

a cura di Lorella Marselli

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Pisa

## L'umor vitreo nella Retinopatia Diabetica Proliferante: implicazioni traslazionali

Sara Rezzola, Alessandra Loda

Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università degli Studi di Brescia

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildiaz2002f>

### L'UMOR VITREO

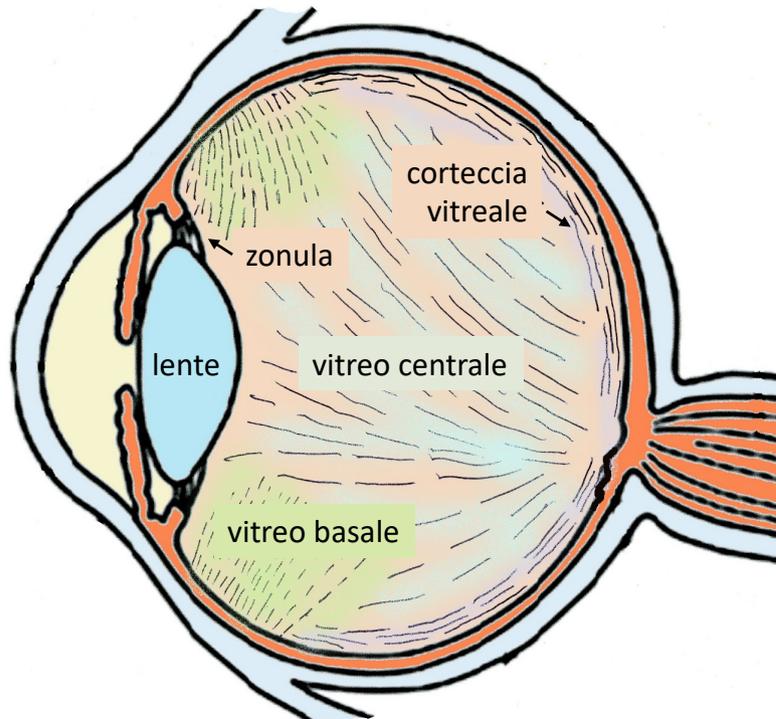
La struttura interna dell'occhio è costituita da due cavità piene di liquido che svolgono un ruolo vitale nel mantenimento delle funzioni oculari: la camera anteriore e la camera posteriore. La camera anteriore, al cui interno si trova l'umor acqueo, è costituita dallo spazio tra la cornea e la lente. La camera posteriore è costituita dallo spazio tra la lente e la retina ed è occupata dall'umor vitreo, il quale, a differenza dell'umor acqueo, non subisce un regolare processo di ricircolo e drenaggio (Fig. 1). L'umor vitreo è un delicato gel trasparente composto da acqua (99%), sali (0,9%) e in minima percentuale da proteine e polisaccaridi, principalmente collagene e glicosaminoglicani. Sebbene sia considerato per lo più un fluido acellulare, rari ialociti sono stati identificati al suo interno (1).

Dal punto di vista anatomico, il vitreo costituisce una struttura sferica circondata dalla retina, dalla lente e dalla *pars plana* dell'occhio che può essere suddivisa in quattro regioni: il vitreo centrale, il vitreo basale, la corteccia vitreale e la zonula (Fig. 1) (1). A causa delle differenze nella concentrazione e nell'orientamento delle fibre di collagene, ogni regione mostra una diversa viscoelasticità. La corteccia vitreale posteriore, detta anche interfaccia vitreo-retinica, è generalmente considerata il "centro metabolico" del vitreo ed è attaccata alla retina tramite macromolecole quali laminina, fibronectina, glicosaminoglicani ed altre componenti della matrice extracellulare.

### LA RETINOPATIA DIABETICA

Il diabete mellito è la malattia metabolica più diffusa al mondo e rappresenta un'emergenza globale in continua crescita (2). Le complicanze vascolari del diabete sono classicamente suddivise in macrovascolari e microvascolari. Le complicanze microvascolari comprendono la neuropatia, la nefropatia e la retinopatia diabetica. Quest'ultima costituisce la principale causa di cecità nella popolazione in età lavorativa nel mondo occidentale (2).

Per poter prevenire o arrestare lo sviluppo della RD è in primo luogo raccomandata una corretta gestione dei classici fattori di rischio (quali iperglicemia ed ipertensione). Per quanto riguarda invece le fasi tardive della RD, gli interventi terapeutici disponibili sono costituiti da trattamenti laser, iniezioni intravitreali di corticosteroidi o di farmaci volti a bloccare il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e la chirurgia vitreo-retinica. Tali trattamenti non sono tuttavia scevri da effetti collaterali e non sempre sono dotati di un'efficacia apprezzabile (3). Lo studio della patogenesi

**Figura 1** ◆ Rappresentazione schematica dell'occhio umano.

L'umor vitreo è localizzato nella camera posteriore dell'occhio, nello spazio compreso tra la lente e la retina

della RD e la sua progressione da RD non proliferante (RDNP) a proliferante (RDP) rimane pertanto di importanza fondamentale per lo sviluppo di strategie terapeutiche precoci e di maggiore successo.

Le prime alterazioni tipiche della RD sono costituite dall'insorgenza di microaneurismi. Progressivamente la malattia può evolvere verso una RD moderata e grave, caratterizzata dalla presenza di essudati, emorragie, aumento del calibro venoso ed infine neovascolarizzazione (4).

La RDNP include uno spettro di modificazioni intraretiniche strutturali e funzionali. In questa fase possono verificarsi eventi patologici quali l'ispessimento della membrana basale dei vasi sanguigni e la perdita dei periciti, seguiti poi dalla perdita delle cellule endoteliali stesse. Questo processo di vasoregressione costituisce la risposta patologica primaria della retina all'iperglicemia cronica e darà successivamente avvio all'instaurarsi di una condizione di ischemia retinica in grado di stimolare una risposta neovascolare secondaria, che porta alla RDP (5). Altre importanti manifestazioni della RDNP sono costituite dalla presenza di emorragie retiniche e di anomalie a carico della struttura microvascolare intraretinica (AMIR), le quali consistono nella presenza di microvasi intraretinici tortuosi e dilatati, la cui gravità rappresenta un fattore di rischio per la progressione verso la fase proliferante (6). I cambiamenti strutturali a carico del microcircolo retinico sono spesso associati alla rottura della barriera emato-retinica. La maggiore permeabilità dei vasi che ne consegue comporta l'accumulo di fluido a livello della macula, provocando così l'edema maculare diabetico (EMD), un'ulteriore causa di perdita visiva che può verificarsi in qualsiasi stadio della retinopatia (7). Il mantenimento di un basso grado di infiammazione, sostenuto dall'intervento di molecole pro-infiammatorie, contribuisce a danneggiare i vasi retinici ed a sostenere l'EMD (8). Lo studio epidemiologico "Wisconsin" sulla RD stima che il 20% dei pazienti affetti da diabete di tipo 1 e il 25% di quelli affetti da diabete di tipo 2 sviluppino EMD dopo 10 anni dalla diagnosi di diabete (9). Nonostante l'EMD possa verificarsi anche in assenza di altri segni di microangiopatia, questa lesione è spesso associata alla presenza di essudati che si formano come conseguenza di perdite localizzate da parte dei vasi retinici. Nella RD se ne distinguono due tipologie. L'essudato molle (o cotonoso) si manifesta a livello delle regioni retiniche soggette ad ischemia localizzata, appare come un'area tonda, di colore grigio e dai bordi non ben definiti.

L'essudato duro è invece composto principalmente da lipidi e proteine, quali la fibrina, e si manifesta in zone interessate da microaneurismi, esso appare come una macchia di colore giallo dai margini solitamente distinti (10).

