



**DIABETES MELLITUS Y BARRERA HEMATORRETINIANA.
ANÁLISIS *IN VITRO* DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE
TIGHT JUNCTION Y SU TRADUCCIÓN FUNCIONAL.
IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS**

Marta Villarroel Fandos

TESIS DOCTORAL

Barcelona, 2015

Laboratori de Diabetis i Metabolisme
Vall d'Hebron Institut de Recerca

Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular
Universitat Autònoma de Barcelona



TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorat en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina

Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular

**DIABETES MELLITUS Y BARRERA HEMATORRETINIANA.
ANÁLISIS *IN VITRO* DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE
TIGHT JUNCTION Y SU TRADUCCIÓN FUNCIONAL.
IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS**

Memoria presentada por

Marta Villarroel Fandos

para optar al grado de Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina
por la Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2015

Dr. Rafael Simó Canonge
Director

Dra. Cristina Hernández Pascual
Director

Dra. Marta Garcia-Ramírez
Director

Dr. Joan Xavier Comella Carnicé
Tutor

Marta Villarroel Fandos
Doctorando

*A mi padre, a mi abuelo,
a toda mi familia y a mi amor*

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	15
1. LA RETINOPATÍA DIABÉTICA	17
1.1. EPIDEMIOLOGÍA	17
1.2. PATOFISIOLOGÍA	18
1.2.1. Bases bioquímicas	18
1.2.2. Neurodegeneración	20
1.2.3. Alteraciones de la microcirculación	22
1.2.4. Edema macular diabético	24
1.3. TRATAMIENTO	27
1.3.1. Control de los factores de riesgo	27
1.3.2. Fotocoagulación con láser	27
1.3.3. Vitrectomía	28
1.3.4. Terapias farmacológicas	28
1.3.5. Nuevas perspectivas terapéuticas	30
2. FISIOPATOLOGÍA DE LA BARRERA HEMATORRETINIANA	32
2.1. COMPOSICIÓN	32
2.1.1. Retina	32
2.1.2. Barrera hematorretiniana	34
2.1.3. Epitelio pigmentario de la retina	38
2.2. LÍNEA CELULAR ARPE-19	45
2.3. TIGHT JUNCTIONS (UNIONES CELULARES ESTRECHAS)	48
2.3.1. Función y estructura	48
2.3.2. Resistencia eléctrica transepitelial y permeabilidad	52

2.3.3. Componentes	53
2.3.3.1. Ocludina	54
2.3.3.2. Claudinas	56
2.3.3.3. Zonula Occludens	59
3. AMPK	63
3.1. ESTRUCTURA	63
3.2. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD	64
3.3. FUNCIONES	66
4. MATRIZ EXTRACELULAR	68
4.1. ESTRUCTURA	68
4.2. COMPOSICIÓN	69
4.2.1. Colágeno IV	70
4.2.2. Fibronectina	70
4.2.3. Laminina	71
4.2.4. Heparán sulfato	71
4.3. FUNCIONES	72
4.4. MATRIZ EXTRACELULAR Y RETINOPATÍA DIABÉTICA	73
5. EFECTO DEL FENOFIBRATO EN LA RETINOPATÍA DIABÉTICA	76
5.1. FARMACOCINÉTICA	76
5.2. FARMACODINÁMICA	77
5.2.1. PPARs	77
5.2.2. Mecanismos de acción	79
5.3. ESTUDIOS CLÍNICOS	82
5.3.1. Estudio FIELD	82
5.3.2. Estudio ACCORD	84

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	87
RESULTADOS	91
CAPÍTULO I: <i>Efecto de la hiperglicemia sobre la funcionalidad de la barrera hematorretiniana externa y la expresión de las proteínas de tight junction en células de epitelio pigmentario de la retina humana (ARPE-19).</i>	93
CAPÍTULO II: <i>Efecto protector del ácido fenofibrico sobre la disrupción del epitelio pigmentario de la retina inducida por la IL-1b a través de la supresión de la activación de la vía de la AMPK.</i>	105
DISCUSIÓN	123
CONCLUSIONES	141
BIBLIOGRAFÍA	145
ANEXO	171

