte alle sue elevate richieste metaboliche ed energetiche (Saari, 1987; Buttery et al., 1991) la retina dei mammiferi possiede due fonti di approvvigionamento ematico: l'arteria centrale retinica ed i vasi della coroide. Proprio in funzione di questa doppia rete vascolare si distinguono due porzioni definite come “retina esterna” e “retina interna”. La coroide apporta il maggior flusso di sangue (65-85%) ed è vitale per il mantenimento della porzione esterna (in particolare dei fotorecettori) mentre il restante 15-35% è a carico dell'arteria retinica centrale, che si irraggia dalla base del nervo ottico approfondendosi negli strati interni (Kur et al., 2012; Henkind et al., 1979) (Fig. 5).

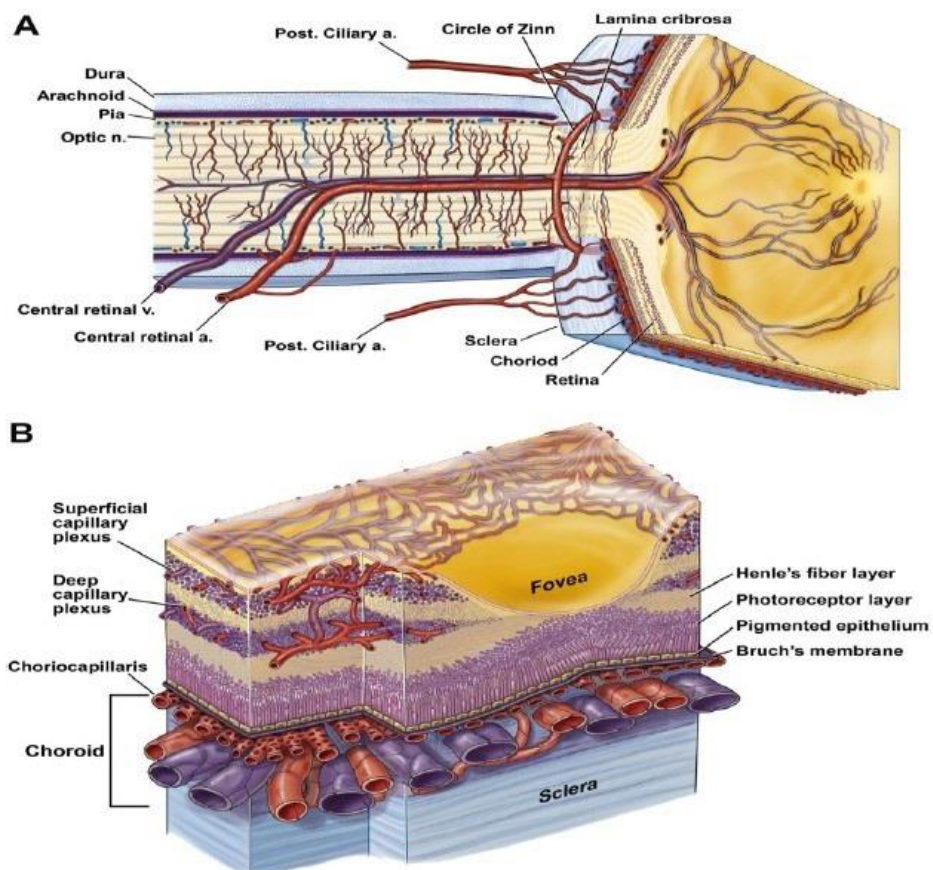


Figura 5. Struttura della doppia vascolarizzazione retinica. Tratta da Kur et al., 2012.

L'arteria retinica centrale entra nel bulbo oculare e si snoda in 4 rami principali dalle cui diramazioni origina la circolazione intraretinica. Tale sistema vascolare è essenzialmente un network di tre strati di capillari organizzati in due "plessi": uno superficiale, costituito dai capillari radiali peripapillari ed i capillari interni, ed uno profondo, rappresentato dai capillari esterni. Lo strato superficiale va dall'IPL all'OPL mentre lo strato interno irrorà l'OPL e l'INL. Nonostante la diversa ripartizione anatomica gli elementi della rete sono invece funzionalmente interconnessi grazie alle anastomosi tra i capillari dei due plessi. Le arterie della coroide nascono dalle arterie ciliari posteriori. La circolazione coroidea consta di tre strati: uno esterno in posizione più sclerale, uno mediale ed uno interno più vicino alla membrana di Bruchs dell'epitelio pigmentato. Il sistema venoso fa invece capo alla vena retinica centrale (Kur et al., 2012).

1.1.5. La barriera emato-retinica (BRB)

La retina è un tessuto ad altissima richiesta metabolica, di conseguenza la sua funzione è strettamente correlata all'integrità della struttura vascolare. In quest'ottica risulta fondamentale la funzione della BRB che, oltre a sostenere strutturalmente il sistema vasale, regola selettivamente i flussi di ioni e macromolecole tra il lume capillare ed il parenchima retinico (Armulik et al., 2010). Nella BRB, formata dai capillari retinici defenestrati, si distingue un versante esterno (oBRB) ed uno interno (iBRB), rispettivamente rappresentati dalle tight junctions tra le cellule del RPE e tra le cellule dell'endotelio vasale (Kaur et al., 2008) (Fig. 6). Il mantenimento della BRB è dovuto principalmente all'attività delle cellule di Müller le quali, oltre ad un supporto strutturale, regolano il microambiente retinico mediante la modulazione dell'uptake dei nutrienti e dello smaltimento dei cataboliti (Tout et al., 1993; Distler et al., 1996). La rilevanza delle cellule di Müller è così marcata che ha portato recentemente ad ipotizzare che la loro disfunzionalità possa rientrare tra le possibili cause di edema maculare e retinopatie (Klaassen et al., 2013).

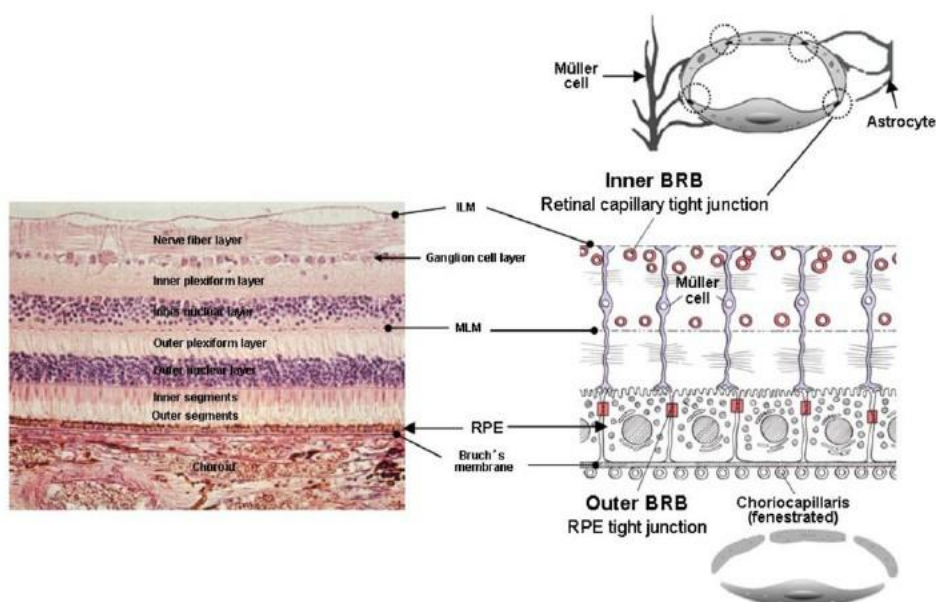


Figura 6. La barriera emato-retinica. Tratta da Kuno and Fuji, *Polymers*. 2011;3:193-221.

1.2. Le retinopatie proliferative

Le retinopatie proliferative (PRs) rappresentano un vasto gruppo di disturbi ed alterazioni a carico della retina. Sono caratterizzate principalmente dalla formazione di neovasi aberranti e da morte neuronale. Le PRs rappresentano le più importanti cause cecità, sebbene una disfunzionalità ad un qualsiasi livello del sistema visivo possa determinare la perdita della vista (Gabriel, 2013). Molteplici sono i meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi delle PRs ma tutti si basano su un modello comune, in cui l'elevata richiesta metabolica gioca un ruolo fondamentale. Situazioni di stress che compromettono la normale perfusione del tessuto determinano, infatti, un deficit di nutrienti ed ossigeno che espone la retina ad un elevato rischio degenerativo. È stato infatti dimostrato che lo sviluppo dello stato ischemico, responsabile della neoangiogenesi (Campochiaro, 2000) e della morte neuronale (Levin and Louhab, 1996; Barber, 2003), è un comune denominatore di tutte le forme di PRs. Inoltre, ulteriori studi hanno provato che l'apoptosi è legata principalmente alla formazione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) (Block and Schwarz 1997; Szabo et al., 1997) ed all'eccitotossicità del glutammato (Camacho and Massieu, 2006; Lipton, 1999; Osborne et al., 2004), mentre l'angiogenesi è indotta da un ingente rilascio di fattori di crescita e mediatori dell'infiammazione. Quest'ultimi attivano enzimi che degradano la matrice extracellulare (ECM) permettendo la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali (Afzal et al., 2007), le quali formano i nuovi vasi aberranti. Alcune evidenze hanno attribuito all'Hypoxia Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) un ruolo fondamentale nel meccanismo responsabile della proliferazione delle cellule endoteliali (Semenza, 2000; Maxwell and Ratcliffe, 2002). HIF-1 α induce il rilascio di vari fattori di crescita come il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), il Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) ed l' Epidermal Growth factor (EGF). Tra essi di particolare rilevanza è il VEGF, il cui signaling attiva molteplici pathways implicati nell'angiogenesi, nella sopravvivenza e nella migrazione cellulare. (Fig. 7)

Le principali PRs sono la degenerazione maculare senile (AMD), la retinopatia del prematuro (ROP) e la retinopatia diabetica (DR). Quest'ultima, considerata la sua

crescente incidenza e l'entità della diffusione del diabete su scala globale, occupa una posizione di particolare rilevanza che ha contribuito a renderla attualmente oggetto di numerosi studi.

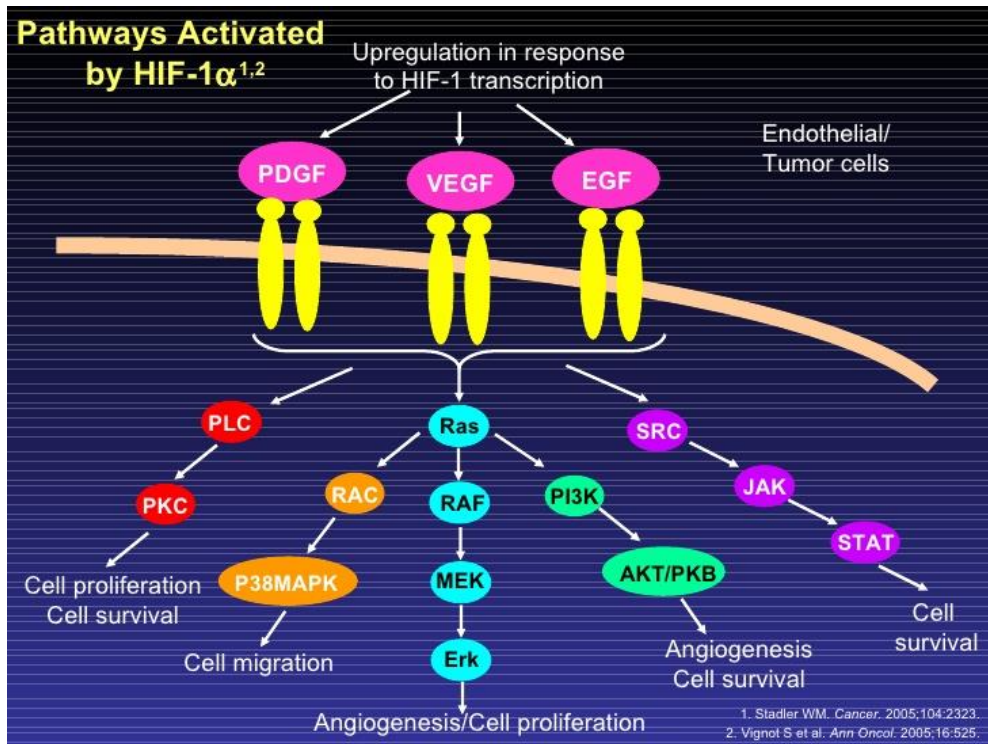


Figura 7. Pathways attivati da HIF-1 α . Tratta da <https://slideshare.net>.

1.2.1 La Retinopatia Diabetica

La retinopatia diabetica (DR), una delle principali complicanze del diabete mellito, è fra le più importanti cause di cecità nella popolazione in età lavorativa dei paesi sviluppati (Fong, 2004). Ha notevoli implicazioni economico-sanitarie (Rein et al., 2006) ed un impatto radicale sulla qualità della vita dei pazienti (Mazhar, 2011; Yu et al., 2013). L'incidenza della DR è raramente rilevata nei primi anni di conclamazione del diabete, ma aumenta al 50% dopo 10 anni e fino al 90% dopo 25. Studi recenti affermano che circa un terzo della totalità dei pazienti diabetici ha segni di DR ed un decimo è a forte rischio di svilupparla (Saaddine et al., 2008). Clinicamente è possibile classificare due forme di DR in base al livello di gravità raggiunto dalla patologia: uno stadio iniziale, o DR non proliferativa (NPDR), ed uno avanzato, o DR proliferativa (PDR) (Cheung et al., 2010). La NPDR è caratterizzata dalla presenza di microaneurismi, emorragie, essudati duri (Jeon et al., 2014), edema maculare (DME) ed anomalie microvascolari (Fig. 8).