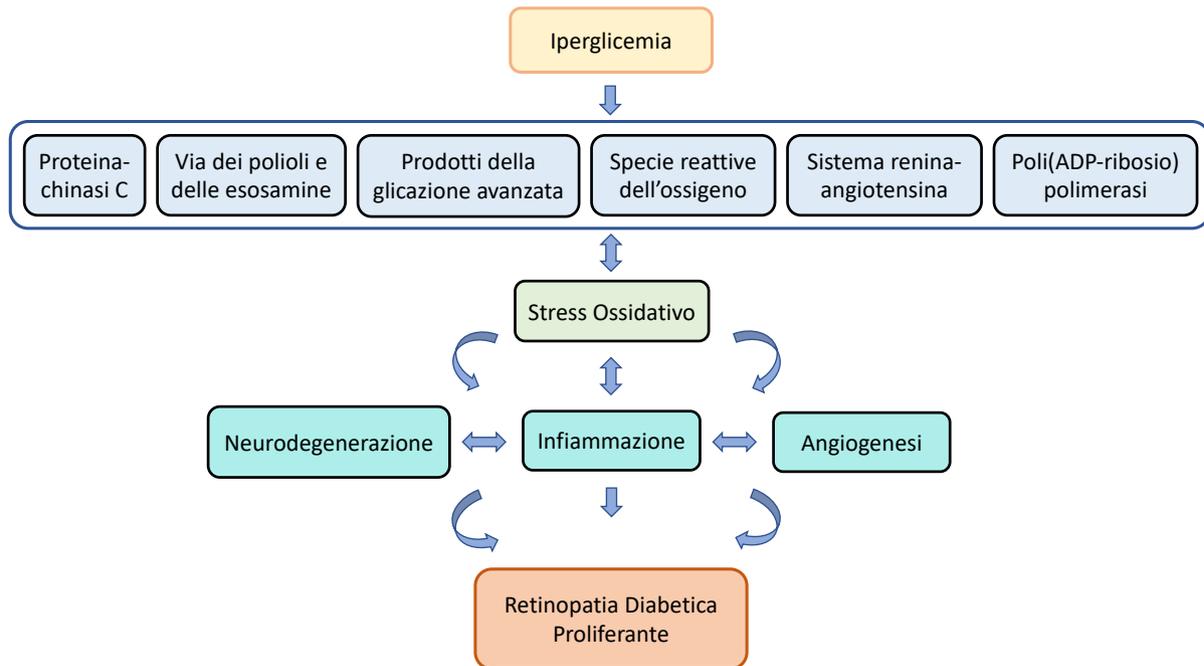
La RDNP può evolvere in RDP in una percentuale significativa di pazienti (11). Sebbene le attuali classificazioni della RDNP non consentano di predire il rischio di una progressione più o meno rapida verso la RDP o l'EMD (12), la gravità e le caratteristiche della retinopatia al momento della diagnosi [ad esempio la presenza di AMIR (13)] possono assumere significato prognostico. La RDP è solitamente considerata un disturbo vascolare. Tuttavia, anche il vitreo subisce alterazioni strutturali e molecolari nel paziente diabetico e tali alterazioni esercitano un impatto significativo nello sviluppo e nella progressione della malattia; si può parlare pertanto di "vitreo-retinopatia diabetica" (14). Inoltre, il processo di neovascolarizzazione tipico delle fasi avanzate della RDP si verifica generalmente a livello dell'interfaccia vitreo-retinica. I vasi di neoformazione crescono infatti sia all'interno sia sulla superficie della retina, infiltrando così la corteccia vitreale e contribuendo alla trazione esercitata dal vitreo sulla retina stessa (15).

Come descritto successivamente, le alterazioni retiniche e sistemiche che si verificano nei pazienti diabetici possono provocare cambiamenti molecolari del vitreo che, a loro volta, possono esercitare effetti patologici sul tessuto retinico. In effetti, durante la RD l'umor vitreo rappresenta una sorta di "serbatoio" contenente molecole in grado di mediare segnali paracrini patologici per le cellule della retina. Il ciclo di produzione/degradazione di queste molecole all'interno del vitreo è sconosciuto, ma sembra che la potenza e la durata dell'effetto di tali mediatori sia maggiore soprattutto nella zona della macula, probabilmente a causa delle caratteristiche strutturali dell'umor vitreo stesso (16).

## ANGIOGENESI E INFIAMMAZIONE NELLA RETINOPATIA DIABETICA

Con il termine angiogenesi si definisce il processo di formazione di nuovi vasi a partire da vasi preesistenti. Si tratta di un fenomeno complesso che si svolge in più fasi, dove le cellule endoteliali rivestono un ruolo centrale. L'angiogenesi richiede l'interazione tra diversi tipi di cellule, fattori solubili, recettori sulla superficie cellulare e componenti della matrice extracellulare (17). In breve, durante l'ipossia, il rilascio di fattori di crescita angiogenici (tra cui il VEGF) provoca il distacco dei periciti dalla parete del vaso e l'allentamento dei contatti giunzionali intercellulari tra le cellule endoteliali, con conseguente aumento della permeabilità vascolare (17). Oltre al VEGF, diverse altre molecole pro-angiogeniche contribuiscono attivamente alla permeabilità vascolare grazie alla loro capacità di indurre la fosforilazione del recettore per la caderina di tipo endoteliale (VE-caderina) e di alterare le giunzioni aderenti, consentendo l'extravasazione delle proteine seriche. La stimolazione indotta dai fattori angiogenici fa sì che le cellule endoteliali quiescenti acquisiscano il caratteristico "fenotipo pro-angiogenico", modifichino la loro morfologia e siano indotte a proliferare e migrare nello stroma seguendo il gradiente di concentrazione dello stimolo angiogenico (18). Attorno ai capillari neoformati viene successivamente depositata una nuova membrana basale e vengono reclutati periciti e cellule muscolari lisce al fine di consentire la completa maturazione dei nuovi vasi sanguigni. Una volta concluso questo processo, la produzione di fattori angiogenici diminuisce ed il flusso sanguigno stesso induce un ulteriore rimodellamento vascolare, riportando le cellule endoteliali allo stato di quiescenza (19).

Diverse patologie oculari che comportano cecità, quali ad esempio la retinopatia del prematuro, l'occlusione venosa retinica e la RD, sono caratterizzate da una angiogenesi retinica deregolata e patologica. Nel paziente diabetico l'elevato livello ematico di glucosio induce l'attivazione di numerosi segnali intracellulari nell'endotelio, determinando non solo un aumento dello stress ossidativo coinvolto nell'avvio di processi di neurodegenerazione precoce, ma anche l'attivazione di risposte infiammatorie e lo sviluppo anomalo di nuovi vasi sanguigni (Fig. 2) (8). Inoltre, il mantenimento di condizioni iperglicemiche contribuisce a rendere disfunzionali i mitocondri retinici, con conseguente incremento dei livelli di ione superossido, il quale è responsabile dell'induzione di danno al DNA e della morte delle cellule endoteliali per apoptosi (20). La perdita dei periciti retinici rappresenta un'ulteriore caratteristica della RD ed a tale fenomeno sono attribuibili la degenerazione delle cellule endoteliali, la modificazione della struttura microvascolare e l'alterazione della capacità di perfusione.

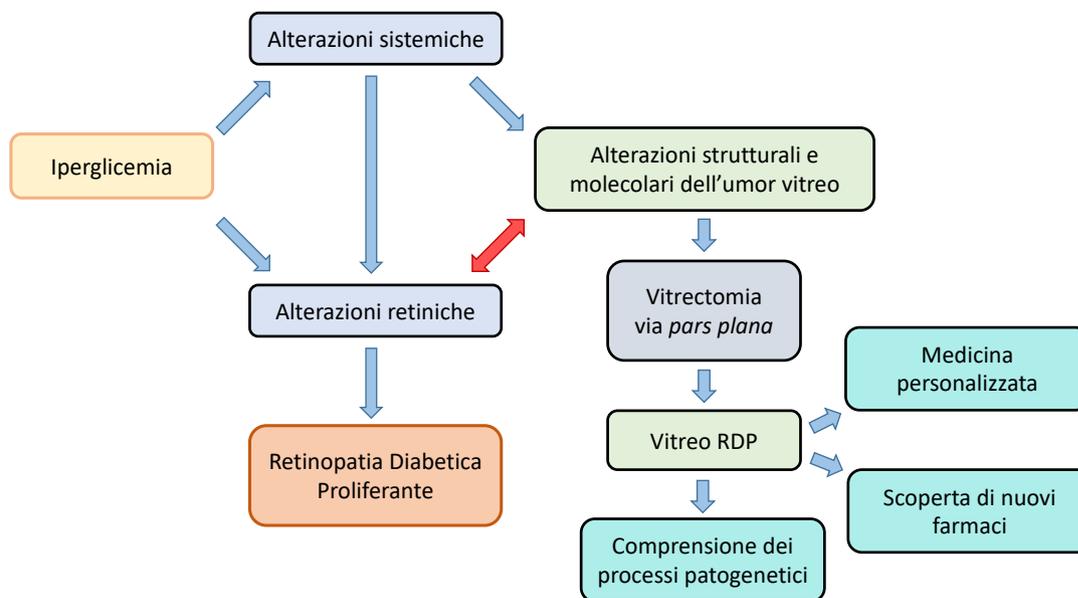
**Figura 2** ◆ **Principali fattori indotti dall'iperglicemia e coinvolti nella patogenesi della RDP**

L'iperglicemia causa l'attivazione della proteina-chinasi C (PKC), delle vie dei polioli e delle esosamine, l'incremento della produzione di prodotti della glicazione avanzata (AGEs) e di specie reattive dell'ossigeno, l'attivazione della Poli(ADP-ribosio) Polimerasi (PARP) e l'attivazione del sistema renina-angiotensina. Ciò determina un aumento dello stress ossidativo, il quale a sua volta induce neurodegenerazione, attivazione della risposta infiammatoria ed angiogenesi. Questi fattori contribuiscono all'insorgenza delle alterazioni strutturali e funzionali che si verificano durante la progressione della RDP.