ABREVIATURAS

Abreviaturas

ACCORD	Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AGEs	Productos avanzados de la glicación
AICAR	Ribósido de 5-aminoimidazol-4-carboxamida
AMD	Degeneración macular asociada a la edad
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Quinasa activa por monofosfato de adenina
Apo	Apolipoproteína
ATP	Adenosín trifosfato
BDNF	Factor de crecimiento derivado del cerebro
BHA	Barrera hematoacuosa
BHE	Barrera hematoencefálica
BHR	Barrera hematorretiniana
BM	Membrana de Bruch
BREC	Células endoteliales de retina bovina
CaMKK β	Proteína quinasa dependiente de calcio-calmodulina β
CBS	Dominio identificado en la enzima cistationina- β -sintasa
CK	Caseína quinasa
C _{max}	Concentración máxima
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
COX	Ciclooxigenasa
CRALBP	Proteína celular de unión al 11- <i>cis</i> -retinaldehído
CSF	Factores estimulantes de colonias
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
DAG	Diacilglicerol
DHA	Ácido docosahexaenoico
DM	Diabetes mellitus

ABREVIATURAS

DME	Edema macular diabético
DR	Retinopatía diabética
EL	Capa de elastina
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EPCs	Células endoteliales progenitoras
Epo	Eritropoyetina
Epo-R	Receptor de eritropoyetina
ETDRS	Early Treatment Diabetic Retinopathy Study
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Factores de crecimiento de fibroblastos
FHHNC	Hipomagnesemia familiar con hipercalciuria y nefrocalcinosis
FIELD	Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes Study
GADPH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GCL	Capa de células ganglionares
GBD	Dominio de unión a glucógeno
GFAP	Proteína ácida fibrilar de la glía
GLAST	Transportador de glutamato/aspartato
GMP	Guanosín monofosfato
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
GuK	Guanilato quinasa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HGMEC	Células endoteliales humanas de la microvasculatura glomerular
HIF-1	Factor inducible por la hipoxia 1
HREC	Células endoteliales humanas de retina
HUVEC	Células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical
ICL	Capa de colágeno interna
IFN- γ	Interferón γ
IGF-I	Factor de crecimiento insulínico tipo I
IL	Interleuquina

INL	Capa nuclear interna
IPL	Capa plexiforme interna
IRBP	Proteína de unión a interfotorreceptores retinoides
IRMAs	Anomalías microvasculares intrarretinianas
JAM	Molécula de adhesión de la unión
kDa	kiloDalton
KO	Knockout
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LEDGF	Factor de crecimiento derivado el epitelio de la lente
LPL	Lipoproteína lipasa
Lp-PLA2	Fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína
MAGI	Guanilato quinasa invertida asociada a la membrana
MAGUK	Guanilato quinasas asociadas a la membrana
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MDCK	Células de epitelio de riñón canino Madin-Darby
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MMP	Metaloproteinasa
MUPP1	Proteína 1 con múltiples dominios PDZ
NACos	Proteínas asociadas con el núcleo y complejos de adhesión
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
NO	Óxido nítrico
NPD1	Neuroprotectina D1
NPDR	Retinopatía diabética no proliferativa
NT-3	Neurotropina 3
OCL	Capa de colágeno externa
OCT	Tomografía óptica de coherencia

ABREVIATURAS

ONL	Capa nuclear externa
OPL	Capa plexiforme externa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PDR	Retinopatía diabética proliferativa
PDZ	Acrónimo derivado de las 3 primeras proteínas en las que se descubrió el dominio: PSD-95, Discs-large A y ZO-1
PEDF	Factor derivado del epitelio pigmentario
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLGF	Factor de crecimiento placentario
PPARs	Receptores activadores de la proliferación de peroxisomas
PPREs	Elementos de respuesta a PPARs
PP2C	Proteína fosfatasa 2C
RAS	Sistema Renina Angiotensina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPE	Epitelio pigmentario de la retina
RPE65	Proteína específica del epitelio pigmentario de la retina 65 kDa
RXR	Receptor x retinoide
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SH3	Dominio de homología al dominio 3 de la proteína Src
shRNA	ARN de horquilla pequeña
siRNA	ARN pequeño de interferencia
SST	Somatostatina
SSTR	Receptor de somatostatina
TAK1	Proteína quinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante β
TEER	Resistencia eléctrica transendotelial
TER	Resistencia eléctrica transepitelial
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
Thr	Treonina
TIMP	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas de matriz