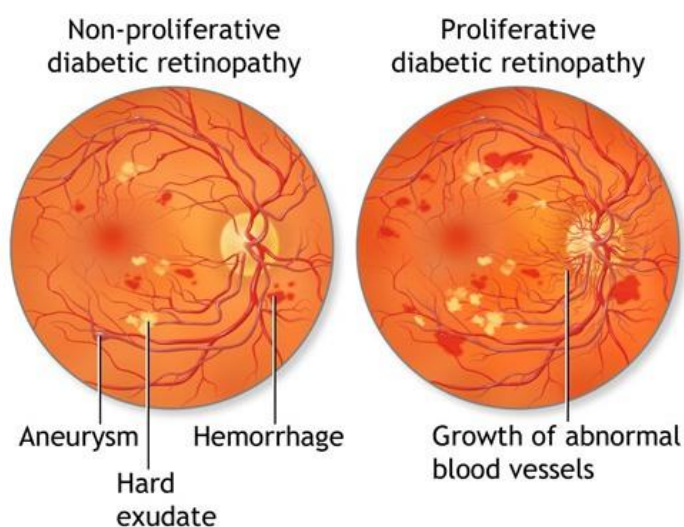


Figura 8. Alterazioni patologiche della NPDR (a sinistra) e della PDR (a destra). La NPDR è caratterizzata da microaneurismi, essudati duri, emorragie e DME. Il danno vascolare può progredire fino a determinare lo stadio più grave della malattia, la PDR, caratterizzata da una anormale vascolarizzazione con formazione di nevasi aberranti. Tratta da <https://maxivisioneyehospital.com>.

Ha un decorso generalmente lento e caratterizzato da tre stadi successivi: lieve, moderato e grave (detto anche pre-proliferativo) in cui si riscontra un incremento del danno vascolare evidenziato dalla presenza di “*cotton wool spots*” e “*venous loops*”. Se non curata, la forma iniziale può evolversi nella PDR, caratterizzata soprattutto da un’anormale neovascolarizzazione (Stitt et al., 2013). Importanti evidenze cliniche della presenza della PDR sono emorragie a livello sia dell’umor vitreo che della retina e, nei pazienti non trattati, il distacco della retina dovuto alla trazione esercitata dal tessuto fibrotico (Cheung et al., 2010).

Sebbene quest’ultimo evento determini la perdita irreversibile della capacità visiva, la singola causa più frequente di cecità tra i diabetici è, clinicamente, la DME (Cheung et al., 2010) che può verificarsi a qualsiasi stadio della DR. Le analisi morfologiche suggeriscono sia causata da un danno funzionale dell’endotelio vascolare retinico, dovuto ad un aumento della permeabilità indotto sia dalla down-regolazione delle proteine giunzionali, sia dall’apoptosi di cellule endoteliali. Le conseguenze di tali alterazioni sono l’accumulo di liquido nel parenchima retinico e nelle cellule Müller. La lisi di quest’ultime determina la formazione di sacche di liquido e detriti cellulari responsabili di edema nell’OPL, nell’INL e di cambiamenti analoghi nei neuroni adiacenti (Ascaso et al., 2014). Per tali motivi in passato si era soliti ritenere la DR soprattutto un disordine del microcircolo. Tuttavia questa visione d’insieme è stata radicalmente riconsiderata nel momento in cui è stato dimostrato che il danno neurale può precedere le anomalie vascolari e contribuire anche a determinarle. L’iperglicemia prolungata induce infatti una serie di cambiamenti biochimici responsabili della vasculopatia e della disfunzione neurale e gliale, che progrediscono però in modo temporalmente diverso. Le condizioni diabetiche influenzano il rilascio di un vastissimo numero di mediatori pro-infiammatori soprattutto da parte delle cellule endoteliali e di Müller (Mizutani et al., 1998). Tra essi i principali sono l’ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS), gli eicosanoidi, il tumor necrosis factor- α (TNF- α), l’interleuchina-1 β (IL-1 β) e le molecole di adesione intercellulare 1 (ICAM-1) (Kradny et al., 2005; Li et al., 2009; Du et al., 2013). Il processo infiammatorio che ne viene innescato influenza in modo sostanziale la manifestazione delle alterazioni vascolari, contribuendo al

deterioramento delle componenti della BRB ed alla morte neuronale. In virtù di ciò la DR e la DME oggi giorno vengono più correttamente definite malattie neurovascolari (Bandello et al., 2013). (Fig. 9).

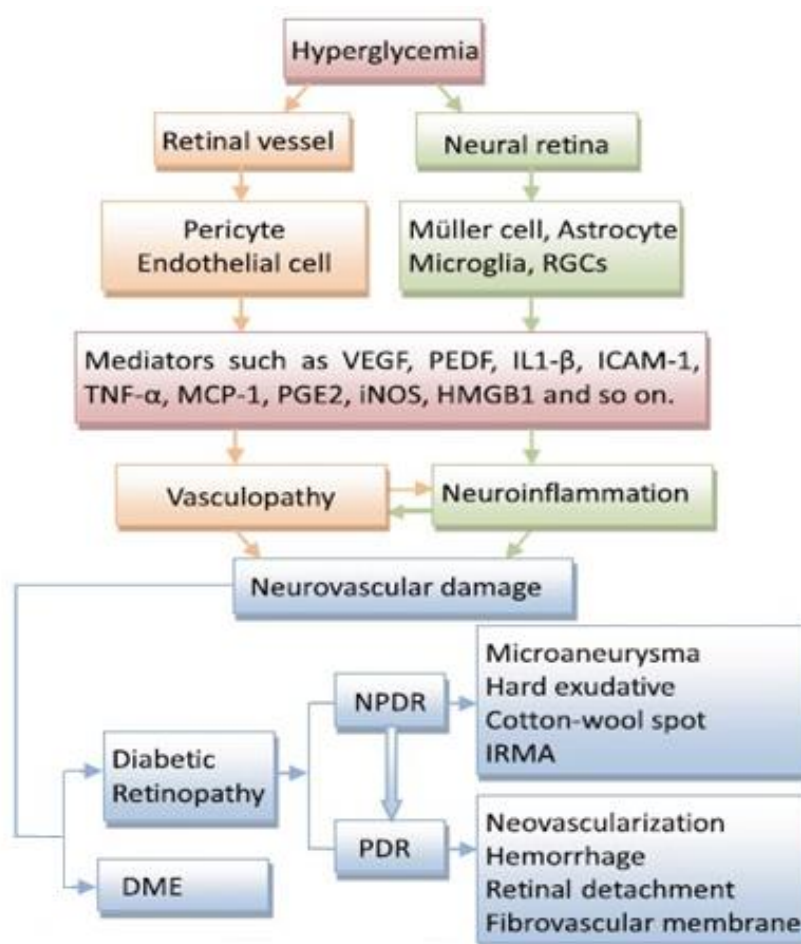


Figura 9. Caratteristiche clinico-patologiche della retina nel diabete. L'iperglicemia prolungata induce le alterazioni molecolari e cellulari responsabili del danno neurovascolare, causa della DR e della DME. Modificata da Yu et al., *Journal of Neuroinflammation*. 2015;12:141.

1.2.2 Alterazioni metaboliche nella patogenesi della DR

L'iperglicemia, squilibrio metabolico che definisce il diabete mellito, è il principale fattore causativo della patogenesi della DR. Le complicanze visive del diabete sono caratterizzate dall'accumulo di prodotti avanzati di glicazione (AGEs) nei vasi della circolazione retinica, da infiammazione, da danno neuronale e da stress ossidativo (Bhagat et al., 2009). Tra queste alterazioni, gli AGEs e lo stress ossidativo sono particolarmente implicati nella neurodegenerazione durante la DR (Fig. 10). Gli AGEs sono prodotti da reazioni non enzimatiche tra il glucosio in eccesso nel sangue ed i lipidi, i gruppi amminici delle proteine e gli acidi nucleici (Singh et al., 2001). Accumulandosi inducono il leakage della BRB influenzando la perdita delle tight junctions (Kim et al., 2010) e l'apoptosi degli elementi cellulari che controllano la proliferazione delle cellule endoteliali e la stabilità vascolare (Lecomte et al., 2004). È stato dimostrato in modelli sperimentali di diabete che i recettori specifici degli AGEs (RAGEs), insieme alla proteina acida fibrillare gliale (GFAP), sono up-regolati nelle cellule di Müller (Zong et al., 2010). La stimolazione delle cellule di Müller, per altro attivate anche da tutte le modificazioni patologiche della DR (Liu et al., 2014), provoca il rilascio di mediatori infiammatori, tra cui VEGF (Zong et al., 2010). Tale fattore di crescita viene rapidamente rilasciato anche dalle cellule endoteliali fin dalle prime fasi dell'angiogenesi. L'incremento dei livelli di VEGF è associato in modo causale alla perdita dell'integrità della BRB, responsabile dell'aumento della permeabilità e della disfunzione microvascolare. In particolare, VEGF provoca la perdita dell'integrità della BRB attivando la PKC- β , una chinasi che fosforila una proteina delle giunzioni strette, l'occludina, determinandone l'ubiquitinazione e la degradazione ad opera del proteasoma. (Murakami et al., 2012).

La retina diabetica è inoltre caratterizzata da elevati livelli di ROS, la cui fonte principale è rappresentata dai fotorecettori. Lo stress ossidativo può provocare la modificazione strutturale di proteine, lipidi e DNA, inducendo disfunzioni a livello cellulare e tissutale. Inoltre è associato direttamente a tutti i disordini metabolici coinvolti nella disfunzione e nell'infiammazione neurovascolare (Li et al., 2010;

Zheng et al., 2009; Zheng et al., 2012). Recenti studi in ratti diabetici hanno dimostrato che una riduzione dei livelli di ROS determina un significativo decremento della degenerazione neuronale (Wang et al., 2011). Tuttavia il problema rappresentato dai ROS in una malattia cronica come la DR dipende molto dalla misura in cui lo stress ossidativo supera gli adattamenti fisiologici.

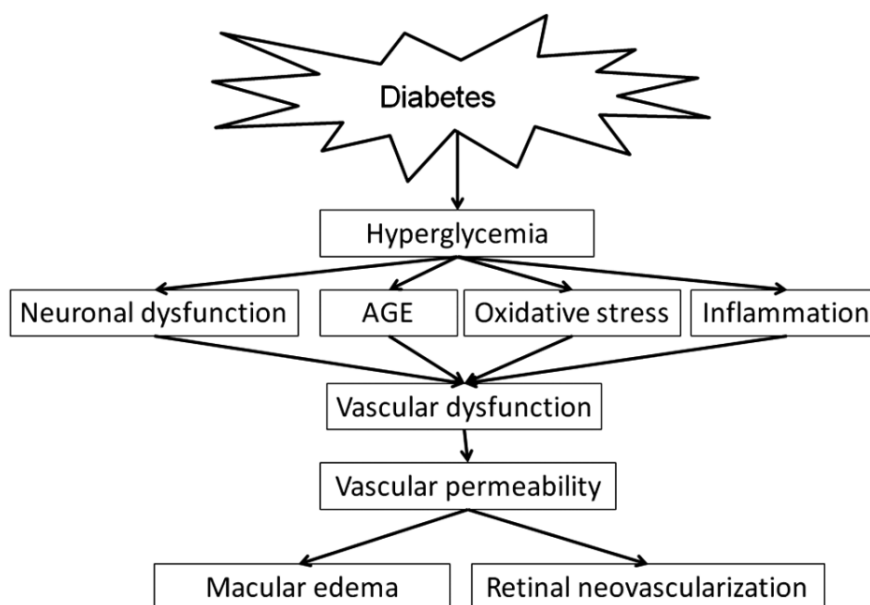


Figura 10. Schema della patofisiologia della retinopatia diabetica. L'iperglicemia provoca cambiamenti biochimici che causano disfunzione vascolare la quale determina DME e neovascolarizzazione. Tratta da Shin et al., *J Ophthalmic Vis Res* 2014; 9:362-373.

1.2.3 L'elettroretinografia

È ormai stato ampiamente dimostrato che la comparsa delle alterazioni vascolari tipiche delle manifestazioni cliniche della DR è preceduta dalla disfunzionalità neuronale. Tuttavia, dal momento del peggioramento della vista la patologia potrebbe già essere in uno stato significativamente avanzato. In tal senso, studi basati sulla misurazione dell'attività elettrica delle cellule fotosensibili della retina si sono rivelati un valido aiuto nella diagnosi precoce della malattia. Analisi di questo tipo sono infatti in grado di rivelare la presenza dei primi segni della compromissione funzionale della retina, come è stato dimostrato sia in modelli animali, sia nell'uomo (Li et al., 2002; Arden et al., 1986; Ghita et al., 2013). L'elettroretinografia è quindi molto utilizzata nello studio delle retinopatie proliferative (Akula et al., 2007). L'ERG è la rappresentazione dell'attività bioelettrica delle cellule fotosensibili della retina in risposta ad uno stimolo luminoso. Il tracciato elettroretinografico è rappresentato da un'onda complessa risultante dalla somma algebrica dei potenziali elettrici generati dalle diverse componenti neurali della retina (Fig. 11). Un normale elettroretinogramma è costituito da tre onde: "a" "b" e "c". La lettura del tracciato è immediata, ma richiede una corretta interpretazione. Il primo segnale, l'*early receptor potential* (ERP), è generato dall'azione della luce sui pigmenti fotosensibili dei fotorecettori ed è rappresentato da una deflazione positiva seguita da una deflessione negativa. Ad esso segue temporalmente il *late receptor potential* (LRP), che costituisce la componente principale dell'onda a. È possibile distinguere un'onda a precoce (a1), generata dai coni e registrabile in condizioni fotopiche, ed un'onda a tardiva (a2), generata dai bastoncelli e registrabile in condizioni scotopiche. L'onda b viene originata invece dall'attività delle cellule retiniche poste postsinapticamente rispetto ai fotorecettori. L'esatta fonte dell'onda b non è ancora del tutto chiara, tuttavia sembra che il contributo maggiore sia fornito dall'attività delle cellule bipolari (Green et al., 1999). Un contributo all'onda b è inoltre fornito dalle cellule amacrine e ganglionari (Dong and Hare, 2000). Infine, l'onda c è generata dal RPE. L'ERG può inoltre avere caratteristiche diverse in base all'intensità della stimolazione luminosa o al fatto che sia eseguita dopo

l'adattamento alla luce (fotopico) o dopo l'adattamento al buio (scotopico). In questo modo è possibile evidenziare selettivamente l'attività elettrica di coni o bastoncelli. L'interpretazione clinica dell'ERG si basa sullo studio delle modificazioni delle sole onde a e b. Un deficit della funzione visiva è solitamente accompagnato, infatti, da una variazione della loro ampiezza. Ciò fornisce le prove della presenza di un danno neuronale e può suggerire un approccio terapeutico in grado di prevenire il raggiungimento della fase proliferativa e scongiurare le perdite irreversibili della vista.