A queste disfunzioni indotte dall'iperglicemia, e comunemente considerate come la causa principale dell'insorgenza della RD, seguono ulteriori eventi, quali l'ispessimento della membrana basale endoteliale, l'incremento della permeabilità vascolare, la stimolazione di una potente risposta infiammatoria e l'instaurarsi di una condizione di ischemia. È possibile inoltre che in questo stadio si verifichino alterazioni a carico del flusso sanguigno retinico, sebbene lo studio di tali alterazioni abbia condotto a risultati contrastanti. Sembra infatti esistere una correlazione tra la presenza di elevati livelli ematici di glucosio e l'incremento del flusso sanguigno nei vasi della retina, come dimostrato in pazienti affetti da diabete di tipo 1 con RD moderata valutati prima dell'assunzione della dose mattutina di insulina; in condizioni di euglicemia il flusso sanguigno retinico dei medesimi pazienti tende invece a normalizzarsi (21). È stato osservato inoltre un incremento del flusso sanguigno retinico anche in pazienti affetti da diabete di tipo 1 con retinopatia in stadio avanzato, indipendentemente dai livelli ematici di glucosio, dall'età, dal sesso, o dalla durata della malattia (22). Tuttavia, nei pazienti con RDP trattati mediante fotocoagulazione panretinica si registra una significativa diminuzione del flusso ematico retinico (23). Altri studi hanno invece rilevato una riduzione nella velocità del flusso ematico retinico in pazienti diabetici in fase precoce di RDP, mentre non sono state riportate variazioni in pazienti con diabete di tipo 1 con controllo glicemico ottimale (24). Questi risultati contraddittori potrebbero essere la conseguenza di tecniche di misurazione non sufficientemente sensibili e riproducibili. In futuro sarà possibile ottenere risultati più informativi grazie all'utilizzo dell'angiografia a tomografia a coerenza ottica (OCT), una metodica che consente la misurazione del flusso sanguigno nei vasi retinici.

Sebbene la microcircolazione retinica sia iper-permeabile, nella retina diabetica possono verificarsi micro-occlusioni dovute all'adesione dei leucociti alle cellule endoteliali; questo fenomeno risulta facilitato dall'incremento dell'espressione delle molecole di adesione intercellulare di tipo 1 (ICAM-1) sulla superficie delle cellule endoteliali (25). La compromissione della perfusione retinica si associa ad un incremento nei livelli del fattore indotto dall'ipossia di tipo 1

**Figura 3** ◆ Principali fattori indotti dall'iperglicemia e coinvolti nella patogenesi della RDP



Durante la malattia diabetica possono insorgere modificazioni sistemiche e retiniche che determinano lo sviluppo di alterazioni a carico dell'umor vitreo. Tali alterazioni possono esercitare un effetto patologico sulla retina diabetica, attivando un circolo vizioso che contribuisce alla progressione della RD. L'analisi del vitreo RDP contribuirà al raggiungimento di una maggiore comprensione della patogenesi della RD, consentendo l'identificazione di marcatori biologici utili al monitoraggio della risposta del paziente alla terapia. La valutazione degli effetti del vitreo RDP sulle cellule bersaglio consentirà inoltre di ottenere dati preclinici rilevanti al fine di identificare nuovi composti farmacologici per il trattamento della RDP

(HIF-1 $\alpha$ ), il quale risulta elevato nel vitreo dei pazienti affetti da RDP (26). Nella retina HIF-1 $\alpha$  induce l'incremento dell'espressione di diverse citochine, chemochine e fattori di crescita, determinando l'attivazione del processo di angiogenesi. Tra queste molecole figurano VEGF, eritropoietina, il fattore di crescita insulino-simile di tipo 1 (IGF-1), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita dei fibroblasti di tipo 2 (FGF2), il fattore di crescita derivato dalle cellule stromali di tipo 1 (SDF-1 $\alpha$ /CXCL12), il fattore di crescita tumorale (TNF $\alpha$ ) e diverse interleuchine (IL) (27). Oltre alla produzione di molecole pro-angiogeniche, è possibile osservare anche una significativa diminuzione dell'espressione degli inibitori dell'angiogenesi. A tal proposito, nei fluidi oculari dei pazienti diabetici si riscontrano livelli minori di angiostatina e del fattore derivato dall'epitelio pigmentato (PEDF) (28). Questo squilibrio conduce allo sviluppo di una rete di vasi sanguigni di nuova formazione e privi di supporto da parte di uno stroma fibroso o gliale che prende il nome di "membrana neovascolare".

Angiogenesi e infiammazione sono processi strettamente correlati tra loro (29). Le cellule dell'infiammazione possono infatti produrre citochine pro-angiogeniche, fattori di crescita e proteasi che contribuiscono alla formazione di nuove strutture vascolari nel sito infiammato (30). A sua volta, l'attivazione delle cellule endoteliali microvascolari determina la produzione di molecole pro-infiammatorie coinvolte nel reclutamento dei leucociti e nella loro attivazione (31). Inoltre, infiammazione e neovascolarizzazione condividono alcune vie di trasduzione di segnale, in particolare la via delle ciclossigenasi/prostaglandine (32). Diverse chemochine svolgono addirittura una doppia funzione, agendo sia come stimoli attrattivi per i leucociti sia come fattori pro-angiogenici per le cellule endoteliali (33). Infine, diverse citochine pro-infiammatorie (ad esempio IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$  ed osteopontina) possono indurre la formazione di vasi sanguigni agendo direttamente sulle cellule endoteliali, oppure stimolando la produzione di mediatori pro-angiogenici da parte dei leucociti e/o da parte delle stesse cellule endoteliali (34). Alcuni fattori angiogenici, come VEGF e l'angio-

poietina di tipo 1 (Ang-1), possono invece causare risposte pro-infiammatorie a carico delle cellule endoteliali andando a stimolare l'espressione di molecole di adesione cellulare e mediatori dell'infiammazione (35).

L'infiammazione riveste un ruolo importante nella patogenesi della RD, in particolare negli stadi precoci, attraverso l'attivazione di fattori di trascrizione e la produzione di molecole pro-infiammatorie e pro-angiogeniche (36). Infatti, citochine pro-infiammatorie, chemochine e altri mediatori causano infiammazione persistente, contribuendo al danno dei vasi retinici, alla proliferazione di nuovi microvasi retinici patologici ed all'insorgenza di edema maculare (37). L'infiammazione può inoltre contribuire alla neurodegenerazione retinica associata al diabete (37) ed all'attivazione delle cellule della microglia, con conseguente produzione di fattori angiogenici e citochine (38). Lo studio del ruolo dell'infiammazione nella patogenesi della RD potrebbe pertanto portare alla individuazione di nuovi bersagli terapeutici. Inoltre, l'associazione tra composti anti-infiammatori e molecole anti-angiogeniche potrebbe rappresentare una strategia vincente nel trattamento farmacologico della patologia (39).

### ALTERAZIONI MOLECOLARI DEL VITREO NELLA RDP

Le alterazioni metaboliche e funzionali del tessuto retinico, e le risposte sistemiche, che si verificano durante la progressione della RD possono causare alterazioni strutturali e molecolari a carico del vitreo in grado di riflettere gli eventi patologici che si verificano a livello dell'interfaccia vitreo-retinica e che caratterizzano la condizione diabetica. A loro volta, alterazioni del vitreo possono esercitare un'azione patologica sulla retina diabetica, con conseguente attivazione di un circolo vizioso che contribuisce all'evoluzione della malattia (Fig. 3).

Nel vitreo di pazienti affetti da RDP si identificano sia proteine pro-angiogeniche, espresse a livelli maggiori, che anti-angiogeniche, espresse a livelli minori; l'equilibrio tra queste due classi di mediatori è volto a favorire il mantenimento di un ambiente pro-angiogenico (27, 40). Tra i fattori pro-angiogenici oltre a VEGF sono stati riscontrati Ang-1 e Ang-2 (41), osteopontina (42), PDGF (43), eritropoietina (44), SDF-1 $\alpha$  (45), il fattore di crescita placentare (PlGF) (46), FGF2 (47), il fattore di crescita epatocitario (HGF) (48), il fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF) (49), IGF-1 (50) e l'induttore dell'angiogenesi ricco in cisteine di tipo 61 (CYR61) (51). Contestualmente, i livelli d'espressione di diversi mediatori anti-angiogenici, tra cui l'endostatina (52), la trombospondina-1 (53) ed il PEDF (54) risultano ridotti.

Nella retina dei soggetti diabetici VEGF è prodotto da diverse classi di cellule, tra cui periciti, cellule di Müller, cellule gangliari, cellule dell'epitelio pigmentato retinico (RPE) e macrofagi (55). Il VEGF è considerato una delle molecole maggiormente coinvolte nella RDP e rappresenta il principale bersaglio della terapia farmacologica somministrata a livello intravitreale (56). Alla famiglia del VEGF appartengono 6 membri: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e PlGF (57). Tra questi, il VEGF-A è il mediatore pro-angiogenico e pro-infiammatorio maggiormente studiato, la sua concentrazione intravitreale correla con la severità della malattia (58). A differenza del VEGF-A, le informazioni inerenti l'impatto degli altri membri della famiglia del VEGF sono ad oggi scarse. Ad esempio, sebbene sia stato recentemente osservato come l'incremento dei livelli di VEGF-B nel vitreo di pazienti diabetici sia correlabile con lo stadio della malattia (59), il ruolo giocato da tale fattore nella RDP rimane tuttora da chiarire (60).