TJ	Tight junctions (uniones celulares estrechas)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
ZAK	Quinasa asociada a ZO-1
ZO-1	Zonula occludens 1
ZONAB	Factor de transcripción asociado a ZO-1

INTRODUCCIÓN

1. LA RETINOPATÍA DIABÉTICA

1.1. EPIDEMIOLOGÍA

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica muy prevalente y se estima que la cifra de pacientes diabéticos crecerá de forma exponencial en los próximos años (pasará de 366 millones de personas en 2011 a 552 millones en 2030). Según el estudio Di@betes la prevalencia de la DM en España es del 13,8%¹.

La retinopatía diabética (DR) es la complicación microangiopática más frecuente de la diabetes y la principal causa de ceguera en la población en edad laboral en los países industrializados. El estudio epidemiológico de Wisconsin reveló que a los 15 años del diagnóstico, el 98% de los pacientes afectados de diabetes mellitus tipo 1 y el 78% de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 presentaban DR. Durante el mismo periodo el 33% de los pacientes con diabetes tipo 1 y el 17% de los pacientes con diabetes tipo 2 presentarán retinopatía diabética proliferativa (PDR), la principal causa de ceguera en los pacientes con diabetes tipo 1. La gran mayoría de pacientes con diabetes tipo 2 no van a desarrollar PDR, sino que es mucho más frecuente la evolución hacia el edema macular (DME). Se ha comunicado que la incidencia de DME en los pacientes con diabetes tipo 2 puede llegar a casi el 40% en un periodo de seguimiento de 10 años. Por el contrario, en los pacientes con diabetes tipo 1, la incidencia de DME durante el mismo periodo se ha cifrado en un 20%. Dada la mayor prevalencia de la diabetes tipo 2 (>90%), el DME representa la principal causa de disminución de la agudeza visual y ceguera no sólo en los pacientes con diabetes tipo 2, sino en la diabetes en general^{2,3}.

El buen control de la glucemia y de la presión arterial es esencial para prevenir o retardar la progresión de la DR. Sin embargo, los objetivos terapéuticos son difíciles de alcanzar y, en consecuencia, la DR va a presentarse en una elevada proporción de pacientes. Los tratamientos actuales para la DR están indicados en fases avanzadas, tiene una

efectividad limitada y se asocian a importantes efectos secundarios. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevos tratamientos basados en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológico que causan esta complicación.

A continuación se revisan los mecanismos patogénicos que ocasionan la microangiopatía diabética, con especial énfasis en las alteraciones que ocurren en la retina.

1.2. PATOFISIOLOGÍA

1.2.1. Bases bioquímicas

A nivel fisiopatológico, la hiperglicemia mantenida induce una serie de cambios bioquímicos en el metabolismo glucídico, reológicos en el flujo sanguíneo y anatómicos en la pared vascular que son los responsables de la aparición de una microangiopatía a nivel de las arteriolas, capilares y vénulas⁴. Existen cuatro vías metabólicas que se activan en condiciones de hiperglicemia y que contribuyen al daño celular observado en la retina de pacientes diabéticos: la vía de los polioles (o de la aldosa reductasa), la vía de la hexosamina, la síntesis *de novo* de diacilglicerol (DAG) y la activación de la proteína quinasa C (PKC) y la formación de productos avanzados de la glicación (AGEs). El nexo común entre la activación de estos cuatro mecanismos es el estrés oxidativo inducido por la hiperglicemia. La hiperglicemia provoca un aumento de la producción de superóxido a nivel mitocondrial que reduce en un 66% la actividad de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa⁵. La inhibición parcial de esta enzima provoca un aumento en la concentración de algunos metabolitos de la vía glicolítica y su utilización en otras vías metabólicas como las detalladas anteriormente, las cuales están implicadas en el desarrollo de la DR (Fig 1).