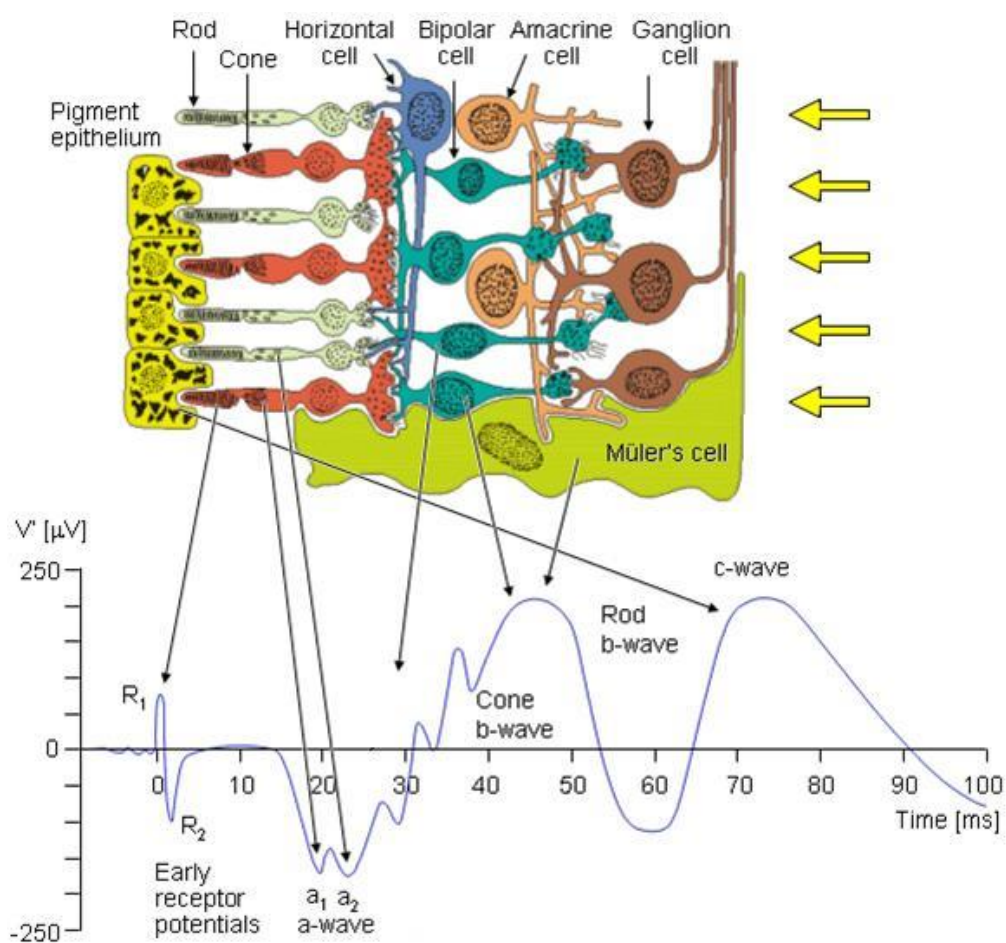


Figura 11. Le cellule della retina e relative risposte elettriche ad uno stimolo luminoso. Modificata da *Bioelectromagnetism: Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields*. 1995.

1.2.4 Terapie attualmente in uso nel trattamento della DR

Nel trattamento della DR vengono utilizzati di solito due approcci differenti: uno chirurgico ed uno farmacologico. Per i pazienti con alto rischio di PDR la terapia chirurgica standard rimane la fotocoagulazione laser, operata nel tentativo di fermare la neovascolarizzazione e prevenire le emorragie retiniche. Questo tipo di approccio ha anche la possibilità di rallentare la progressione della retinopatia e la conseguente perdita della vista anche in pazienti a basso rischio di PDR e/o con gravi NPDR. Tuttavia gli effetti collaterali, come la perdita della visione periferica e scotopica, spesso tendono a far riconsiderare i benefici dell'intervento (Aiello et al., 1998; Fong et al., 2007). Il trattamento laser certamente non consente di ripristinare la visione già persa ma, considerato il danno causato dall'avanzamento della malattia, è comunque molto utilizzato. Negli stadi avanzati, in cui non è raccomandato e/o è insufficiente, la vitrectomia rappresenta l'opzione migliore per affrontare le emorragie, oltre che per correggere il distacco della retina e le cicatrici. La chirurgia del vitreo ha dimostrato di essere una terapia utile sia nelle forme avanzate di PDR che nelle DME (Gupta et al., 2012; Jahn et al., 2004), determinando un drastico miglioramento della qualità della vita (Yu et al., 2013).

Gli approcci farmacologici maggiormente utilizzati sono mirati a ridurre i livelli di VEGF, a causa della sua influenza sulla permeabilità vascolare e sulla proliferazione delle cellule endoteliali (Das , 2014). Iniezioni di farmaci anti-VEGF hanno sempre dimostrato la riduzione della vascolarizzazione e studi comparativi ne suggeriscono la maggiore efficacia rispetto alla fotocoagulazione laser, di per se molto rischiosa in pazienti con DME (Wang et al., 2012). Le terapie anti-VEGF per la gestione della PDR e della DME, attualmente molto utilizzate in clinica per via dei loro effetti benefici, sfruttano anticorpi, come il Ranibizumab (Lucentis®) e il Bevacizumab (Avastin®) (Martinez-Zapata et al., 2014; Fernando Arevalo , 2013), contro isoforme di VEGF. Tuttavia il VEGF ha anche azione neurotrofica e neuroprotettiva in molte situazioni di stress e questa sua doppia natura limita l'efficacia delle terapie anti-VEGF a disposizione dei pazienti. Per questo motivo le terapie anticorpali sono quelle utilizzate principalmente nel trattamento di DME, nonostante abbiano un tasso

di successo variabile del 30-50% (Nguyen et al., 2012; Fong and Lai, 2013). Inoltre, i pazienti diabetici possono essere a maggior rischio sia di complicanze oculari che sistemiche come malattie cardiovascolari e renali, suscettibilità alle infezioni, endoftalmite, distacco della retina ed emorragie intraoculari (Shikari et al., 2014; Falavarjani et al., 2013, Osaadon et al., 2014). Così, sebbene l'utilità della terapia anti-VEGF non possa essere contestata, le complicanze di questo trattamento non devono essere trascurate.

1.3. Il sistema uPA/uPAR

1.3.1 L'attivatore urochinasi del plasminogeno (uPA)

L'uPA è una proteasi a serina che taglia proteoliticamente ed attiva la forma zimogena della plasmina (Crippa, 2007). Quest'ultima è responsabile della lisi della fibrina e della degradazione, diretta o indiretta, di diverse componenti della matrice extracellulare (ECM) e delle membrane basali (Mignatti and Rifkin, 1993). Recentemente però è stata osservata una ulteriore funzione dell'uPA che prescinde dalla sua attività enzimatica. Secondo le attuali evidenze esistono infatti cascate di reazioni intracellulari innescate dal legame tra tale proteasi a serina ed il suo specifico recettore di membrana, l'uPAR. Questa duplice funzionalità dell'uPA dipende dalla sua particolare architettura molecolare, in cui il dominio catalitico è posto all'estremo C-terminale ed il dominio di legame per uPAR all'estremo N-terminale. Strutturalmente l'uPA consta di 3 domini funzionalmente diversi: partendo dall'estremo N-terminale troviamo il dominio ("EGF-like") GFD, che consente il legame con uPAR, successivamente il dominio "kringle", responsabile di interazioni con la matrice, ed infine il dominio catalitico. I pathways attivati dall'interazione tra uPA ed il suo recettore promuovono la crescita, la motilità, l'adesione cellulare e la trascrizione di specifici geni. Tutto ciò suggerisce fortemente una implicazione nelle trasformazioni neoplastiche, in cui tali vie di segnalazione sono quasi sempre alterate o disregolate. In effetti livelli significativamente più elevati di uPA ed uPAR sono stati ritrovati in cellule tumorali, contribuendo potenzialmente ad accrescerne le capacità metastatiche e fornendo anche un'attività proteolitica superficiale. Sulla base questi risultati si è iniziato quindi a cercare una possibile implicazione del sistema uPA/uPAR in patologie che condividono meccanismi analoghi alle trasformazioni neoplastiche, come ad esempio la neoangiogenesi, ed una interessante corrispondenza è stata trovata con le PRs.

1.3.2 L'uPAR: interazioni molecolari ed attività di membrana

L'uPAR è un recettore legato alla membrana plasmatica mediante una regione glicofosfatidil-inositolica (GPI). Questa “àncora” gli conferisce la capacità di scorrere liberamente lungo il bilayer fosfolipidico e di andare a posizionarsi a livello dei microdomini lipidici (o “rafts”), in cui vengono reclutate proteine diverse a seconda del momento funzionale della cellula. Così facendo l'uPAR focalizza in punti strategici del plasmalemma l'azione proteolitica del proprio ligando, l'uPA (Blasi et al., 2002). Tradizionalmente questa era l'unica funzione attribuita al recettore dell'urochinasi ma, come detto, si è scoperto che la stimolazione di uPAR regola svariati altri processi come l'adesione, la migrazione, la proliferazione cellulare (Ragno, 2006; Alfano et al., 2005) ed inibisce l'apoptosi (Alfano et al., 2006; Hasanuzzaman et al., 2006) indipendentemente dall'attività enzimatica dell'uPA. In tali processi l'uPAR gioca un ruolo chiave legando direttamente una proteina della ECM, la vitronectina (VN), e regolando, attraverso interazioni strutturali e funzionali, lo stato di attivazione delle integrine e l'adesione ad altri componenti dell'ECM, come il collagene (CG) e la fibronectina (FN). La migrazione e la proliferazione cellulare sono invece regolati tramite l'interazione con i recettori dell'N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLF), un peptide di origine batterica che funge da forte chemoattrattante per i leucociti (Montuori et al., 2005), e con i recettori di diversi fattori di crescita (Blasi et al., 2002; Ragno, 2006). Diversi studi hanno dimostrato la capacità dell'uPAR di associarsi alle integrine appartenenti alle famiglie $\alpha_5\beta_1$, β_2 e β_3 e che da tale interazione scaturiscono importanti conseguenze funzionali, che possono variare nei differenti tipi cellulari (Alfano et al., 2005; Alfano et al., 2006; Lester et al., 2007; Van der Pluijm et al., 2001). L'interazione uPAR-integrine attiva la via delle MAPK, in particolare le chinasi indotte dal segnale extracellulare (ERK 1/2). Tutto ciò è stato provato in esperimenti, condotti su cellule tumorali, in cui l'espressione di uPA o la distruzione dell'interazione uPAR-integrina $\alpha_5\beta_1$ inattivava la via di ERK (Aguirre-Ghiso et al., 1999), causando l'arresto del ciclo cellulare. Al contrario, la sovra-espressione di uPAR genera, attraverso le

integrine, un segnale mitogenico, dipendente dall'attivazione del pathway di ERK, con inibizione di p38 MAPK, che, invece, sopprime la crescita ed ha un effetto pro-apoptico (Chaurasia et al., 2009). Nella struttura dell'uPAR, dall'estremità N-terminale, si distinguono tre domini detti D1, D2 e D3 (Chapman, 1997). Il dominio D1 contiene il sito di legame ad alta affinità per il dominio GFD dell'uPA (Robbiati et al., 1990). I domini D2 e D3 aumentano l'affinità per il ligando specifico, probabilmente stabilizzando la struttura spaziale del D1. Sebbene la loro funzione non sia stata ancora chiarita, questi due domini sembrano coinvolti nel legame alla VN.

Differenti proteasi, tra cui la tripsina, la chimotripsina, l'elastasi, la catepsina G, la plasmina e l'uPA stessa possono tagliare l'uPAR nella regione "linker" tra i domini D1-D2 (Resnati et al., 1996). La scissione favorisce il rilascio del complesso uPA-D1, lasciando sulla superficie cellulare forme tronche di uPAR (c-uPAR). Queste, in base al sito di taglio, possono mostrare all'estremo N-terminale una sequenza particolare, la SRSRY, dotata di attività chemotattica ed ha effetto sulla polimerizzazione dell'actina e sulla migrazione cellulare (Resnati et al., 1996). La sequenza SRSRY media l'interazione funzionale dell'uPAR di membrana con gli FPR. Tuttavia anche l'uPAR intero può interagire con gli FPR; l'esposizione del dominio chemotattico avviene per un cambio conformazionale del recettore, dopo il legame dell'uPA (Ploug et al., 1994).