I fattori che nella retina di soggetti diabetici possono contribuire ad aumentare l'espressione di VEGF sono diversi. Tra questi appaiono rivestire notevole importanza la condizione di ipossia tissutale e l'intervento di citochine infiammatorie, fattori di crescita e specie reattive dell'ossigeno (61). A sua volta il VEGF promuove l'angiogenesi e l'incremento della permeabilità vascolare a livello della retina ischemica, contribuendo alla rottura della barriera emato-retinica. Inoltre, elevati livelli di VEGF nella retina diabetica favoriscono l'adesione dei leucociti alle pareti dei vasi in seguito alla espressione dei recettori di adesione cellulare ICAM-1 e VCAM-1 (62). La rottura della barriera emato-retinica mediata dal VEGF e l'aumento del reclutamento leucocitario sono entrambi fattori che contribuiscono all'instaurarsi di una risposta infiammatoria che, a sua volta, stimola l'ulteriore rilascio di VEGF, instaurando un circolo vizioso (63).

L'espressione di proteine infiammatorie è regolata a livello di trascrizione genica dall'attivazione di fattori trascrizionali quali NF- $\kappa$ B e HIF-1 $\alpha$ , entrambi attivati dall'iperglicemia. Ciò induce la sintesi di citochine, chemochine, proteine di fase acuta e altre molecole pro-infiammatorie (64). Infatti, la concentrazione intravitreale delle principali citochine

pro-infiammatorie e chemochine, tra cui  $IL1\beta$ ,  $TNF\alpha$ , la proteina chemiotattica dei monociti (MCP-1), la proteina di tipo 10 indotta dall'interferone  $\gamma$  (IP-10), IL6, IL8 e SDF-1 $\alpha$ , risulta incrementata nel vitreo RDP (36-37).

Nonostante i livelli d'espressione dei mediatori angiostatici siano tendenzialmente ridotti durante la RDP, alcuni studi hanno riportato un incremento del fattore di crescita tissutale (TGF $\beta$ ) (65), angiostatina (66), endostatina (67), fattore piastrinico-4 (68), trombospondina-2 (69), e vasoinibina-1 (70) nel vitreo e/o nelle membrane epiretinali di pazienti con RDP rispetto a quanto osservato nei controlli. La produzione di tali fattori durante le fasi avanzate della malattia può rappresentare il tentativo di instaurazione di un meccanismo compensatorio volto a controbilanciare l'attività dei mediatori pro-infiammatori e pro-angiogenici. A tale proposito, è interessante notare come i livelli intravitreali di mediatori angiostatici risultino incrementati a seguito di terapia laser fotocoagulativa (66).

Durante la progressione della RD il tessuto retinico è caratterizzato da alterazioni nell'espressione di fattori neurotrofici e dei loro recettori. Ad esempio, l'espressione di alcuni fattori neurotrofici importanti, come somatostatina (SST), cortistatina (CST), il peptide simile al glucagone di tipo 1 (GLP-1) e PEDF, risulta ridotta nel vitreo di soggetti diabetici nelle fasi iniziali della retinopatia, contribuendo quindi alla neurodegenerazione retinica (3, 40). Al contrario, altri fattori neurotrofici tra cui il precursore del fattore di crescita neuronale (proNGF), il fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF), il fattore neurotrofico derivato dalle cellule gliali (GDNF), neurotrofina di tipo 3 (NT-3), neurotrofina di tipo 4 (NT-4) ed i recettori solubili TrkA e TrkB si accumulano nel vitreo RDP (71). Tale accumulo nella retina del paziente diabetico può determinare due effetti opposti: da un lato può esercitare una funzione neuroprotettiva sul tessuto retinico; dall'altro può contribuire alla risposta neovascolare patologica che caratterizza la progressione della RD verso la sua forma proliferante.

## IL VITREO RDP NELLA RICERCA TRASLAZIONALE

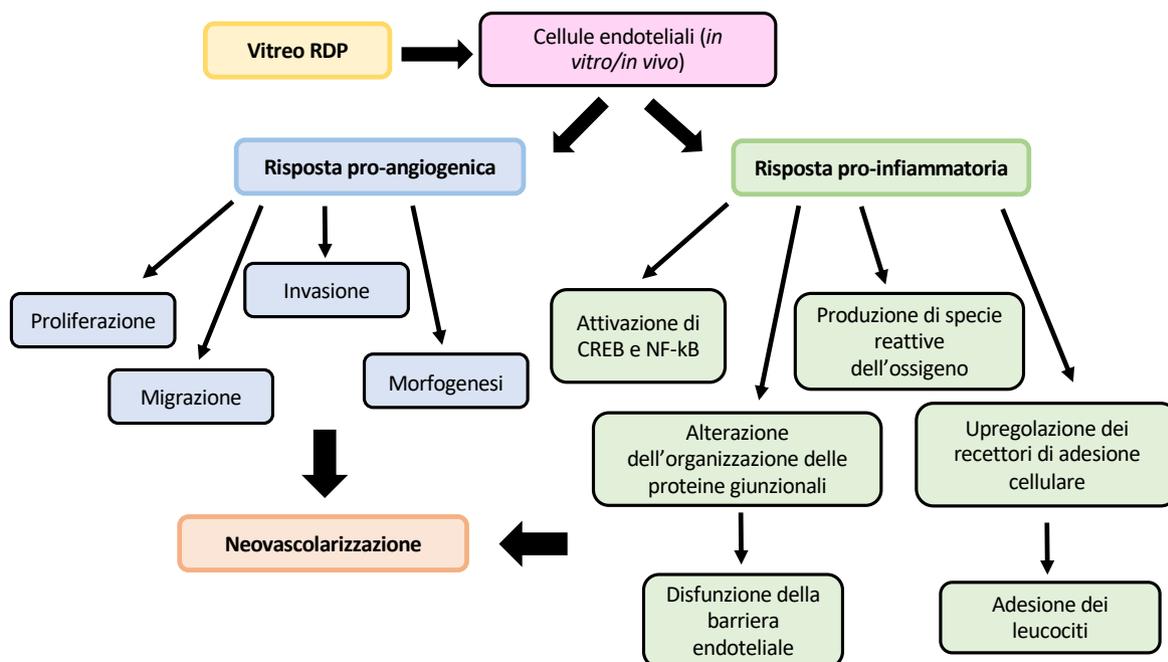
L'umor vitreo ottenuto dai pazienti diabetici sottoposti a chirurgia vitreoretinica può essere utilizzato per indagare gli eventi molecolari coinvolti nella RD, nonché per identificare nuovi potenziali bersagli terapeutici (Fig. 3). Inoltre, l'analisi dell'umor vitreo e/o dell'umor acqueo potrebbe in futuro consentire di identificare i soggetti a rischio di sviluppare patologia oculare o di progredire verso forme più severe di malattia. Infine, attraverso la "biopsia liquida" dei fluidi oculari si potrebbe monitorare la risposta al trattamento farmacologico, modulando la strategia terapeutica in modo personalizzato (72).

In questo contesto, la valutazione dell'attività biologica esercitata *in vitro* ed *in vivo* dall'umor vitreo su cellule bersaglio (per esempio le cellule endoteliali) acquisisce una importanza fondamentale. Tale attività è il risultato dell'azione svolta da tutti i mediatori biologici, sia agonisti sia antagonisti, che si accumulano nel vitreo durante la malattia e presenti al momento del prelievo chirurgico. Inoltre, l'attività biologica esercitata dal vitreo prelevato da soggetti con RDP potrebbe essere sfruttata per lo screening e la caratterizzazione di nuovi potenziali farmaci in modelli sperimentali preclinici.

## L'ATTIVITÀ BIOLOGICA DEL VITREO RDP

Come precedentemente indicato, il vitreo RDP può essere considerato come una sorta di "serbatoio" nel quale si accumulano citochine e fattori di crescita che la retina produce in risposta all'iperglicemia. Di conseguenza, il vitreo rappresenta uno strumento importante per lo studio delle molecole coinvolte nella patogenesi della RDP. Tuttavia, nonostante le numerose pubblicazioni scientifiche volte a valutare i livelli intravitreali dei vari mediatori biologici nei pazienti RDP, le informazioni ad oggi disponibili riguardo l'effetto diretto dell'umor vitreo sulle cellule endoteliali e/o altre possibili cellule bersaglio sono piuttosto limitate.