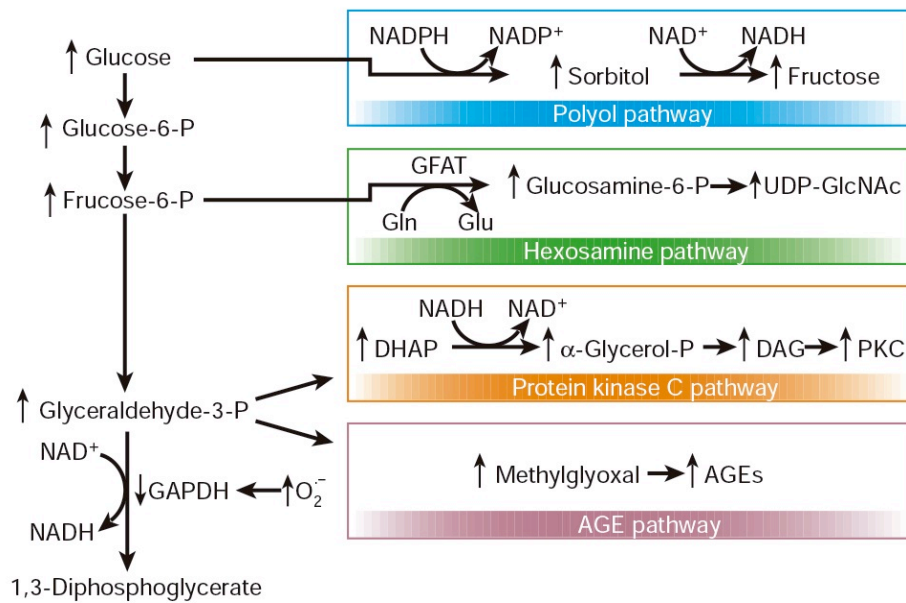


Figura 1. Mecanismos moleculares implicados en el daño celular inducido por hiperglicemia. El estrés oxidativo provoca el aumento de concentración y la entrada de metabolitos de la vía glicolítica en otras vías metabólicas que contribuyen al desarrollo de la DR. DR.: Retinopatía diabética. Extraído de Brownlee M⁵.

En el caso de la vía de los polioles la activación de la aldosa reductasa cataliza el paso de glucosa a sorbitol que posteriormente es oxidado a fructosa. El acúmulo de sorbitol origina un estrés osmótico debido a su capacidad limitada para difundir a través de las membranas. Sin embargo, es el aumento del cociente NADH/NAD y la disminución del NADPH quienes tienen los efectos lesivos más importantes, generando una situación de pseudoisquemia y disminuyendo la producción de glutatión reducido respectivamente, que es uno de los principales mecanismos de eliminación de los radicales libres. En la vía de las hexosaminas la fructosa 6-fosfato actúa como sustrato para la formación de UDP-*N*-acetilglucosamina y la posterior modificación de factores de transcripción y de proteínas implicadas en la patogénesis de la DR. La vía de la PKC está relacionada con la vía de los polioles ya que, en los dos casos, el aumento del cociente NADH/NAD favorece la síntesis *de novo* de DAG, que a su vez es el principal estímulo regulador de la PKC. La activación de la PKC tiene importantes efectos sobre la expresión de moléculas implicadas en mecanismos de vital importancia en la etiopatogenia de la DR como la permeabilidad y el flujo vascular, la angiogénesis, la matriz extracelular y la inflamación. En la última de las vías la glucosa puede

unirse a los grupos amino de las proteínas mediante reacciones no enzimáticas dando lugar a los productos de Amadori. A partir de estos productos, y con la exposición continuada a la hiperglicemia, se generan otros productos más complejos conocidos como AGEs. Los AGEs intracelulares pueden causar daño celular por tres mecanismos principales: reaccionando con proteínas intracelulares y alterando su función, modificando las proteínas de la matriz extracelular provocando interacciones anormales con otros componentes de dicha matriz y alterando las proteínas del plasma que se unirán a receptores de AGEs induciendo la producción de ROS.

1.2.2. Neurodegeneración

Como consecuencia de la activación de las vías metabólicas mencionadas anteriormente se producen una serie de cambios bioquímicos que provocan alteraciones en la retina neural (neurodegeneración) y en los capilares de la parte interna de la retina (microangiopatía)⁶. El proceso de neurodegeneración de la retina ocurre en las primeras etapas de la DR, estando presente antes de que se puedan observar alteraciones en la microcirculación⁷. El concepto de que la neurodegeneración de la retina es un hecho temprano en la patogenia de la DR fue descrito por primera vez por Barber *et al.* y actualmente existen evidencias de que participa en el desarrollo de las alteraciones microvasculares⁸.