1.3.3 Il sistema uPA/uPAR e la neangiogenesi retinica

Il sistema uPA/uPAR gioca un ruolo molto importante nella risposta angiogenetica della retina. Uno studio in un modello murino di PR ha infatti dimostrato che uPAR è espresso dalle cellule endoteliali dei vasi retinici e i suoi livelli si up-regolano in concomitanza alla neovascolarizzazione patologica. Inoltre sia la delezione che l'inibizione di uPAR determina una drastica riduzione dell'angiogenesi (McGuire et al., 2003). In particolar modo uPAR è implicato nella prima fase dell'angiogenesi

VEGF-dipendente, andando a stimolare la degradazione della ECM e guidando la migrazione delle cellule endoteliali (Uhrin and Breuss, 2013; Binder et al., 2007). L'uPA converte il plasminogeno in plasmina, la quale attiva le metalloproteasi della matrice (MPP) che degradano la ECM e le giunzioni cellulari delle cellule endoteliali, destabilizzando la coesione della BRB con un conseguente aumento della permeabilità. In questo meccanismo il pathway coinvolto è quello della β -catenina. Essa è situata sul versante citoplasmatico della membrana e funge da ponte tra le VE caderine delle giunzioni aderenti e l' α -catenina, che è a sua volta connessa ai microfilamenti di actina del citoscheletro. Nelle cellule differenziate la β -catenina è anche presente in una forma solubile citosolica viene continuamente fosforilata dalla glicogeno sintasi chinasi $\beta 3$ (GSK $\beta 3$), consentendo la sua ubiquitinazione e degradazione da parte del proteasoma. In seguito a stimoli mitogeni (come, ad esempio, il signaling del VEGF) GSK $\beta 3$ viene fosforilata ed inattivata, la β -catenina non viene più degradata ed è libera di traslocare nel nucleo dove agisce da fattore trascrizionale attivando programmi genici coinvolti nella proliferazione e migrazione cellulare (switch delle caderine e perdita delle giunzioni strette) e up-regolando la trascrizione del gene codificante per uPAR; ciò determina un potenziamento delle alterazioni della permeabilità della BRB osservabili in condizioni diabetiche. In condizioni di alte concentrazioni di glucosio, tra l'altro, è stato osservato un aumento della fosforilazione di GSK3 β , con la promozione dei pathways di sopravvivenza e migrazione cellulare mediante l'incremento dell'attività trascrizionale della β -catenina. D'altra parte anche lo stress ossidativo, tipico della patogenesi della DR, contribuisce ad alimentare l'intero meccanismo. Infatti oltre a determinare un aumento della secrezione di VEGF, induce una maggiore espressione di uPAR, contribuendo alla riduzione dell'integrità della BRB.

Sulla base di queste evidenze recentemente sono stati sviluppati dei peptidi inibitori del sistema uPA/uPAR per testarne gli effetti sull'angiogenesi retinica. In un modello di DR indotto nel ratto è stato dimostrato che il blocco del sistema uPA/uPAR determina il miglioramento della BRB (Navaratna et al., 2008). Inoltre recentemente, in un modello murino di PR, è stato dimostrato che il blocco del sistema uPA/uPAR

con UPARANT, un nuovo inibitore, determina un miglioramento dell'angiogenesi e il ripristino della funzione visiva (Dal Monte et al., 2015) (Fig. 12).

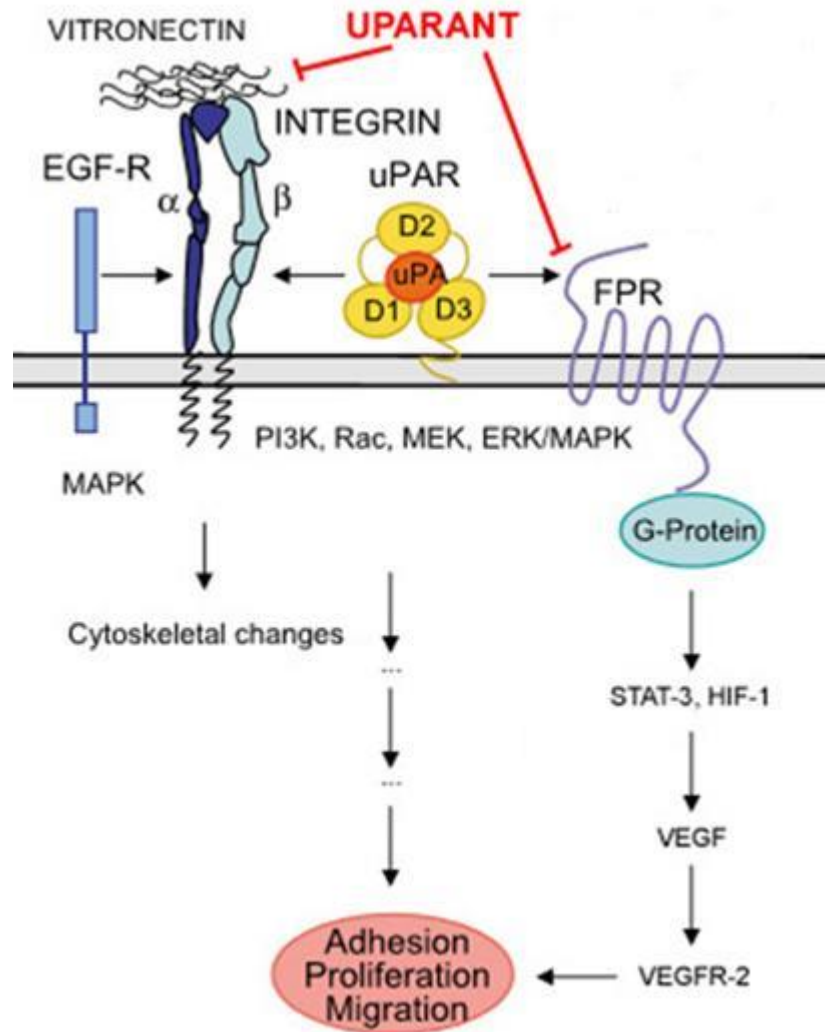


Figura 12. Influenza del signaling uPAR su adesione, proliferazione e migrazione cellulare. UPARANT blocca il sistema uPA/uPAR interferendo nel cross talk tra uPAR e FPRs.

CAPITOLO 2

Scopo della tesi

La diffusione in crescente aumento della DR e la ridotta efficacia delle cure attualmente a disposizione dei pazienti hanno spinto la ricerca verso lo sviluppo di nuovi farmaci ad azione più mirata che sostituissero le terapie classiche anti-VEGF. La scoperta delle implicazioni del sistema uPA/uPAR nella risposta angiogenica della retina ha fornito un nuovo target da utilizzare per lo sviluppo di nuovi farmaci. In particolare, il tetrapeptide UPARANT ha mostrato una forte potere inibitorio sulla migrazione delle cellule endoteliali, resistenza alla digestione enzimatica e alta stabilità plasmatica. Sia in *in vitro* che *in vivo* UPARANT ha dimostrato di poter bloccare il signaling uPAR-dipendente interferendo nel cross talk del complesso uPAR, FPRs ed integrine determinando un miglioramento della BRB (Carriero et al., 2014). L'obiettivo del presente studio è stato testare gli effetti di UPARANT in un modello di DR indotta nel ratto. A tale scopo sono stati valutati i livelli di espressione di VEGF, l'integrità della BRB e la neovascolarizzazione in ratti di controllo, diabetici e diabetici trattati con UPARANT. Inoltre, gli animali sono stati anche sottoposti a registrazioni elettroretinografiche per testare l'effetto del farmaco sulla funzionalità visiva.

CAPITOLO 3

Materiali e Metodi

3.1 Animali

Gli animali utilizzati sono stati ratti maschi Sprague Dawley di 8 settimane. Il loro utilizzo ha rispettato le linee guida relative al D.Lgs.vo 116/92 ed in particolare, riguardo all'art. 4, si accerta l'inevitabilità del ricorso ad esperimenti sugli animali. I ratti sono stati stabulati in ambiente con atmosfera controllata ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, $50 \pm 5\%$ di umidità), hanno avuto libero accesso ad acqua e cibo e sono stati sottoposti ad un ciclo circadiano artificiale luce-buio di 12ore (12 ore luce/ 12 ore buio). Tutti gli animali sono stati trattati secondo le norme dettate dal Comitato Etico Universitario Locale e secondo la direttiva della comunità europea 609/86. Il numero di cavie utilizzate per ottenere risultati attendibili nel presente studio è stato, inoltre, il minore possibile.

3.2 Induzione del diabete

Il diabete è stato indotto nei ratti Sprague Dawley tramite la somministrazione di streptozotocina (STZ), un farmaco con azione tossica sulle cellule β del pancreas che induce la forma insulino-dipendente del diabete. La STZ, dopo essere stata sciolta in un buffer citrato 0,03 M a pH 4,7, è stata iniettata intraperitonealmente alla dose 60 mg/Kg. I ratti di controllo hanno ricevuto un volume uguale di buffer. La glicemia è stata misurata dopo 72 ore ed i ratti sono stati divisi in due gruppi, controllo e STZ, considerando diabetici i ratti i cui livelli di glucosio ematici superavano i 250 mg/dl. Il peso e la glicemia sono stati controllati periodicamente una volta alla settimana per le successive settimane.

3.3 Trattamento farmacologico

Il farmaco utilizzato nel presente studio è il tetrapeptide (Ac-L-Arg-Aib-L-Arg-L-C α (Me)Phe-NH₂) UPARANT (Fig. 13). Per la somministrazione di UPARANT i ratti STZ sono stati divisi in due gruppi. Ad un gruppo è stata eseguita una iniezione intravitreale da 4 μ l (alla dose di 10 μ g/ μ l), all'altro una sottocutanea da 300 μ l (alla dose 6 μ g/ μ l). Il farmaco è stato sciolto in PB sterile. Le iniezioni intravitreali sono state eseguite utilizzando una microsiringa Hamilton (Nanofil Syringe, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA) nell'occhio sinistro degli animali, lasciando l'occhio destro come controllo.

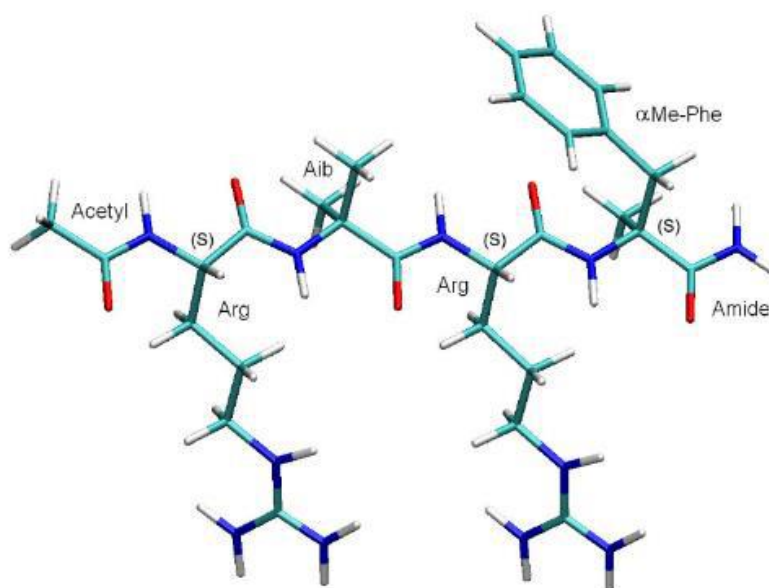


Figura 13. Struttura molecolare del tetrapeptide UPARANT.

3.4 Immunoistochimica

Per visualizzare i vasi retinici è stato utilizzato un anticorpo diretto contro CD31, antigene di membrana espresso dalle cellule endoteliali. Le retine sono state fissate per 1.5 h con paraformaldeide al 4 %, dopodiché sono state poste in soluzione al 25 % di saccarosio. Per l'analisi immunoistochimica le retine, dopo lavaggio in tampone fosfato 0.1M, sono state incubate per 72 h con l'anticorpo contro CD31 (1:50) in soluzione di Triton X allo 0,5% in tampone fosfato 0.1M. Dopo l'incubazione in primario le retine sono state lavate in tampone fosfato 0.1M ed incubate per 48 h con anticorpo secondario coniugato all'Alexa Fluo 488 (1: 200). Dopo i lavaggi dal secondario le retine sono state montate su vetrino e coperte con glicerolo. Le immagini immunofluorescenti sono state visualizzate attraverso un microscopio a fluorescenza (Eclipse E800, Nikon) ed acquisite mediante videocamera. Le immagini elettroniche sono state processate per contrasto e luminosità utilizzando un software per immagini, Adobe Photoshop CS3.

3.5 Valutazione della barriera emato-retinica

La funzionalità della barriera emato-retinica è stata valutata qualitativamente utilizzando il colorante Evans Blu. l'Evans Blu, disciolto in soluzione fisiologica (30 mg/ml), è stato iniettato nel ventricolo sinistro e lasciato circolare per almeno 5 minuti. Dopodiché, gli occhi sono stati enucleati, la retina estratta e montata su vetrino. Le immagini sono state visualizzate mediante microscopio a fluorescenza. Le immagini elettroniche sono state processate utilizzando Adobe Photoshop CS3.

3.6 Registrazioni elettroretinografiche

La funzionalità retinica è stata valutata attraverso registrazioni elettroretinografiche. Prima delle registrazioni, i ratti sono stati adattati al buio per circa 16 ore. Nella fase successiva sono stati anestetizzati con Nembutal (30 mg/Kg), mantenendo le pupille dilatate con Atropina (0.5%) e la temperatura dell'animale a 38 °C. I segnali elettrofisiologici sono stati registrati attraverso elettrodi di argento clorurati inseriti sotto la palpebra. L'elettrodo di riferimento per ogni occhio è stato inserito sottocute a livello della corrispondente zona frontale. L'elettrodo di terra è stato posto sottocute nella zona caudale. Le risposte sono state evocate da flash di luce di intensità da -3.4 a 1 log cd-s/m² generati da uno stimolatore Ganzfeld (Biomedica Mangoni, Pisa). I segnali sono stati amplificati e visualizzati su apposito programma. Le risposte ERG sono state principalmente esaminate per l'ampiezza delle varie onde. L'ampiezza dell'onda a è stata misurata a circa 8 ms dall'inizio dello stimolo per non avere contaminazione da altri elementi (Robson et al., 2003). L'ampiezza dell'onda b è stata calcolata dal picco dell'onda a fino al picco dell'onda b.

3.7 Real Time RT-PCR

Per valutare l'espressione di VEGF è stato misurato quantitativamente il suo messaggero tramite Real Time RT-PCR. Gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando il SYBR Green PCR Kit (Qiagen). L'efficienza dell'amplificazione è stata vicina al 100% per i primers utilizzati (Opticon Monitor 3 software; Bio-Rad Laboratories). I livelli di VEGF sono stati valutati usando la β -actina come gene housekeeping. Il gene target e la β -actina sono stati fatti correre contemporaneamente ed i campioni sono stati comparati usando il relativo ciclo soglia. L'analisi è stata eseguita tre volte. I dati ottenuti sono stati plottati come media \pm SEM.