Le prime evidenze riguardanti l'attività biologica del vitreo risalgono al 1980, quando Glaser e colleghi dimostrarono che i campioni di vitreo ottenuti dai pazienti diabetici erano in grado di stimolare la crescita delle cellule endoteliali *in vitro*, mentre i campioni ottenuti da pazienti affetti da altre patologie non vascolari non mostravano la medesima

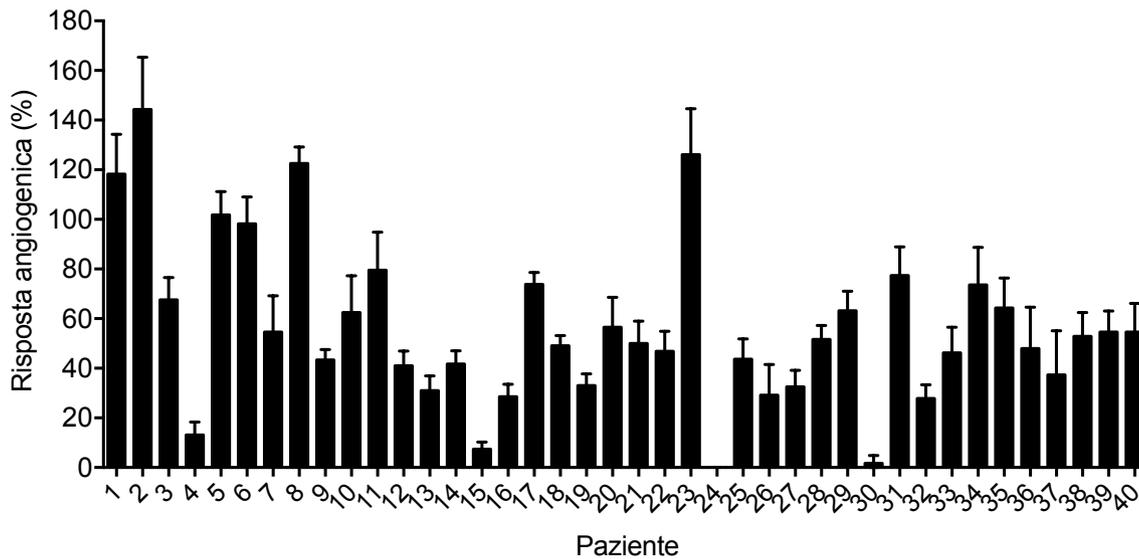
**Figura 4** ♦ Il vitreo RDP induce una risposta pro-angiogenica e pro-infiammatoria nelle cellule endoteliali

Il vitreo RDP, testato in saggi *in vitro* ed *in vivo*, determina una risposta pro-angiogenica e pro-infiammatoria nelle cellule endoteliali, inducendo la formazione di nuovi vasi sanguigni

capacità stimolatoria (73). Successivamente, Aiello e colleghi dimostrarono che campioni di vitreo con elevati livelli di VEGF erano in grado di indurre un aumento significativo del tasso di proliferazione delle cellule endoteliali, inibita da anticorpi neutralizzanti anti-VEGF (58). Queste osservazioni hanno permesso di identificare il VEGF come la principale citochina coinvolta nella progressione della RDP e hanno spianato la strada all'utilizzo degli agenti anti-VEGF nella pratica clinica. Uno studio simile condotto nel 2005 ha dimostrato che anche l'eritropoietina è presente ad elevati livelli nel vitreo dei pazienti con RDP. In questi esperimenti, il blocco simultaneo di eritropoietina e VEGF mediante l'utilizzo di anticorpi neutralizzanti ha permesso di ottenere un'inibizione dell'attività del vitreo maggiore di quella ottenuta bloccando i due fattori singolarmente. Tale effetto inibitorio non è risultato però completo, indicando come anche altri mediatori biologici possano essere implicati nella RDP (74). Ad esempio, è stato dimostrato che IL6 gioca un ruolo nella progressione della malattia, poiché la sua inibizione riduce l'attività angiogenica del vitreo RDP in modelli *in vitro* (75).

Recentemente il nostro laboratorio ha descritto l'attività angiogenica esercitata dal vitreo RDP in vari test *in vitro*, *ex vivo* ed *in vivo* (76-79). I nostri risultati dimostrano che il vitreo diabetico è in grado di regolare positivamente le varie fasi del processo angiogenico nelle cellule endoteliali, inclusa la proliferazione cellulare, la migrazione e il rimodellamento vascolare. Infatti, i campioni di vitreo RDP, testati su cellule endoteliali ottenute da vena di cordone ombelicale umano (HUVEC) inducono un aumento del tasso di proliferazione oltre che una potente risposta migratoria chemiotattica, un incremento nella formazione di gettoni endoteliali e la loro riorganizzazione in strutture simili a capillari. A differenza dei campioni RDP, il vitreo ottenuto da pazienti affetti da foro maculare si è dimostrato invece del tutto inefficace quando testato nelle medesime condizioni sperimentali (76, 78-79). In linea con questi risultati, il vitreo RDP è in grado di stimolare *ex vivo* la gemmazione vascolare da frammenti di retina murina inclusa in gel tridimensionale di fibrina (78, 80), nonché la formazione di vasi capillari quando testato *in vivo* in modelli sperimentali condotti sull'embrione di pollo e nel topo adulto (Fig. 4) (78).

**Figura 5** ♦ **Attività pro-angiogenica di campioni di vitreo ottenuti da pazienti RDP**



40 campioni di vitreo RDP sono stati testati individualmente per valutarne il potenziale pro-angiogenico. A tale scopo, aggregati di cellule endoteliali sono stati inclusi in un gel di fibrina ed incubati con i campioni di vitreo per 24 ore, la risposta pro-angiogenica è stata valutata mediante quantificazione dei gettoni endoteliali ed espressa come percentuale della stimolazione indotta da una dose ottimale di VEGF

È interessante notare come 39 dei 40 campioni di vitreo RDP testati si sono rivelati in grado di stimolare significativamente la formazione di gettoni endoteliali *in vitro*, seppur in modo estremamente eterogeneo (Fig. 5). Tale variabilità è correlata, almeno in parte, ad alcune caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati, tra cui il tipo di terapia per il controllo del diabete, la comorbidità cardiopatica ed i livelli ematici di trigliceridi. Al contrario, sesso, età, tipo e durata del diabete, comorbidità neuropatica o nefropatica, presenza di edema maculare o emovitreo, ipertensione, livelli ematici di glucosio, creatinina, colesterolo, emoglobina totale o emoglobina glicata, terapia laser pre-vitrectomia o trattamento intravitreale con farmaci anti-VEGF non erano significativamente correlati all'attività angiogenica dei campioni (79). Questi dati supportano l'ipotesi che l'umor vitreo possa rappresentare una sorta di "serbatoio" contenente mediatori biologici angiogenici che possono ricapitolare, almeno in parte, i diversi eventi che si sono susseguiti durante la progressione della malattia. Per validare questa ipotesi saranno necessari ulteriori studi su una casistica più numerosa di pazienti.

Come descritto precedentemente, i processi di angiogenesi e infiammazione che avvengono nella RDP sono strettamente correlati tra loro. Sulla base di questa premessa, abbiamo deciso di studiare la capacità dell'umor vitreo di indurre una risposta infiammatoria nelle cellule endoteliali (78). I risultati di questo studio hanno dimostrato come il vitreo RDP sia in grado di indurre la rapida attivazione dei fattori trascrizionali pro-infiammatori come la proteina legante gli elementi di risposta al c-AMP (CREB) e NF-κB, inducendo la produzione di specie reattive dell'ossigeno, l'aumento della permeabilità vascolare e l'incremento dell'adesione di monociti all'endotelio attivato (Fig. 4). Questi risultati sono stati confermati *in vivo*, dove la risposta angiogenica provocata dal vitreo RDP si accompagna alla presenza di un importante infiltrato di cellule infiammatorie. Questa stretta correlazione tra angiogenesi e infiammazione è confermata dalla capacità dell'idrocortisone, ma non dell'anti-VEGF bevacizumab, di abrogare completamente entrambe le risposte, indicando un ruolo non ridondante dell'infiammazione nel processo angiogenico indotto dal vitreo RDP (78). A supporto di questo risultato il trattamento con adiponectina, una molecola anti-infiammatoria presente nell'umor vitreo e nell'umor acqueo dei pazienti con RDP (81), inibisce la capacità del vitreo di indurre la formazione di strutture capillare-simili da parte delle cellule endoteliali (82). Inoltre, in linea con il suo po-

tenziale pro-angiogenico e pro-infiammatorio sull'endotelio, il vitreo RDP induce una risposta infiammatoria anche nelle cellule epiteliali pigmentate retiniche umane (83). Infine, la stimolazione di diverse linee cellulari di origine mesodermica e neuroectodermica con vitreo RDP aumenta la concentrazione di calcio citoplasmatico, nonché la produzione di inositolo fosfato (84).

Lo studio dell'impatto del vitreo RDP su diverse cellule bersaglio tra cui cellule endoteliali, periciti, cellule epiteliali pigmentate, cellule di Müller, cellule neuronali e monociti/macrofagi sarà pertanto fondamentale per la comprensione dei meccanismi stimolatori implicati nelle patologie oculari proliferanti.