En el proceso de neurodegeneración retiniana se observa un aumento de la apoptosis, pérdida gradual de neuronas, expresión alterada de la GFAP en las células de Müller, activación de la microglía y una alteración del metabolismo del glutamato. La acumulación de glutamato y la disminución de factores neuroprotectores como la SST, IRBP y PEDF, inducen el aumento de VEGF participando en la disrupción de la BHR. Asimismo, la pérdida de neuronas y la disfunción glial contribuyen, tanto a la disrupción de la BHR como a la pérdida de pericitos y a la formación de capilares acelulares, afectando a la funcionalidad de la microvasculatura. Finalmente la disminución de las células endoteliales progenitoras (EPCs) observada en pacientes diabéticos, afecta la remodelación vascular y favorece la microangiopatía y la neurodegeneración (Fig 2)⁹. Estos cambios explican parte del déficit de

visión observado en pacientes diabéticos antes de que las alteraciones vasculares sean detectables y muestran la interconexión entre el proceso de neurodegeneración y la microangiopatía en la DR¹⁰.

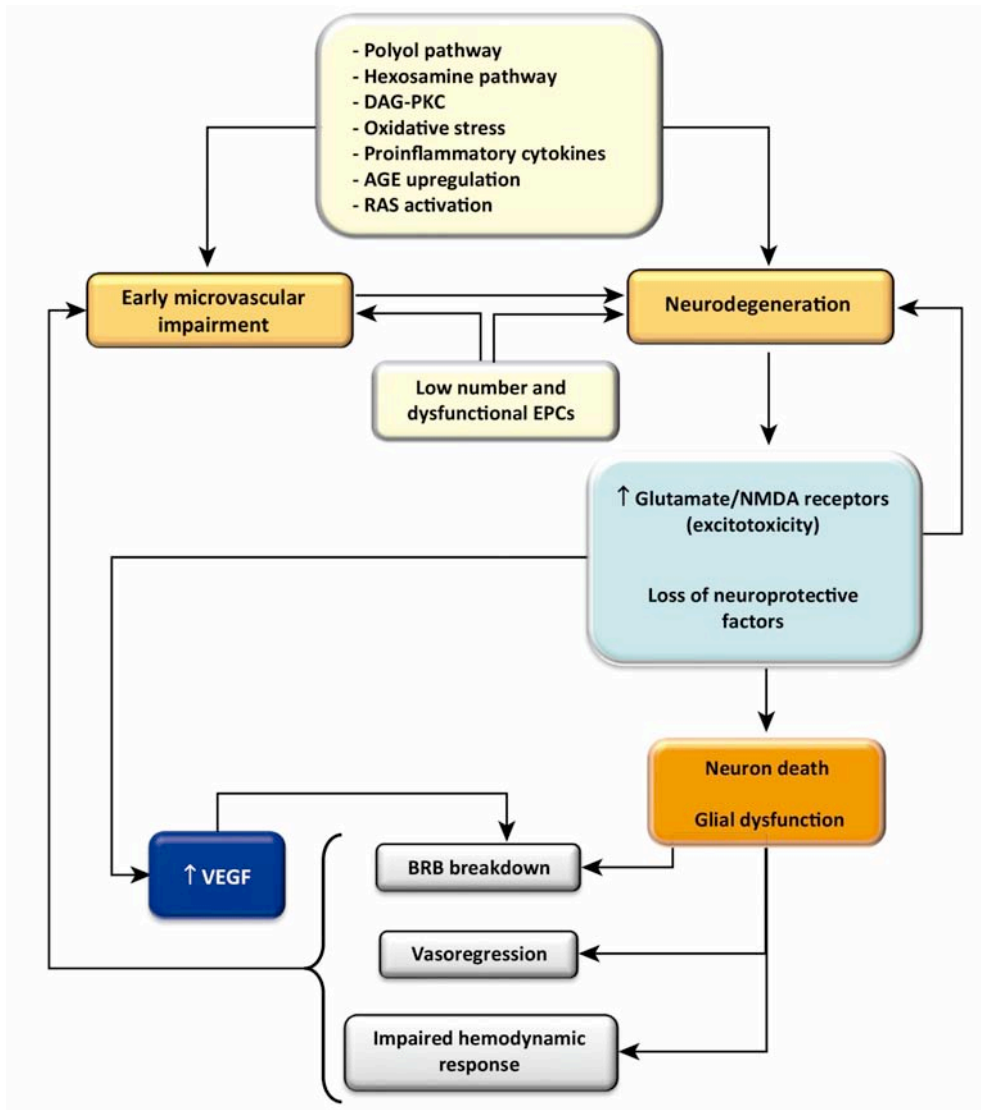


Figura 2. Diagrama donde se muestra la interconexión entre los principales mecanismos implicados en la neurodegeneración y la microangiopatía en el desarrollo de la DR. AGE: Advanced glycation end-products; DAG-PKC: Diacylglycerol-protein kinase C; NMDA: *N*-methyl-*D*-aspartate; RAS: Renin-angiotensin system. Extraído de Simó R y Hernández C⁹.

1.2.3. Alteraciones de la microcirculación

Como se ha explicado en los puntos anteriores, durante los primeros años de evolución de la DR se activan una serie de vías metabólicas y se produce un proceso neurodegenerativo en la retina que contribuyen de manera importante al desarrollo de la enfermedad. Es necesario un periodo de al menos 5 años para que las primeras lesiones vasculares sean detectables en un examen oftalmoscópico¹¹.