3.8 Analisi dei dati

L'analisi statistica è stata eseguita mediante test ANOVA ed il post test di Newman-Keuls utilizzando il software Prism 4 (Prism 4; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). $P < 0.05$ è stato considerato significativo. I risultati sono espressi come media \pm SEM.

CAPITOLO 4

Risultati

4.1. Validazione del modello diabetico

Dopo il trattamento con STZ sono state eseguite misurazioni settimanali di peso e glicemia. I dati ottenuti si sono dimostrati in accordo con la letteratura: il peso degli animali di controllo è aumentato costantemente rispettando la normale curva di crescita, mentre quello degli animali del gruppo STZ è rimasto relativamente costante (Fig. 14A). I valori della glicemia, al contrario, sono aumentati di circa 4 volte nel gruppo STZ rispetto al controllo (Fig. 14B).

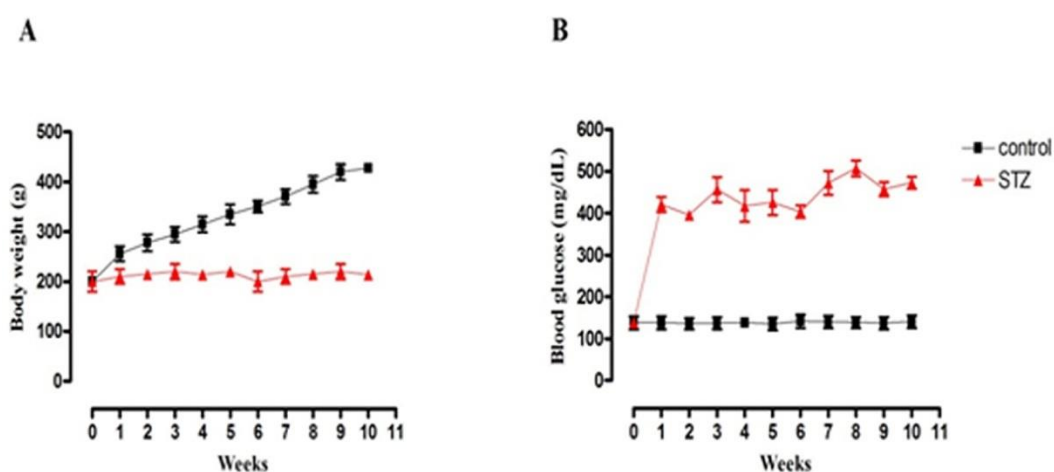


Figura 14. Grafici relativi all'andamento dei valori di peso (A) e glicemia (B) in ratti di controllo e in ratti trattati con STZ durante l'intervallo di tempo in cui è stato effettuato lo studio.

Per valutare l'insorgenza delle complicazioni oculari del diabete sono stati sacrificati 2 animali a settimana a partire dalla quinta settimana. In accordo con i dati in letteratura, già alla quinta settimana dopo induzione del diabete le retine dei ratti STZ sono caratterizzate dalla fuoriuscita di proteine plasmatiche dal letto vascolare, rilevata dal colorante Evans Blu, che testimonia l'incremento della permeabilità della BRB (Fig. 15).

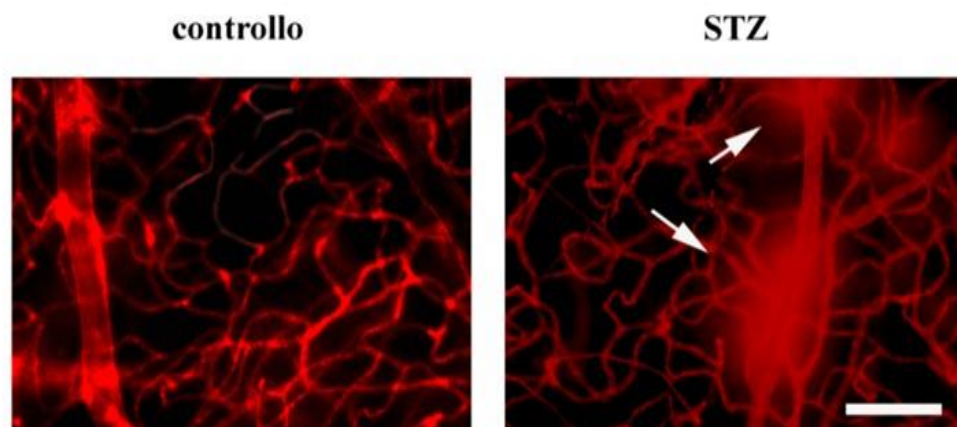


Figura 15. Valutazione qualitativa dell'integrità della BRB effettuata mediante perfusione con Evans Blu in retine di ratti di controllo e ratti trattati con STZ. Le frecce indicano gli stravasi di proteine plasmatiche dai vada retinici. Immagini acquisite tramite una videocamera collegata ad un microscopio a fluorescenza. Barra di calibrazione 200 μ m.

Inoltre, come dimostrato dalle registrazioni elettroretinografiche, i ratti STZ mostrano una ridotta funzionalità visiva. Infatti, come si può osservare dai tracciati e dai relativi istogrammi, l'ampiezza delle onde a e b è significativamente ridotta rispetto a quelle registrate nei ratti di controllo. (Fig. 16).

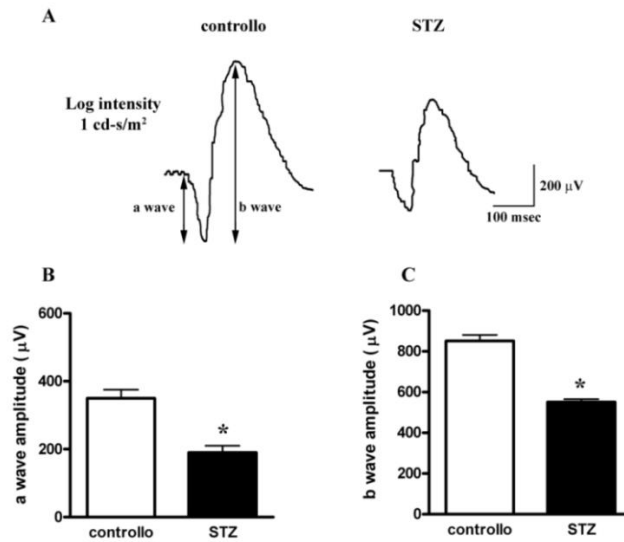


Figura 16. (A) Tracce rappresentative di registrazioni elettroretinografiche in ratti di controllo e in ratti trattati STZ effettuate ad una intensità di luce pari a 1 log cd-s m⁻². (B) Ampiezza dell'onda a e (C) dell'onda b. Le colonne indicano le ampiezze medie \pm SEM in ogni gruppo. *P<0.001 vs i rispettivi controlli.

Solo dopo l'ottava settimana dal trattamento con STZ, come si può osservare dalla figura 17, le retine dei ratti diabetici mostravano un' aumentata vascolarizzazione rispetto ai controlli.

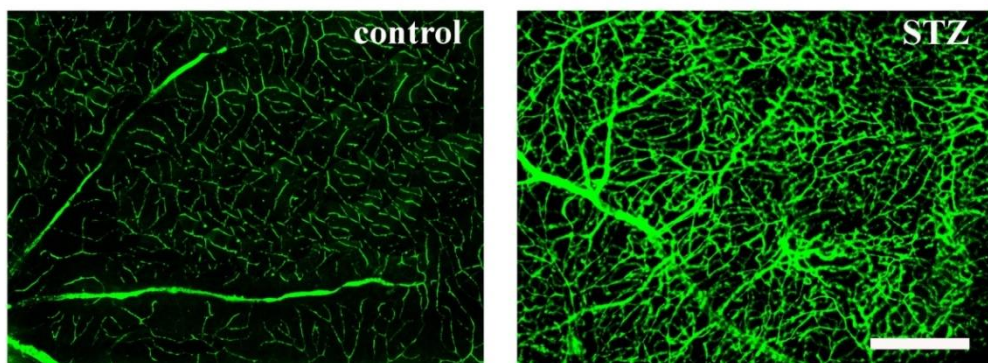


Figura 17. Immagini rappresentative di aree retiniche in ratti di controllo ed in ratti trattati con STZ. La vascolarizzazione retinica è stata visualizzata tramite immunofluorescenza utilizzando un anticorpo diretto contro CD31. Le immagini sono state acquisite tramite una videocamera collegata ad un microscopio a fluorescenza. Barra di calibrazione: 250 μ m.

Una volta validato il modello sperimentale altri animali sono stati trattati con STZ e divisi in due gruppi, ognuno dei quali è stato trattato mediante una diversa somministrazione del farmaco. Ad un gruppo UPARANT è stato somministrato intravitrealmente (4 μ l alla dose 10 mg/ml) mediante un'unica iniezione settimanale, dalla sesta settimana dall'induzione del diabete fino alla nona.

Al secondo gruppo il farmaco è stato somministrato per via sottocutanea (300 μ l alla dose 6mg/ml) mediante una singola iniezione giornaliera, nel periodo tra la nona e la decima settimana (Fig. 18).

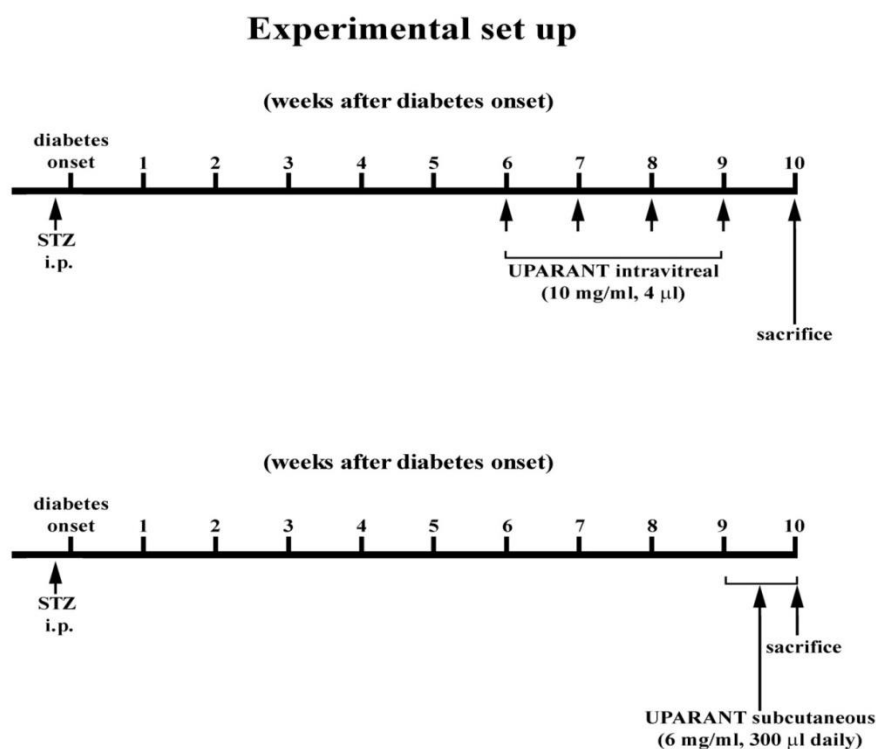


Figura 18. Protocollo sperimentale per il trattamento di ratti diabetici con UPARANT mediante somministrazione intravitreale (6 mg/ml, 4 μ l) e sottocutanea (10 mg/ml, 4 μ l).

Alla decima settimana i ratti di entrambi i gruppi sono stati sacrificati per la valutazione dell'integrità della BRB, dei livelli di VEGF e della neoangiogenesi proliferativa. Prima di essere sacrificati, alcuni ratti di ogni gruppo sono stati sottoposti a registrazione elettroretinografica.

4.2 Effetto di UPARANT sui livelli di VEGF

Nel presente studio sono stati misurati quantitativamente, tramite Real time RT-PCR, i livelli di mRNA del VEGF in ratti di controllo, ratti STZ e in ratti STZ il trattati con UPARANT (Fig 19). In accordo con la letteratura (Wang et al., 2010; El-Remessy et al., 2013), le retine di ratti trattati con STZ mostrano un significativo aumento dei livelli del messaggero del VEGF. Come mostrato in figura 21, il trattamento con UPARANT, sia intravitreale che sottocutaneo, riduce significativamente l'espressione genica di VEGF seppur i livelli di messaggero rimangono maggiori rispetto ai valori di controllo.

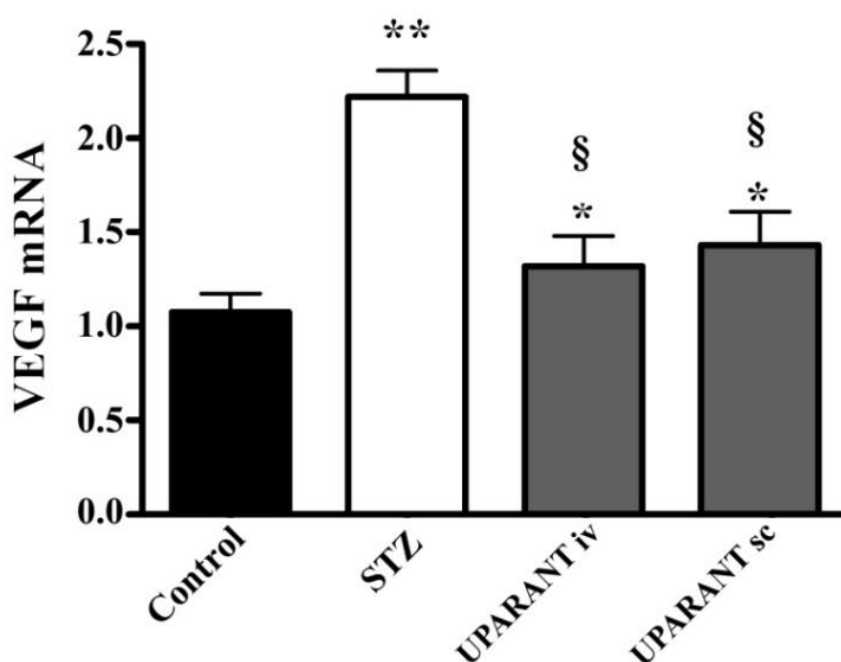


Figura 19. Livelli di VEGF in retine di ratti di controllo, trattati con STZ e trattati con STZ in cui UPARANT è stato somministrato per via intravitreale (iv) o sottocutanea (sc). I livelli di VEGF sono stati valutati mediante real time RT-PCR usando la β -actina come housekeeping gene. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs controllo. § $P < 0.001$ vs STZ.