## IL VITREO RDP NELLO SVILUPPO DI NUOVI FARMACI

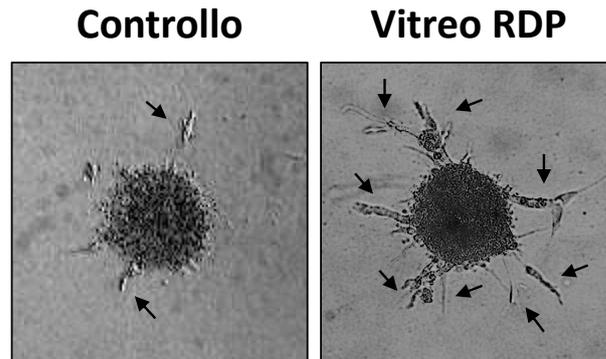
Sebbene il paziente diabetico venga sottoposto ad un rigoroso controllo della glicemia, lipidemia e pressione arteriosa allo scopo di prevenire l'insorgenza di complicanze, la RDP rappresenta la principale causa di cecità negli adulti diabetici di età inferiore ai 65 anni (85). Per diversi anni, la fotocoagulazione panretinica ha rappresentato il pilastro del trattamento della RDP (86). Successivamente, l'analisi dell'umor vitreo RDP ha permesso lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici mirati in grado di sequestrare e neutralizzare il VEGF una volta iniettati in sede vitreale (9). Tuttavia, i trattamenti anti-VEGF non sono privi di effetti collaterali e la presenza di altri fattori intravitreali pro-angiogenici e/o pro-infiammatori può causare resistenza a tali terapie (87). Esiste pertanto la necessità di identificare approcci innovativi più efficaci per la terapia della RDP. In questo contesto, lo studio dell'effetto di potenziali farmaci sull'attività biologica esercitata dal vitreo RDP sulle cellule bersaglio in vari test *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (80, 88-89) può fornire le evidenze sperimentali precliniche necessarie per lo sviluppo di nuovi approcci farmacologici.

Recentemente il nostro laboratorio ha sviluppato un nuovo saggio tridimensionale basato sull'utilizzo di aggregati di cellule endoteliali umane incluse in una matrice tridimensionale di fibrina e trattate con umor vitreo al fine di poter effettuare una caratterizzazione preclinica di inibitori anti-angiogenici extracellulari e intracellulari (79) (Fig. 6). I risultati ottenuti indicano come il vitreo RDP possa indurre la formazione di gettoni endoteliali in modo dose- e tempo-dipendente come conseguenza dell'attivazione di recettori tirosino-chinasici in grado di promuovere la motilità e la proliferazione delle cellule endoteliali. Di conseguenza, gli inibitori di tali recettori, oltre a vari antagonisti specifici per diversi fattori di crescita extracellulari, inibiscono la risposta angiogenica indotta dal vitreo RDP. Un simile effetto inibitorio è stato osservato in presenza di inibitori selettivi per diverse vie di segnalazione intracellulari, come conseguenza dell'ampia gamma di risposte attivate dal vitreo RDP nell'endotelio (78).

In questo test, l'anti-VEGF ranibizumab, somministrato a concentrazioni saturanti e clinicamente rilevanti, inibisce in varia misura l'attività angiogenica esercitata dal vitreo di 20 pazienti con RDP (78). L'attività inibitoria del ranibizumab varia tra lo 0% e il 100% dell'attività esercitata dallo stesso campione in assenza del farmaco e non è correlata alla potenza angiogenica dell'umor vitreo RDP testato. In particolare, non è stata osservata alcuna correlazione significativa tra l'efficacia inibitoria del ranibizumab e le caratteristiche cliniche pre-operatorie dei pazienti RDP esaminati, inclusa la terapia laser pre-vitrectomia o il trattamento intravitreale con farmaci anti-VEGF (78). Risultati simili sono stati ottenuti analizzando l'effetto dell'anti-VEGF bevacizumab su 10 campioni di vitreo RDP (76). Questi dati sono in linea con evidenze cliniche che hanno mostrato una scarsa efficacia delle terapie anti-VEGF in una significativa percentuale di pazienti (90), suggerendo che la mancata azione dei farmaci anti-VEGF possa essere correlata alla presenza di altri mediatori angiogenici nel vitreo di tali pazienti.

In accordo con questa ipotesi, osservazioni precliniche indicano come un derivato altamente solfato del polisaccaride K5 di *Escherichia coli*, denominato K5-N,OS(H), sia in grado di inibire l'attività del vitreo RDP con una potenza significativamente superiore a quella del bevacizumab. Ciò sembra essere la conseguenza della capacità propria di tale polisaccaride di agire da pan-antagonista per una varietà di fattori di crescita angiogenici e citochine/chemochine in grado di legare l'eparina, inclusi VEGF, FGF2, IGF-1, IL8, PDGF, SDF-1 $\alpha$ , CTGF, HGF, HMGB1 e PlGF (76).

Utilizzando un approccio simile, abbiamo recentemente dimostrato che gli inibitori del recettore dei peptidi N-formilati (FPR) Boc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe (Boc-FLFLF) e il tetrapeptide Ac-L-Arg-Aib-L-Arg-L-C $\alpha$ (Me)-Phe-NH<sub>2</sub> (UPARANT)

**Figura 6** ◆ Saggio 3D di angiogenesi *in vitro*

Aggregati di cellule endoteliali inclusi in un gel tridimensionale di fibrina sono stati incubati in assenza (controllo) o in presenza di vitreo RDP. Le frecce indicano la presenza di numerosi gettoni endoteliali indotti dal vitreo RDP

inibiscono la risposta vascolare e infiammatoria indotta *in vivo* dal vitreo RDP nel test dell'embrione di pollo, sollevando l'ipotesi che l'attivazione di recettori FPR possa svolgere un ruolo importante nella risposta vascolare del paziente diabetico (78). A questo proposito, è interessante notare come Boc-FLFLF, oltre ad agire come antagonista di FPR, può anche esercitare un'attività pan-inibitoria contro numerosi fattori di crescita che legano l'eparina, con possibili implicazioni per la terapia della RDP (91).

## CONCLUSIONI

Per ragioni etiche non si possono effettuare biopsie di vitreo umano. Pertanto, l'analisi di tale liquido biologico è possibile solo su campioni ottenuti *post mortem* o in seguito ad intervento di vitrectomia terapeutica (92). Questa procedura viene solitamente eseguita nei pazienti affetti da RD quando la presenza di emovitreo ostacola la vista o quando lo sviluppo di membrane fibrovascolari rischia di indurre il distacco della retina (38). Pertanto, la vitrectomia è principalmente limitata a soggetti diabetici affetti da forme severe di edema o di RDP, rendendo difficile la realizzazione di studi su un ampio numero di pazienti ed escludendo la possibilità di indagare le prime fasi della progressione della RD. Inoltre, data l'impossibilità di ottenere campioni da individui sani, il vitreo utilizzato come controllo di solito proviene da occhi sottoposti a vitrectomia per altre condizioni patologiche, come il foro maculare o la presenza di membrane epiretينية (93).

Un ulteriore aspetto rilevante nell'analisi delle alterazioni molecolari a carico del vitreo di pazienti con RD è la possibilità che il campione vitreale sia alterato dalla presenza di molecole derivanti dal sangue, come conseguenza di emorragie intraoculari (94). Un criterio utile per escludere la possibilità che la concentrazione vitreale di un dato fattore dipenda in realtà da una contaminazione ematica è dato dalla misurazione del suo rapporto di concentrazione vitreo-plasmatica, dove valori  $>1$  indicando un aumento significativo dell'espressione intraoculare di tale fattore (95). Questo criterio si applica ad esempio al VEGF, il cui livello vitreale nei pazienti RDP è significativamente superiore a quello riscontrato nel plasma (96). Al contrario, l'elevata concentrazione intraoculare di IGF-1 sembra essere di origine sierica (97). Studi di proteomica applicati a campioni di sangue e vitreo ottenuti dallo stesso paziente dovrebbero garantire una caratterizzazione dettagliata del profilo proteico del vitreo RDP (98).

Nonostante queste limitazioni, l'umor vitreo RDP raccolto dopo vitrectomia può essere considerato una sorta di deposito contenente citochine, fattori di crescita, fattori neurotrofici e modulatori angiogenici in grado di fornire importanti informazioni riguardo gli eventi che si sono verificati durante la progressione della malattia. Infatti, quando testati in saggi di angiogenesi *in vitro*, i campioni di vitreo RDP modulano una risposta biologica correlata, almeno in parte, ad

alcune caratteristiche cliniche preoperatorie dei pazienti arruolati (79). Per chiarire la relazione esistente tra l'attività biologica dei campioni vitreali e la concentrazione dei diversi mediatori biologici, nonché la loro capacità di riflettere la storia clinica dei pazienti, saranno necessari ulteriori studi effettuati su più ampie coorti di soggetti.

Vari modelli sperimentali *in vivo* di RD sono stati stabiliti nel corso degli anni (99). Tuttavia, stante la natura multifattoriale, ambientale e genetica della patologia, nessun modello esistente riesce a replicare tutte le caratteristiche della RD/RDP. Ad esempio, nonostante i modelli diabetici murini riproducano alcuni eventi importanti della RD, come la rottura della barriera emato-retinica, l'ispessimento della membrana basale dei capillari, la perdita dei periciti e l'occlusione capillare, tali modelli non sviluppano microaneurismi né neovascolarizzazione retinica. Per replicare le fasi tardive di retinopatia sono infatti necessari modelli animali più complessi e simili all'uomo (100). Ciononostante, questi modelli hanno contribuito ad ampliare le conoscenze sulla patogenesi della RDP e sono stati utilizzati con successo per testare l'efficacia di nuovi potenziali farmaci. Sviluppare nuovi modelli animali che riproducano più da vicino il microambiente vitreale resta tuttavia un obiettivo di cruciale importanza per poter studiare nuove terapie da traslare nella pratica clinica. In questo contesto, l'utilizzo del vitreo RDP come stimolo pro-angiogenico/pro-infiammatorio in diversi modelli sperimentali garantirà un ulteriore accrescimento delle conoscenze sulla patogenesi della malattia e potrà rappresentare un approccio alternativo e/o complementare a quelli ad oggi utilizzati per l'identificazione e caratterizzazione di nuovi farmaci per la terapia della RD.