Las primeras lesiones vasculares que ocurren en la retina son el engrosamiento de la membrana basal, el daño endotelial, la disrupción de las uniones celulares estrechas (también llamadas *tight junctions*) y la pérdida de los pericitos¹². Estas lesiones se localizan de manera característica en los pequeños vasos sanguíneos del polo posterior de la retina, en concreto en la zona macular¹³. La pérdida de los pericitos tiene una gran repercusión y es el principal factor responsable de las primeras anomalías oftalmoscópicas. Estas células regulan el tono vascular de los capilares gracias a los filamentos de actina que contienen e inhiben la proliferación de las células endoteliales mediante la producción de TGF- β ^{14,15}. El engrosamiento de la membrana basal impide el contacto entre los pericitos y las células endoteliales, dificultando así la nutrición de estos y contribuyendo a su muerte por apoptosis. Como consecuencia de la pérdida de pericitos hay una pérdida del tono vascular y un déficit de TGF- β que favorece la proliferación de las células endoteliales. Estos cambios son cruciales para el desarrollo de microaneurismas y hemorragias intrarretinianas que son unas de las primeras alteraciones que se pueden observar en la *retinopatía diabética no proliferativa* (NPDR). Además aparecen exudados duros que son el resultado del paso de componentes del plasma al espacio intersticial, especialmente lípidos y proteínas, como consecuencia del aumento de la permeabilidad causado por la alteración de la membrana basal y la disrupción de las uniones estrechas de las células endoteliales de los capilares (Fig 3 B).

En estadios avanzados de la retinopatía diabética no proliferativa se observa muerte de las células endoteliales que hasta ahora estaban dañadas, quedando los capilares recubiertos solamente por una gruesa membrana basal. Estos capilares son muy trombogénicos y pueden obstruirse debido a la agregación plaquetaria o por la adhesión de

leucocitos a las paredes de los vasos (leucostasis). Este hecho se traduce en la observación en el examen fundoscópico de exudados blandos o algodonosos, que son engrosamientos isquémicos de la capa de fibras nerviosas e indican áreas de importante isquemia. También se observan dilataciones venosas y vasos finos de calibre irregular y trayecto tortuoso diferentes a la arquitectura vascular retiniana, denominados anomalías microvasculares intrarretinianas (IRMAs). Este estadio se conoce como *retinopatía diabética preproliferativa* (Fig 3 C).