4.3 Effetto di UPARANT sulla neovascolarizzazione retinica

Gli effetti della somministrazione di UPARANT sulla vascolarizzazione retinica sono stati valutati confrontando immagini di retine immunomarcate per CD31 nelle varie condizioni sperimentali. Le retine STZ mostrano una maggiore vascolarizzazione rispetto ai controlli (Fig. 20A-B). Le retine di ratti trattati per via intravitreale e sottocutanea con UPARANT (Fig 20C e 20D), invece, sono caratterizzate da una significativa riduzione della vascolarizzazione.

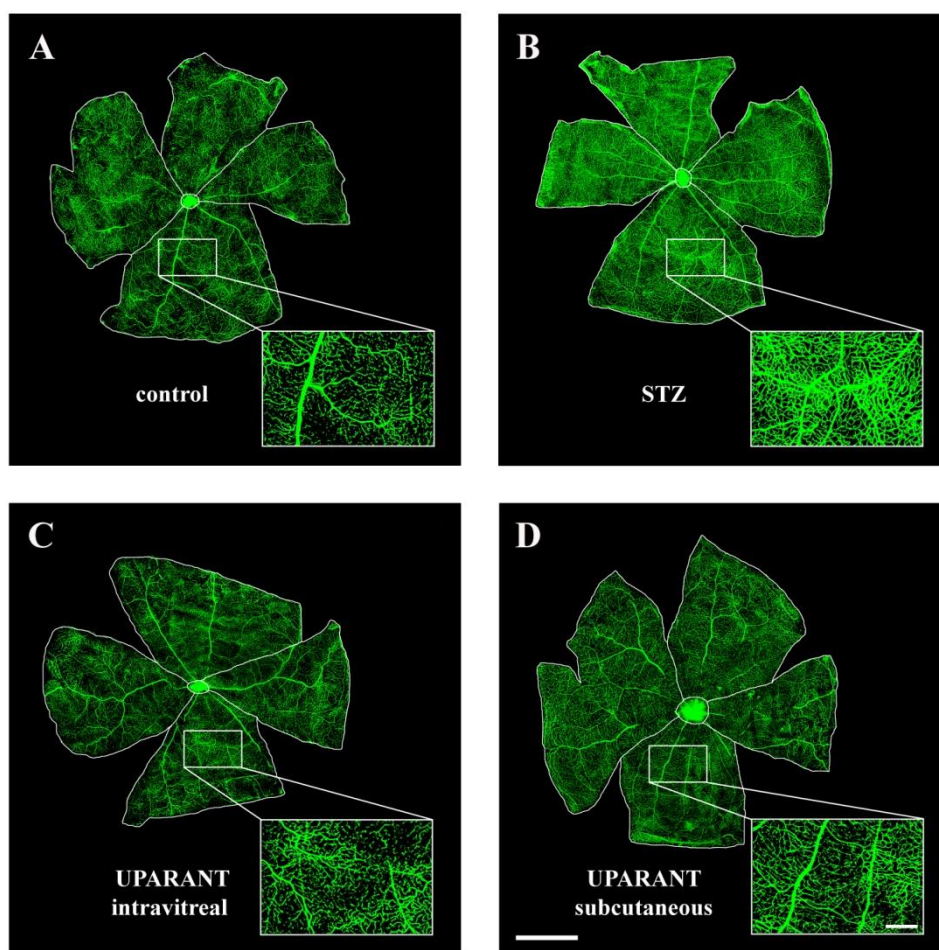


Figura 20. Immagini rappresentative di retine di ratti di controllo (A), trattati con STZ (B) e trattati con STZ a cui UPARANT è stato somministrato per via intravitreale (C) o sottocutanea (D). La vascolarizzazione retinica è stata visualizzata tramite immunofluorescenza utilizzando un anticorpo diretto contro CD31. Le immagini sono state acquisite tramite una videocamera collegata ad un microscopio a fluorescenza. Barre di calibrazione: 2 mm; 400 μ m.

La significatività della riduzione dei vasi retinici è confermata anche dalla relativa analisi quantitativa dei livelli di grigio (Fig 21). Tuttavia la il numero dei vasi nelle retine trattate con UPARANT rimane comunque superiore rispetto ai controlli. Anche in questo caso, come riscontrato per il decremento dei livelli dei VEGF mRNA, entrambi i metodi di somministrazione hanno avuto il medesimo effetto.

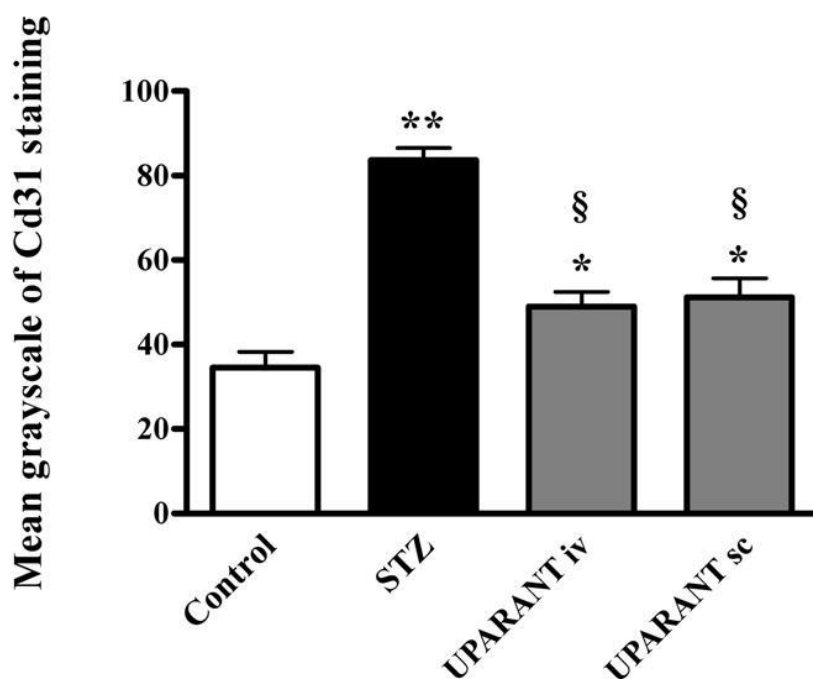


Figura 21. Analisi quantitativa dei livelli di grigio relativa alla densità dei vasi nelle retine di ratti di controllo, trattati con STZ e trattati con STZ a cui UPARANT è stato somministrato per via intravitreale e sottocutanea. Le colonne indicano il livello medio di grigio \pm SEM in ogni gruppo. N=5 per condizione. *P<0.05, **P<0.001 vs controllo. §P<0.001 vs STZ.

4.4 Effetto di UPARANT sull'integrità della BRB

L'effetto di UPARANT sul leakage della BRB è stato valutato mediante perfusione con Evans Blu in ratti di controllo, STZ e trattati con UPARANT. Come si può osservare in Figura 22, le retine dei ratti STZ mostrano una disfunzione della BRB, evidenziata dalla fuoriuscita di proteine plasmatiche dal lume vasale. Lo stravasamento nel parenchima retinico è invece assente nelle retine di ratti diabetici trattati con UPARANT sia intravitrealmente che sottocute, confermando l'efficacia del farmaco nel ripristinare drasticamente l'integrità della barriera.

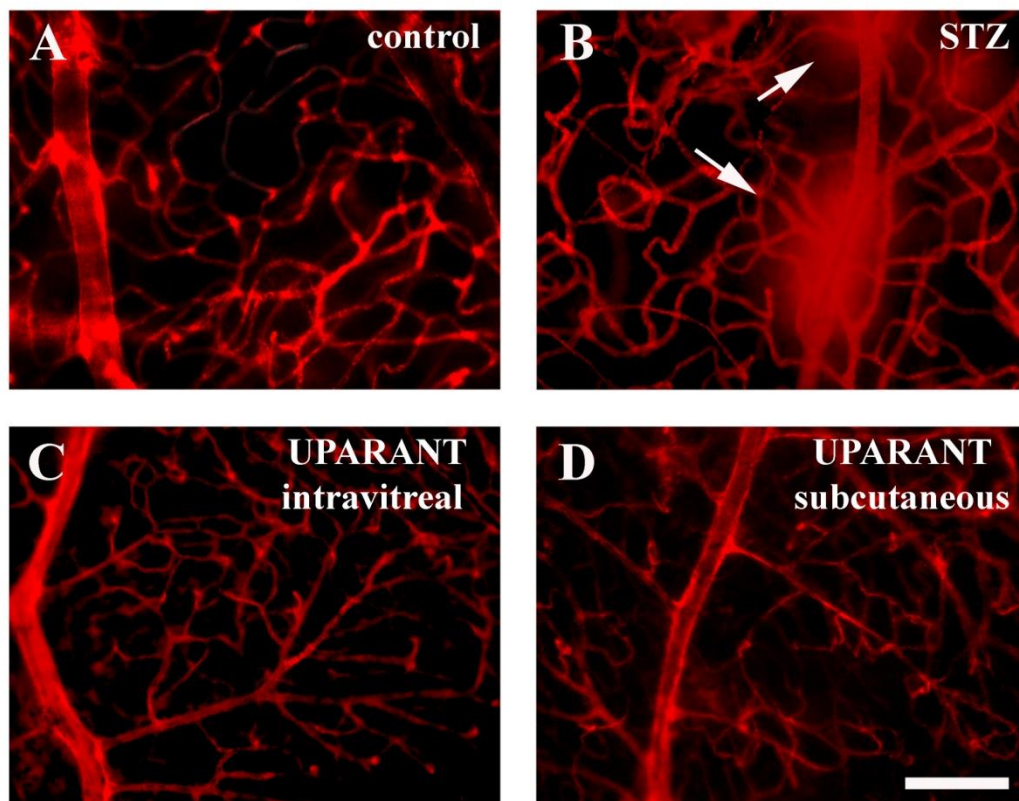


Figura 22. Valutazione qualitativa della permeabilità della BRB effettuata mediante perfusione con blu Evans blu in retine di ratti di controllo (A), trattati con STZ (B) e trattati con STZ in cui UPARANT è stato somministrato per via intravitreale (C) o sottocutanea (D). Le immagini sono state acquisite tramite una videocamera collegata ad un microscopio a fluorescenza. Le frecce indicano la fuoriuscita di proteine plasmatiche dai vasi. Barra di calibrazione 200 μm .

4.5 Effetto di UPARANT sulla funzione visiva

Gli effetti di UPARANT sulla funzione visiva sono stati valutati mediante registrazioni elettroretinografiche. In figura 23A, sono riportati tracciati rappresentativi delle onde a e b registrate in ratti di controllo, trattati con STZ in assenza od in presenza di UPARANT somministrato per via intravitreale o sottocutanea. In figura 23B e 23C, sono riportate le ampiezze medie delle onde a e b registrate ad una intensità di flash pari a $1 \log \text{ cd-s/m}^2$. Come già dimostrato, i ratti STZ mostrano una significativa riduzione delle onde elettroretinografiche rispetto ai ratti di controllo. Nei ratti trattati con STZ, il trattamento con UPARANT, sia intravitreale che sottocutaneo, determina un significativo aumento dell'ampiezza delle onde a e b, le quali recuperano valori simili a quelli registrati in ratti di controllo.

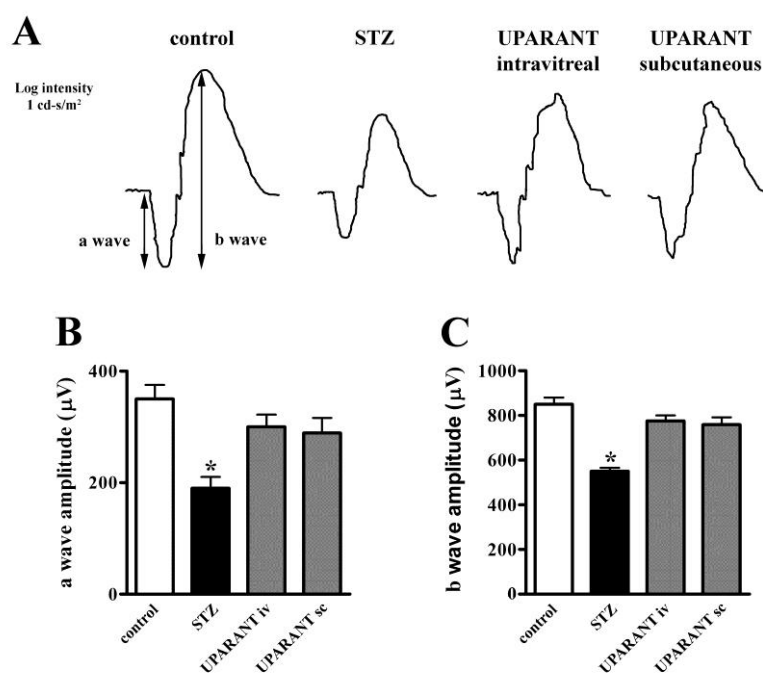


Figura 23. (A) Tracce rappresentative di registrazioni elettroretinografiche in ratti di controllo, trattati con STZ e trattati con STZ in cui UPARANT è stato somministrato per via intravitreale (iv) o sottocutanea (sc), effettuate ad una intensità di luce pari a $1 \log \text{ cd-s m}^{-2}$. (B) Ampiezza dell'onda a e (C) dell'onda b. Le colonne indicano le ampiezze medie \pm SEM in ogni gruppo. * $P < 0.001$ vs i rispettivi controlli.