### Ringraziamenti

Le autrici desiderano ringraziare il Prof. Marco Presta, il Prof. Francesco Semeraro, la Dott.ssa Anna Cancarini e il Dott. Mohd I. Nawaz per il loro contributo scientifico.

Parte di questo lavoro è stato supportato da fondi elargiti dalla Fondazione Diabete Ricerca (Progetti sostenuti dal Gran Galà di Beneficienza per la ricerca sul diabete – Milano, 24/01/2019), dall'Associazione Garda Vita (Borsa di studio intitolata al Prof. Tosoni) e dalla Fondazione Umberto Veronesi alla Dott.ssa Rezzola.

### Abbreviazioni

AMIR, anomalie della struttura microvascolare intraretinica; Ang, angiopoietina; CST, cortistatina; CTGF, fattore di crescita del tessuto connettivo; EMD, edema maculare diabetico; FGF2, fattore di crescita dei fibroblasti di tipo 2; HGF, fattore di crescita epatocitario; HIF-1 $\alpha$ , fattore indotto dall'ipossia di tipo 1; HUVEC, cellule endoteliali ottenute da vena di cordone ombelicale umano; ICAM-1, molecola di adesione intracellulare di tipo 1; IGF-1, fattore di crescita insulino-simile di tipo 1; IL, interleuchina; PDGF, fattore di crescita derivato dalle piastrine; PEDF, fattore derivato dall'epitelio pigmentato; PIGF, fattore di crescita placentare; RD, retinopatia diabetica; RDNP; retinopatia diabetica non proliferante; RDP, retinopatia diabetica proliferante; SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, fattore di crescita derivato dalle cellule stromali di tipo 1; TNF $\alpha$ , fattore di necrosi tumorale; VEGF, fattore di crescita dell'endotelio vascolare.

### BIBLIOGRAFIA

1. Bishop PN. Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel. *Prog Retin Eye Res* 19: 323-344, 2000.
2. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas. (2019). <http://www.diabetesatlas.org/>.
3. Simo R, Hernandez C. Novel approaches for treating diabetic retinopathy based on recent pathogenic evidence. *Prog Retin Eye Res* 48: 160-180, 2015.
4. Wong TY, Cheung CM, Larsen M et al. Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Primers* 2: 16012, 2016.
5. Hammes HP. Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond. *Diabetologia* 61: 29-38, 2018.
6. Lee CS, Lee AY, Sim DA et al. Reevaluating the definition of intraretinal microvascular abnormalities and neovascularization elsewhere in diabetic retinopathy using optical coherence tomography and fluorescein angiography. *Am J Ophthalmol* 159: 101-110 e101, 2015.

7. Jawa A, Kcomt J, Fonseca VA. Diabetic nephropathy and retinopathy. *Med Clin North Am* 88: 1001-1036, xi, 2004.
8. Semeraro F, Cancarini A, dell'Omo R et al. Diabetic Retinopathy: Vascular and Inflammatory Disease. *J Diabetes Res* 2015: 582060, 2015.
9. Schmidt-Erfurth U, Garcia-Arumi J, Bandello F et al. Guidelines for the Management of Diabetic Macular Edema by the European Society of Retina Specialists (EURETINA). *Ophthalmologica* 237: 185-222, 2017.
10. Joshi S, Karule PT. A review on exudates detection methods for diabetic retinopathy. *Biomed Pharmacother* 97: 1454-1460, 2018.
11. Solomon SD, Chew E, Duh EJ et al. Diabetic Retinopathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 40: 412-418, 2017.
12. Sivaprasad S, Pearce E. The unmet need for better risk stratification of non-proliferative diabetic retinopathy. *Diabet Med* 25, 2018.
13. Lee CS, Lee AY, Baughman D et al. The United Kingdom Diabetic Retinopathy Electronic Medical Record Users Group: Report 3: Baseline Retinopathy and Clinical Features Predict Progression of Diabetic Retinopathy. *Am J Ophthalmol* 180: 64-71, 2017.
14. Kroll P, Rodrigues EB, Hoerle S. Pathogenesis and classification of proliferative diabetic vitreoretinopathy. *Ophthalmologica* 221: 78-94, 2007.
15. Muqit MM, Stanga PE. Swept-source optical coherence tomography imaging of the cortical vitreous and the vitreoretinal interface in proliferative diabetic retinopathy: assessment of vitreoschisis, neovascularisation and the internal limiting membrane. *Br J Ophthalmol* 98: 994-997, 2014.
16. Agarwal D, Gelman R, Prospero Ponce C et al. The Vitreomacular Interface in Diabetic Retinopathy. *J Ophthalmol* 2015: 392983, 2015.
17. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395, 2000.
18. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146: 873-887, 2011.
19. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9: 685-693, 2003.
20. Sone H, Kawakami Y, Okuda Y et al. Vascular endothelial growth factor is induced by long-term high glucose concentration and up-regulated by acute glucose deprivation in cultured bovine retinal pigmented epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 221: 193-198, 1996.
21. Pemp B, Polska E, Garhofer G et al. Retinal blood flow in type 1 diabetic patients with no or mild diabetic retinopathy during euglycemic clamp. *Diabetes Care* 33: 2038-2042, 2010.
22. Nguyen HT, van Duinkerken E, Verbraak FD et al. Retinal blood flow is increased in type 1 diabetes mellitus patients with advanced stages of retinopathy. *BMC Endocr Disord* 16: 25, 2016.
23. Yamada Y, Suzuma K, Onizuka N et al. Evaluation of retinal blood flow before and after panretinal photocoagulation using pattern scan laser for diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 42: 1707-1712, 2017.
24. Lorenzi M, Feke GT, Cagliero E et al. Retinal haemodynamics in individuals with well-controlled type 1 diabetes. *Diabetologia* 51: 361-364, 2008.
25. Vermes I, Steinmetz ET, Zeyen LJ et al. Rheological properties of white blood cells are changed in diabetic patients with microvascular complications. *Diabetologia* 30: 434-436, 1987.
26. Loukovaara S, Koivunen P, Ingles M et al. Elevated protein carbonyl and HIF-1alpha levels in eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol* 92: 323-327, 2014.
27. Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature* 438: 960-966, 2005.
28. Spranger J, Osterhoff M, Reimann M et al. Loss of the antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease. *Diabetes* 50: 2641-2645, 2001.
29. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-257, 2000.
30. Zijlstra A, Seandel M, Kupriyanova TA et al. Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells. *Blood* 107: 317-327, 2006.
31. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 7: 803-815, 2007.

32. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 18: 7908-7916, 1999.
33. Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F et al. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol* 25: 201-209, 2004.
34. Naldini A, Leali D, Pucci A et al. Cutting edge: IL-1beta mediates the proangiogenic activity of osteopontin-activated human monocytes. *J Immunol* 177: 4267-4270, 2006.
35. Angelo LS, Kurzrock R. Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clin Cancer Res* 13: 2825-2830, 2007.
36. dell'Omo R, Semeraro F, Bamonte G et al. Vitreous mediators in retinal hypoxic diseases. *Mediators Inflamm* 2013: 935301, 2013.
37. Tang J, Kern TS. Inflammation in diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res* 30: 343-358, 2011.
38. Abcouwer SF. Angiogenic Factors and Cytokines in Diabetic Retinopathy. *J Clin Cell Immunol Suppl* 1: 2013.
39. Danis RP, Ciulla TA, Criswell M et al. Anti-angiogenic therapy of proliferative diabetic retinopathy. *Expert Opin Pharmacother* 2: 395-407, 2001.
40. Stitt AW, Curtis TM, Chen M et al. The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res* 51:156-186, 2016.
41. Patel JI, Hykin PG, Gregor ZJ et al. Angiopoietin concentrations in diabetic retinopathy. *British Journal of Ophthalmology* 89: 480-483, 2005.
42. Abu El-Asrar AM, Imtiaz Nawaz M, Kangave D et al. Osteopontin and other regulators of angiogenesis and fibrogenesis in the vitreous from patients with proliferative vitreoretinal disorders. *Mediators Inflamm* 2012: 493043, 2012.
43. Praidou A, Papakonstantinou E, Androudi S et al. Vitreous and serum levels of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor and their correlation in patients with non-proliferative diabetic retinopathy and clinically significant macula oedema. *Acta Ophthalmologica* 89: 248-254, 2011.
44. Semeraro F, Cancarini A, Morescalchi F et al. Serum and intraocular concentrations of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in patients with type 2 diabetes and proliferative retinopathy. *Diabetes Metab* 40: 445-451, 2014.
45. Butler JM, Guthrie SM, Koc M et al. SDF-1 is both necessary and sufficient to promote proliferative retinopathy. *J Clin Invest* 115: 86-93, 2005.
46. Mitamura Y, Tashimo A, Nakamura Y et al. Vitreous levels of placenta growth factor and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 25: 2352, 2002.
47. Sivalingam A, Kenney J, Brown GC et al. Basic fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 108: 869-872, 1990.
48. Canton A, Burgos R, Hernandez C et al. Hepatocyte growth factor in vitreous and serum from patients with proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 84: 732-735, 2000.
49. Hinton DR, Spee C, He S et al. Accumulation of NH<sub>2</sub>-terminal fragment of connective tissue growth factor in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 27: 758-764, 2004.
50. Grant M, Russell B, Fitzgerald C et al. Insulin-Like Growth-Factors in Vitreous - Studies in Control and Diabetic Subjects with Neovascularization. *Diabetes* 35: 416-420, 1986.
51. You JJ, Yang CM, Chen MS et al. Elevation of angiogenic factor Cysteine-rich 61 levels in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Retina* 32: 103-111, 2012.
52. Funatsu H, Yamashita H, Ikeda T et al. Vitreous levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology* 110: 1690-1696, 2003.
53. Wang S, Gottlieb JL, Sorenson CM et al. Modulation of thrombospondin 1 and pigment epithelium-derived factor levels in vitreous fluid of patients with diabetes. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill: 1960)* 127: 507-513, 2009.
54. Boehm BO, Lang G, Volpert O et al. Low content of the natural ocular anti-angiogenic agent pigment epithelium-derived factor (PEDF) in aqueous humor predicts progression of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 46: 394-400, 2003.