CAPITOLO 5

Discussione

Le strategie terapeutiche correntemente in uso nel trattamento delle complicazioni oculari del diabete hanno una bassa efficienza ed espongono i pazienti ad un concreto rischio di effetti collaterali sistemici. Allo stesso modo l'incidenza in costante aumento e le ripercussioni socio-economiche hanno reso lo sviluppo di farmaci ad azione più mirata un obiettivo prioritario per la ricerca. La recente scoperta del ruolo svolto dal sistema uPA/uPAR nei meccanismi angiogenetici VEGF-dipendenti, indotti da condizioni ischemiche o ipossiche (Dal Monte et al., 2015; Das et al., 2004; McGuire et al., 2003), ha permesso di individuare un target molto promettente per i farmaci di nuova concezione. Rispetto ai tradizionali anticorpi ad azione anti-VEGF, il tetrapeptide UPARANT ha mostrato notevoli vantaggi in termini di stabilità plasmatica, resistenza alla digestione enzimatica e specificità d'azione, minimizzando il rischio di complicazioni sistemiche. Il presente studio, condotto con la finalità di verificare l'effetto di UPARANT in un modello animale di angiogenesi retinica indotta dalla condizione diabetica, conferma l'efficacia terapeutica del farmaco nel contesto esaminato ed il suo alto potenziale in prospettiva futura.

5.1 Effetti di UPARANT sulla neoangiogenesi proliferativa

I risultati in nostro possesso confermano le proprietà anti-angiogeniche di UPARANT riportate da studi precedenti in modelli murini di neoplasie e patologie neovascolari. Nel nostro modello la somministrazione per via sottocutanea ed intravitreale di UPARANT ha determinato il medesimo significativo decremento dei livelli di VEGF nelle retine di ratti diabetici. Tale dato sperimentale conferma il ruolo regolatorio di uPAR nell'espressione di VEGF ed è in accordo con quanto

osservato in studi su cellule di glioma, in cui l'inibizione dell'espressione o dell'attivazione di uPAR determina la down-regolazione di VEGF, che si ipotizza possa essere dovuta alla ridotta attivazione dei fattori di trascrizione come HIF-1 α (Malla et al., 2011; Nalabothula et al., 2007). Il trattamento con UPARANT riduce la neoavascolarizzazione retinica caratteristica della DR. Da quanto osservato il sistema uPA/uPAR si conferma il principale elemento regolatorio del meccanismo VEGF-dipendente che guida la migrazione delle cellule endoteliali indotta dai fattori di crescita. L'azione inibitoria di UPARANT sulla neovascolarizzazione patologica si esplica mediante la capacità di interferire nel cross talk tra uPAR, recettori FPR ed integrine determinando l'interruzione del signaling di VEGF, come dimostrato da studi recenti (Carriero et al., 2014). Alla luce delle conoscenze attuali e con i dati a nostra disposizione non è però possibile escludere una interazione diretta tra UPARANT e VEGF. L'azione inibitoria sull'attivazione delle integrine rende altresì ipotizzabile un'attività modulatoria del farmaco anche nei confronti di fattori trascrizionali coinvolti nei pathways che della risposta angiogenica. Infine, il blocco solo di una parte del signaling di VEGF suggerisce l'alta specificità d'azione di UPARANT (Carriero et al., 2014), esaltandone le potenzialità nell'ottica dello sviluppo di farmaci che minimizzino il rischio di effetti collaterali sistemici. Tuttavia la comprensione del meccanismo d'azione di UPARANT necessita di ulteriori studi.

5.2 Effetto di UPARANT sulla BRB

La scomparsa degli stravasi di albumina sierica dimostra la capacità di UPARANT di migliorare il leakage vascolare che caratterizza la DR. Dai risultati in nostro possesso ed in accordo con i dati in letteratura è possibile ipotizzare un ruolo del farmaco nel ripristino dei normali livelli di occludina, proteina dalla cui degradazione dipende largamente l'integrità della BRB. (Murakami et al., 2011; Tien et al., 2013) Questa ipotesi è anche suggerita dalla riduzione dei livelli di espressione di VEGF riscontrati nelle retine dei ratti STZ trattati con UPARANT. È ragionevole quindi pensare che il

farmaco, attraverso la riduzione dei livelli di VEGF, contrasti i meccanismi VEGF-dipendenti di fosforilazione dell'occludina, i quali determinano la sua ubiquitinazione e degradazione (Murakami et al., 2012). Allo stesso modo, l'azione antagonista di UPARANT nei confronti del leakage della BRB è in linea con la constatazione che l'up-regolazione del sistema uPA/uPAR sia la causa principale delle perdite vascolari, come dimostrato in modelli di DR (Navaratna et al., 2008; El-Remessy et al., 2013; El-Remessy et al., 2003). Non è comunque possibile escludere la possibilità che un meccanismo VEGF-indipendente possa mediare, almeno in parte, il miglioramento UPARANT-indotto dell'integrità della BRB, considerando che il sistema uPA/uPAR attiva direttamente le proteasi responsabili della degradazione della BRB (Navaratna et al., 2008; El-Remessy et al., 2013). Si riporta, infine, che il trattamento intravitreale e sottocutaneo hanno sortito lo stesso effetto senza differenze significativamente apprezzabili.

5.3 Effetto di UPARANT sulla funzionalità visiva

L'esito delle registrazioni elettroretinografiche condotte in questo studio permette di affermare che il trattamento sistemico e locale con UPARANT consente il medesimo recupero della funzionalità visiva, permettendo di formulare alcune ipotesi su alcuni dei meccanismi coinvolti.

Le PRs comprendono una serie di disfunzioni legate alla NVU (Feng et al., 2012). L'alterazione funzionale della NVU provoca quindi una situazione incompatibile con l'attività neuronale, come dimostra la riduzione dell'ampiezza delle onde a e b nei tracciati ERG in caso di deficit visivo (Harrison et al., 2011). Esistono infatti prove che i trattamenti che contrastano l'angiogenesi, migliorando la NVU, sono efficaci nel prevenire la perdita della vista (Martini et al., 2011; Dal Monte et al., 2012; Akula et al., 2010). Nel presente studio è stato dimostrato che la somministrazione di UPARANT determina un miglioramento dell'integrità della BRB, della

vascolarizzazione e un ripristino della funzionalità visiva. Questo suggerisce che UPARANT ha una azione neuroprotettiva, oltre che antiangiogenica.

La perdita irreversibile della vista rappresenta uno dei più importanti problemi clinici delle retinopatie proliferative ma la sua prevenzione ed il suo recupero sono limitate dalla scarsa disponibilità di farmaci in grado di ripristinare il deficit visivo. Il fatto che UPARANT, probabilmente come conseguenza del miglioramento vascolare e dello stato infiammatorio, determini un recupero della funzione ERG aggiunge ulteriore validità all'ipotesi di una sua eventuale applicazione terapeutica e, d'altra parte, conferma la stretta connessione tra danni vascolari e disfunzioni neuronali nella fisiopatologia delle retinopatie proliferative (Abcouwer and Gardner , 2014).

CONCLUSIONI

La ricerca di trattamenti efficaci contro i disturbi neovascolari delle complicazioni retiniche del diabete rimane una delle più grandi sfide in oftalmologia . Le terapie anti-VEGF attualmente utilizzate nel trattamento delle malattie proliferative oculari hanno dimostrato un'efficacia relativamente limitata. A questo proposito, UPARANT, un inibitore del recettore uPAR, di cui è stata dimostrata la stabilità plasmatica, la resistenza alla degradazione enzimatica e la specificità d'azione sul signaling di VEGF, ha confermato nel nostro modello di retinopatia indotta dalla condizione diabetica la sua efficacia nel contrastare la neovascolarizzazione patologica e la perdita irreversibile della vista, mantenendo minimo il rischio di complicazioni sistemiche. I protocolli sperimentali adottati nel presente studio hanno inoltre consentito di dimostrare la medesima efficacia della somministrazione intravitreale e sistemica del farmaco, evidenziando la possibilità di ridurre costi ed invasività di eventuali trattamenti ed amplificandone il potenziale terapeutico. Sebbene estrapolare questi risultati sperimentali per adattarli alla situazione umana sia difficile, UPARANT rappresenta un'opzione concreta per lo sviluppo di strategie che contrastino le retinopatie proliferative.

Riferimenti bibliografici

Abcouwer SF, Gardner TW. Diabetic retinopathy: loss of neuroretinal adaptation to the diabetic metabolic environment. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1311:174-90.

Afzal A, Shaw LC, Ljubimov AV, Boulton ME, Segal MS, Grant MB. Retinal and choroidal microangiopathies: Therapeutic opportunities. *Microvascular research.* 2007;74:131-144.

Aguirre-Ghiso JA, Kovalski K, Ossowski L. Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signalling. *J Cell Biol.* 1999;147:89-104.

Aiello LP, Gardner TW, King GL, et al. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 1998; 21:143–56.

Akula JD, Hansen RM, Martinez-Perez ME, Fulton AB. Rod photoreceptor function predicts blood vessel abnormality in retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:4351-4359.

Akula JD, Hansen RM, Tzekov R et al. Visual cycle modulation in neurovascular retinopathy. *Exp Eye Res.* 2010;91:153-161.

Alfano D, Franco P, Vocca I, Gambi N, Pisa V, Mancini A, Caputi M, Carriero MV, Iaccarino I, Stoppelli MP. The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis. *Thromb Haemost.* 2005;93:205-11.

Alfano D, Iaccarino I, Stoppelli MP. Urokinase signaling through its receptor protects against anoikis by increasing BCL-xL expression levels. *J Biol Chem.* 2006;281:17758-67.

Arden GB, Hamilton AM, Wilson-Holt J, Ryan S, Yudkin JS, Kurtz A. Pattern electroretinograms become abnormal when background diabetic retinopathy deteriorates to a preproliferative stage: possible use as a screening test. *Br J Ophthalmol*. 1986;70:330-5.

Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*. 2010;468:557-561.

Ascaso FJ, Huerva V, Grzybowski A. The role of inflammation in the pathogenesis of macular edema secondary to retinal vascular diseases. *Mediators Inflamm*. 2014;432685.

Bandello F, Lattanzio R, Zucchiatti I, Del Turco C. Pathophysiology and treatment of diabetic retinopathy. *Acta Diabetol*. 2013;50:1-20.

Barber AJ. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2003;27:283-290.

Bhagat N, Grigorian RA, Tutela A, Zarbin MA. Diabetic macular edema: pathogenesis and treatment. *Surv. Ophthalmol*. 2009;54:1-32.

Binder BR, Mihaly J, Prager GW. uPA/uPAR-PAI-1. Interaction and signaling: a vascular biologist's view. *Thromb Haemost*. 2007;97:336-342.

Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3:932-43.

Block F and Schwarz M. Effects of antioxidants on ischaemic retinal dysfunction. *Exp Eye Res*. 1997;64:559-564.

Buttery RG, Hinrichsen CF, Weller WL, Haight, JR. How thick should a retina be? A comparative study of mammalian species with and without intraretinal vasculature. *Vis. Res.* 1991;31:169-187.

Camacho A, Massieu L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch. Med. Res.* 2006;37:11-8.

Campochiaro PA. Retinal and choroidal neovascularization. *Journal of cellular physiology.* 2000;184:301-310.

Carlson NR, 2014. *Physiology of Behaviour*. USA: Pearson Education.

Carriero MV, Bifulco K, Minopoli M, et al. UPATANT: a urokinase receptor-derived peptide inhibitor of VEGF-driven angiogenesis with enhanced stability and in vitro and in vivo potency. *Mol Cancer Ther.* 2014;13: 1092-1104.

Chapman HA. Plasminogen activators, integrins and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997;9:714-724.

Chaurasia. P, Mezei M, Ming Zhou M, Ossowski L. Computer Aided identification of small molecules disrupting uPAR/alfa5beta1 integrin interaction: A new Paradigm for Metastasis Prevention. *Plos one.* 2009;4:4617.

Cheung, N, Mitchell, P, Wong, TY. Diabetic retinopathy. *Lancet* 2010;376: 124-136.

Crippa MP. Urokinase-type plasminogen activator. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:690.

Cuenca N, Fernandez-Sanchez L, Campello L, Maneu V, De la Villa P, Lax P, Pinilla I. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2014;43:17-75.

Dal Monte M, Latina V, Cupisti E, Bagnoli P. Protective role of somatostatin receptor 2 against retinal degeneration in response to hypoxia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2012;385:481-494.

Dal Monte M, Rezzola S, Cammalleri M, Belleri M, Locri F, Morbidelli L, Corsini M, Paganini G, Semeraro F; Cancar. Antiangiogenic Effectiveness of the Urokinase Receptor-Derived Peptide UPARANT in a Model of Oxygen-Induced Retinopathy. *Investigative ophthalmology and visual science.* 2015;56:2392- 2407.

Das A, Boyd N, Jones TR, Talarico N, Mcguire PG. Inhibition of choroidal neovascularization by a peptide inhibitor of the urokinase plasminogen activator and receptor system in a mouse model. *Arch Ophthalmol.* 2004;122:1844-1849.

Das A, Stroud S, Mehta A, Rangasamy S. New treatments for diabetic retinopathy. *Diabetes Obes Metab.* 2014.

Davson H, 2012. *The Physiology of the Eye.* USA: Elsevier.

Distler C, Dreher Z. Glia cells of the monkey retina II. Muller cells. *Vis Res.* 1996;36:2381-2394.

Dong CJ, Hare WA. Contribution to the kinetics and amplitude of the electroretinogram b-wave by third-order retinal neurons in the rabbit retina. *Vision Res.* 2000;40:579-589.

Downie LE, Pianta MJ, Vingrys AJ, Wilkinson-Berka JL, Fletcher EL. Neuronal and glial cell changes are determined by retinal vascularization in retinopathy of prematurity. *J Comp Neurol.* 2007;504:404-417.

Du Y, Veenstra A, Palczewski K, Kern TS, Photoreceptor cells are major contributors to diabetes-induced oxidative stress and local inflammation in the retina. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110:16586-16591.

El-Remessy AB, Behzadian MA, Abou-Mohamed G, Franklin T, Caldwell RW, Caldwell RB. 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. *Am J Pathol.* 2003;162:1995-2004.

El-Remessy AB, Franklin T, Ghaley N et al. Diabetes-induced superoxide anion and breakdown of the blood-retinal barrier: role of the VEGF/uPAR pathway. *PLoS One.* 2013;8:71868.

Falavarjani KG, Modarres M, Hashemi M, Parvaresh MM, Naseripour M, Zare-Moghaddam A, et al. Incidence of acute endophthalmitis after intravitreal bevacizumab injection in a single clinical center. *Retina.* 2013;33:971-4.

Feng Y, Busch S, Gretz N, Hoffmann S, Hammes HP. Crosstalk in the retinal neurovascular unit-lesson for the diabetic retina. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2012;120:199-201.

Fernando Arevalo J. Intravitreal bevacizumab as anti-vascular endothelial growth factor in the management of complications of proliferative diabetic retinopathy. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol.* 2013;2:20-4.

Fong AH, Lai TY. Long-term effectiveness of ranibizumab for age-related macular degeneration and diabetic macular edema. *Clin Interv Aging*. 2013; 8:467-83.

Fong DS, Aiello LP, Ferris FL 3rd, et al. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2004;27:2540-53.

Fong DS, Girach A, Boney A. Visual side effects of successful scatter laser photocoagulation surgery for proliferative diabetic retinopathy: a literature review. *Retina*. 2007; 27:816-24.

Gabriel R. Neuropeptides and diabetic retinopathy. *British journal of clinical pharmacology*. 2013;75:1189-1201.

Gardner TW, Abcouwer SF, Barber AJ, Jackson GR. An integrated approach to diabetic retinopathy research. *Archives of ophthalmology*. 2011;129:230-235.

Ghita AM, Parvu D, Sava R, Georgescu L, Zagrean L. Electrophysiological changes in optic neuropathy of streptozotocin induced diabetic rats. *J Med Life*. 2013;6:340-8.

Gilbert SF, 2000. *Developmental Biology*. Sunderland (MA): Sinauer Associateskolb.

Green DG, Kapousta-Bruneau NV. A dissection of the electroretinogram from the isolated rat retina with microelectrode and drugs. *Vis Neurosci*. 1999;16:727-741.

Gray H, 1918. *Anatomy of the human body*. Philadelphia: Lea & Febiger.

Gupta B, Sivaprasad S, Wong R, et al. Visual and anatomical outcomes following vitrectomy for complications of diabetic retinopathy: the DRIVE UK study. *Eye*. 2012;26:510-16.

Harrison WW, Bearse MA, Jr, Ng JS, Jewell NP, Barez S, Burger D, Schneck ME, Adams AJ. Multifocal electroretinograms predict onset of diabetic retinopathy in adult patients with diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:772-777.

Hasanuzzaman M, Kutner R, Agha-Mohammadi S, Reiser J, Sehgal I. A doxycycline-inducible urokinase receptor (uPAR) upregulates uPAR activities including resistance to anoikis in human prostate cancer cell lines. *Mol Cancer.* 2007;6:34.

Henkind P, Hansen RI, Szalay J. Ocular circulation. Physiology of the human eye and visual system. *New York: Harper & Row.* 1979;98-155.

Jahn CE, Topfner von Schutz K, Richter J, et al. Improvement of visual acuity in eyes with diabetic macular edema after treatment with pars plana vitrectomy. *Ophthalmologica.* 2004;218:378-84.

Jeon S, Lee WK. Effect of intravitreal bevacizumab on diabetic macular edema with hard exudates. *Clin. Ophthalmol.* 2014;8:1479-86.

Kaur C, Foulds WS, Ling EA. Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: Basic concepts, clinical features and management. *Prog. Ret. Eye. Res.* 2008;27:622-647.

Kern TS. Interrelationships between the Retinal Neuroglia and Vasculature in Diabetes. *Diabetes & metabolism journal.* 2014;38:163-170.

Kim JH, Jun HO, Yu YS, Kim KW. Inhibition of protein kinase C delta attenuates blood retinal-barrier breakdown in the diabetic retinopathy. *Am J Pathol.* 2010;176:1517-1524.

Klaassen I, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Prog. Retin. Eye Res.* 2013;34:19-48.

Kolb H, The neural organization of the human retina. Heckenlively JR, Arden GB, editors. Principles and practices of clinical electrophysiology of vision. *St. Louis: Mosby Year Book Inc.* 1991;25-52.

Krady JK, Basu A, Allen CM, Xu Y, LaNoue KF, Gardner TW, et al. Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy. *Diabetes.* 2005;54:1559.

Kur J, Newman E.A, Chan-Ling T. Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Prog. Ret Eye Res.* 2012;31:377-406.

Lecomte M, Denis U, Ruggiero D, Lagarde M, Wiernsperger N. Involvement of caspase-10 in advanced glycation endproduct-induced apoptosis of bovine retinal pericytes in culture. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Basis of Disease.* 2004;1689:202-11.

Lester RD, Jo M, Montel V, Takimoto S, Gonias SL. uPAR induces epithelial-mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cells. *J Cell Biol.* 2007;178:425-36.

Levin LA., Louhab A. Apoptosis of retinal ganglion cells in anterior ischemic optic neuropathy. *Archives of ophthalmology.* 1996;114:488-491.

Li AF, Roy S. High glucose-induced downregulation of connexin 43 expression promotes apoptosis in microvascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:1400-1407.

Li J, Wang JJ, Yu Q, Chen K, Mahadev K, Zhang SX. Inhibition of reactive oxygen species by Lovastatin downregulates vascular endothelial growth factor expression and ameliorates blood retinal barrier breakdown in db/db mice: Role of NADPH oxidase 4. *Diabetes*. 2010;59:1528-1538.

Li Q, Zemel E, Miller B, Perlman I. Early retinal damage in experimental diabetes: electroretinographical and morphological observations. *Exp Eye Res*. 2002;74:615-25.

Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev*. 1999;79:1431-568.

Liu X, Ye F, Xiong H, Hu DN, Limb GA, Xie T, et al. IL-1beta Induces IL-6 production in retinal Muller cells predominantly through the activation of P38 MAPK/NF-kappaB signaling pathway. *Exp Cell Res*. 2014.

Malla RR, Gopinath S, Gondi CS, et al. Cathepsin B and uPAR knockdown inhibits tumor-induced angiogenesis by modulating VEGF expression in glioma. *Cancer Gene Ther*. 2011;18: 419-434.

Martinez-Zapata MJ, Marti-Carvajal AJ, Sola I, Pijoan JI, Buil-Calvo JA, Cordero JA, et al. Anti-vascular endothelial growth factor for proliferative diabetic retinopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;11:8721.

Martini D, Dal Monte M, Ristori C et al. Antiangiogenic effects of $\beta(2)$ -adrenergic receptor blockade in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *J Neurochem*. 2011;119:1317-1329.

Maxwell PH, Ratcliffe PJ. Oxygen sensors and angiogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*. 2002;13:29-37.

Mazhar K, Varma R, Choudhury F, et al. Severity of diabetic retinopathy and health-related quality of life: the Los Angeles Latino Eye Study. *Ophthalmology*. 2011;118:649-55.

Mcguire PG, Jones TR, Talarico N, Warren E, Das A. The urokinase/urokinase receptor system in retinal neovascularization: inhibition by A6 suggests a new therapeutic target. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44: 2736-2742.

Mignatti P. and Rifkin D.B. (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Review*. 1993;73:161-194.

Mizutani M, Gerhardinger C, Lorenzi M. Muller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes*. 1998;47:445-9.

Montuori N, Visconte V, Rossi G, Ragno P. Soluble and cleaved forms of the urokinase-receptor: degradation products or active molecules? *Thromb Haemost*. 2005;93:192-8.

Murakami T, Frey T, Lin C, Antonetti DA. Protein kinase c β phosphorylates occludin regulating tight junction trafficking in vascular endothelial growth factor-induced permeability *in vivo*. *Diabetes*. 2012;61:1573-1583.

Nakahara T, Mori A, Kurauchi Y, Sakamoto K, Ishii K. Neurovascular interactions in the retina: physiological and pathological roles. *Journal of pharmacological sciences*. 2013;123:79-84.

Nalabothula N, Lakka SS, Dinh DH, Giuriati M, Oliviero WC, Rao JS. Sense p16 and antisense uPAR bistrionic construct inhibits angiogenesis and induced glioma cell death. *Int J Oncol*. 2007;30:669-678.

Navaratna D, Menicucci G, Maestas J, Srinivasan R, McGuire P, Das A. A peptide inhibitor of the urokinase/urokinase receptor system inhibits alteration of the blood retinal barrier in diabetes. *FASEB J.* 2008;22:3310-3317.

Newman E, Reichenbach A. The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci.* 1996;19(8):307-12.

Nguyen QD, Brown DM, Marcus DM, et al. Ranibizumab for diabetic macular edema: results from 2 phase II randomized trials: RISE and RIDE. *Ophthalmology.* 2012; 119:789-801.

Osaadon P, Fagan XJ, Lifshitz T, Levy J. A review of anti-VEGF agents for proliferative diabetic retinopathy. *Eye (Lond).* 2014;28:510-20.

Osborne NN, Casson RJ, Wood JPM, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog. Retin. Eye Res.* 2004;23:91-147.

Ploug, M, Ellis V, Dano K. Ligand interaction between urokinase-type plasminogen activator and its receptor probed with 8-anilino-1-naphthalenesulfonate. Evidence for a hydrophobic binding site exposed only on the intact receptor. *Biochemistry.* 1994;33:8991.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D. 2001. Neuroscience. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

Ragno P. The urokinase receptor: a ligand or a receptor? Story of a sociable molecule. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63: 1028-37.

Reichenbach A, Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Wiedemann P, Bringmann A. Müller cells as players in retinal degeneration and edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007;245:627-636.

Rein DB, Zhang P, Wirth KE, et al. The economic burden of major adult visual disorders in the United States. *Arch Ophthalmol*. 2006;124:1754-60.

Resnati M, Guttinger M, Valcamonica S, Sidenius N, Blasi F, Fazioli F. Proteolytic cleavage of the urokinase receptor substitutes for the agonist-induced chemotactic effect. *EMBO J*. 1996;15:1572-82.

Robbiati F, Nolli ML, Soffientini A, Sarubbi E, Stoppelli MP, Cassani G, Parenti F and. Blasi F. A recombinant pro-urokinase derived mutant missing the growth factor-like domain does not bind to its receptor. *Fibrinolysis*. 1990;4:53-60.

Saaddine JB, Honeycutt AA, Narayan KMV, Zhang X, Klein R, Boyle JP. Projection of diabetic retinopathy and other major eye diseases among people with diabetes mellitus: United States, 2005–2050. *Archives of Ophthalmology*. 2008;12:1740-1747.

Saari, JC, 1987. Metabolism and photochemistry in the retina: Moses, R.A.

Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*. 2000;88:1474-1480.

Shikari H, Silva PS, Sun JK. Complications of intravitreal injections in patients with diabetes. *Semin Ophthalmol*. 2014;29:276-89.

Shin ES, Sorenson CM, Sheibani. *N J Ophthalmic Vis. Res*. 2014;9:362-73.

Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end –products: A review. *Diabetologia*. 2001;44:129-146.

Stitt AW, Lois N, Medina RJ, Adamson P, Curtis TM. Advances in our understanding of diabetic retinopathy. *Clin. Sci. (Lond)*. 2013;125:1-17.

Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M. Direct measurement of free radicals in ischaemic/reperfused diabetic rat retina. *Clin Neurosci*. 1997;4:240-245.

Tien T, Barrette KF, Chronopoulos A, Roy S. Effects of high glucose-induced CX43 downregulation on occludin and ZO-1 expression and tight junction barrier function in retinal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:6518-6525.

Tout S, Chan-Ling T, Hollander H, Stone J. The role of Muller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience*. 1993.;55:291-301.

Uhrin P, Breuss JM. uPAR: a modulator of VEGF-induced angiogenesis. *Cell Adh Migr*. 2013;7:23-26.

Van der Pluijm G, Sijmons B, Vloedgraven H, Van der Bent C, Drijfhout JW, Verheijen J, Quax P, Karperien M, Papapoulos S, Lowik C. Urokinasereceptor/integrin complexes are functionally involved in adhesion and progression of human breast cancer in vivo. *Am J Pathol*. 2001;159:971-82.

Wang H, Zheng Z, Gong Y, Zhu B, Xu X. U83836E inhibits retinal neurodegeneration in early-stage streptozotocin-induced diabetic rats. *Ophthalmic Res*. 2011;46:19-24.

Wang J, Xu X, Elliott MH, Zhu M, Le YZ. Muller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage. *Diabetes*. 2010;59:2297-305.

Wang LL, Chen H, Huang K, Zheng L. Elevated histone acetylations in Muller cells contribute to inflammation: a novel inhibitory effect of minocycline. *Glia*. 2012;60:1896-905.

Yang XJ. Roles of cell-extrinsic growth factors in vertebrate eye pattern formation and retinogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*. 2004;15:91-103.

Yu Y, Feng L, Shao Y, et al. Quality of life and emotional change for middle-aged and elderly patients with diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol*. 2013; 6:71-4.

Zheng Z, Chen H, Ke G, Fan Y, Zou H, Sun X, et al. Protective effect of perindopril on diabetic retinopathy is associated with decreased vascular endothelial growth factor-to-pigment epithelium-derived factor ratio: involvement of a mitochondria-reactive oxygen species pathway. *Diabetes* 2009;58:954-964.

Zheng Z, Chen H, Li J, Li T, Zheng B, Zheng Y, et al. Sirtuin 1-mediated cellular metabolic memory of high glucose via the LKB1/AMPK/ROS pathway and therapeutic effects of methformin. *Diabetes*. 2012;61:217-218.

Zong H, Ward M, Madden A, Yong PH, Limb GA, Curtis TM, Stitt AW. Hyperglycaemia-induced pro-inflammatory responses by retinal Muller glia are regulated by the receptor for advanced glycation end-products (RAGE). *Diabetologia*. 2010;53:2656-26566.