55. Simo R, Sundstrom JM, Antonetti DA. Ocular Anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: the role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 37: 893-899, 2014.
56. Wirostko B, Wong TY, Simo R. Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Progress in Retinal and Eye Research* 27: 608-621, 2008.
57. Koch S, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a006502, 2012.
58. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331: 1480-1487, 1994.
59. Mesquita J, Castro de Sousa JP, Vaz-Pereira S et al. VEGF-B Levels in the Vitreous of Diabetic and Non-Diabetic Patients with Ocular Diseases and Its Correlation with Structural Parameters. *Med Sci (Basel)* 5: 2017.
60. Kinoshita S, Noda K, Saito W et al. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor-B in proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol* 94: e521-523, 2016.
61. Penn JS, Madan A, Caldwell RB et al. Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 27: 331-371, 2008.
62. Joussen AM, Poulaki V, Qin W et al. Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion in vivo. *The American journal of pathology* 160: 501-509, 2002.
63. Zhou J, Wang S, Xia X. Role of intravitreal inflammatory cytokines and angiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 37: 416-420, 2012.
64. Capitaio M, Soares R. Angiogenesis and Inflammation Crosstalk in Diabetic Retinopathy. *J Cell Biochem* 117: 2443-2453, 2016.
65. Hirase K, Ikeda T, Sotozono C et al. Transforming growth factor beta2 in the vitreous in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 116: 738-741, 1998.
66. Spranger J, Hammes HP, Preissner KT et al. Release of the angiogenesis inhibitor angiostatin in patients with proliferative diabetic retinopathy: association with retinal photocoagulation. *Diabetologia* 43: 1404-1407, 2000.
67. Funatsu H, Yamashita H, Noma H et al. Outcome of vitreous surgery and the balance between vascular endothelial growth factor and endostatin. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44: 1042-1047, 2003.
68. Nawaz MI, Van Raemdonck K, Mohammad G et al. Autocrine CCL2, CXCL4, CXCL9 and CXCL10 signal in retinal endothelial cells and are enhanced in diabetic retinopathy. *Experimental Eye Research* 109: 67-76, 2013.
69. Abu El-Asrar AM, Nawaz MI, Ola MS et al. Expression of thrombospondin-2 as a marker in proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol* 91 :e169-177, 2013.
70. Sato H, Abe T, Wakusawa R et al. Vitreous levels of vasohibin-1 and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia* 52: 359-361, 2009.
71. Nishikiori N, Mitamura Y, Tashimo A et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 28: 2588, 2005.
72. Vujosevic S, Simo R. Local and Systemic Inflammatory Biomarkers of Diabetic Retinopathy: An Integrative Approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58: BIO68-BIO75, 2017.
73. Glaser BM, D'Amore PA, Michels RG et al. The demonstration of angiogenic activity from ocular tissues. Preliminary report. *Ophthalmology* 87: 440-446, 1980.
74. Watanabe D, Suzuma K, Matsui S et al. Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 353: 782-792, 2005.
75. Murugeswari P, Shukla D, Kim R et al. Angiogenic potential of vitreous from Proliferative Diabetic Retinopathy and Eales' Disease patients. *PLoS One* 9: e107551, 2014.
76. Rezzola S, Dal Monte M, Belleri M et al. Therapeutic Potential of Anti-Angiogenic Multitarget N,O-Sulfated E. Coli K5 Polysaccharide in Diabetic Retinopathy. *Diabetes* 64: 2581-2592, 2015.

77. Dal Monte M, Rezzola S, Cammalleri M et al. Antiangiogenic Effectiveness of the Urokinase Receptor-Derived Peptide UPARANT in a Model of Oxygen-Induced Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56: 2392-2407, 2015.
78. Rezzola S, Corsini M, Chiodelli P et al. Inflammation and N-formyl peptide receptors mediate the angiogenic activity of human vitreous humor in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2017.
79. Rezzola S, Nawaz IM, Cancarini A et al. 3D endothelial cell spheroid/human vitreous humor assay for the characterization of anti-angiogenic inhibitors for the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Angiogenesis* 20: 629-640, 2017.
80. Rezzola S, Belleri M, Ribatti D et al. A novel ex vivo murine retina angiogenesis (EMRA) assay. *Exp Eye Res* 112: 51-56, 2013.
81. Costagliola C, Daniele A, dell'Omo R et al. Aqueous humor levels of vascular endothelial growth factor and adiponectin in patients with type 2 diabetes before and after intravitreal bevacizumab injection. *Exp Eye Res* 110: 50-54, 2013.
82. Palanisamy K, Nareshkumar RN, Sivagurunathan S et al. Anti-angiogenic effect of adiponectin in human primary microvascular and macrovascular endothelial cells. *Microvasc Res* 2018.
83. Parapuram SK, Ganti R, Hunt RC et al. Vitreous induces components of the prostaglandin E2 pathway in human retinal pigment epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 44: 1767-1774, 2003.
84. Pombo C, Bokser L, Casabiell X et al. Partial characterization of a putative new growth factor present in pathological human vitreous. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234: 155-163, 1996.
85. Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 366: 1227-1239, 2012.
86. Evans JR, Michelessi M, Virgili G. Laser photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy. *Cochrane Database Syst Rev* CD011234, 2014.
87. Kieran MW, Kalluri R, Cho YJ. The VEGF pathway in cancer and disease: responses, resistance, and the path forward. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a006593, 2012.
88. Rezzola S, Belleri M, Gariano G et al. In vitro and ex vivo retina angiogenesis assays. *Angiogenesis* 17: 429-442, 2014.
89. Rezzola S, Paganini G, Semeraro F et al. Zebrafish (*Danio rerio*) embryo as a platform for the identification of novel angiogenesis inhibitors of retinal vascular diseases. *Biochim Biophys Acta* 1862: 1291-1296, 2016.
90. Cheung N, Wong IY, Wong TY. Ocular anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: overview of clinical efficacy and evolving applications. *Diabetes Care* 37: 900-905, 2014.
91. Nawaz IM, Chiodelli P, Rezzola S et al. N-tert-butylloxycarbonyl-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe (BOC<sub>2</sub>) inhibits the angiogenic activity of heparin-binding growth factors. *Angiogenesis* 21: 47-59, 2018.
92. Kokavec J, Min SH, Tan MH et al. Biochemical analysis of the living human vitreous. *Clin Exp Ophthalmol* 44: 597-609, 2016.
93. Simo-Servat O, Hernandez C, Simo R. Usefulness of the vitreous fluid analysis in the translational research of diabetic retinopathy. *Mediators Inflamm* 2012: 872978, 2012.
94. Angi M, Kalirai H, Coupland SE et al. Proteomic analyses of the vitreous humor. *Mediators Inflamm* 2012: 148039, 2012.
95. Gustavsson C, Agardh CD, Agardh E. Profile of intraocular tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in diabetic subjects with different degrees of diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol* 91: 445-452, 2013.
96. Wakabayashi Y, Usui Y, Okunuki Y et al. Correlation of vascular endothelial growth factor with chemokines in the vitreous in diabetic retinopathy. *Retina* 30: 339-344, 2010.
97. Burgos R, Mateo C, Canton A et al. Vitreous levels of IGF-I, IGF binding protein 1, and IGF binding protein 3 in proliferative diabetic retinopathy: a case-control study. *Diabetes Care* 23: 80-83, 2000.
98. Balaiya S, Zhou Z, Chalam KV. Characterization of Vitreous and Aqueous Proteome in Humans With Proliferative Diabetic Retinopathy and Its Clinical Correlation. *Proteomics insights* 8: 1178641816686078, 2017.
99. Malek G, Busik J, Grant MB et al. Models of retinal diseases and their applicability in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 13: 359-377, 2018.
100. Olivares AM, Althoff K, Chen GF et al. Animal Models of Diabetic Retinopathy. *Curr Diab Rep* 17: 93, 2017.