Con el empeoramiento de la enfermedad se alcanza el estadio más severo de la retinopatía diabética, conocido como *retinopatía diabética proliferativa* (PDR) y caracterizado por la neovascularización. La hipoxia producida por la obstrucción de los capilares estimula la producción de factores angiogénicos a través del factor inducible por la hipoxia (HIF-1)¹⁶. Estos factores promueven la proliferación de las células endoteliales y aumentan la expresión de proteasas e integrinas, las cuales son importantes para la migración celular. Entre todos los factores angiogénicos, el VEGF es el más crítico en la patogénesis de la DR y el DME¹⁷. Además de estimular la producción de estos factores, la hipoxia también disminuye la síntesis de factores antiangiogénicos como el PEDF^{18,19}, rompiendo el balance existente en condiciones normales entre estos dos tipos de factores y que mantiene el vítreo como una zona avascular. De este modo se favorece la formación de nuevos vasos sanguíneos para solucionar la situación de isquemia, pero estos vasos son frágiles y tienden a sangrar. Crecen hacia el vítreo y están anclados a tejido fibrótico que puede contraerse y provocar un desprendimiento de retina. En el examen fundoscópico se observan neovasos así como grandes hemorragias y membranas epirretinianas formadas por dicho tejido fibrótico (Fig 3 D).

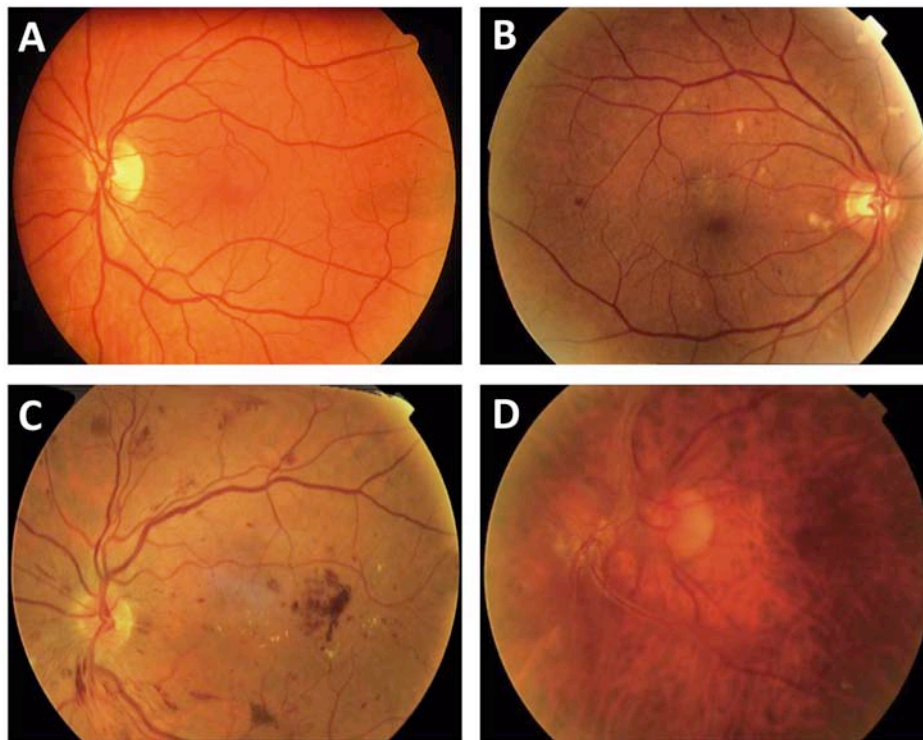


Figura 3. Imágenes de fondo de ojo correspondientes a diferentes etapas en la evolución de la retinopatía diabética. (A) Fondo de ojo de paciente normal. (B) NPDR moderada, donde aparecen microaneurismas, microhemorragias y exudados. (C) NPDR grave, donde se observan microhemorragias intrarretinianas en los cuatro cuadrantes y en número superior a 20, así como exudados duros y microaneurismas. (D) PDR, existe proliferación fibrovascular con tracción retiniana y neovascularización. NPDR: Retinopatía diabética no proliferativa; PDR: Retinopatía diabética proliferativa.

1.2.4. Edema macular diabético

Como se ha explicado en el punto anterior, la primera de las etapas en la evolución de la retinopatía diabética es la retinopatía diabética no proliferativa (NPDR). A partir de aquí la historia natural de la enfermedad puede seguir dos caminos diferentes sin ser excluyentes el uno del otro (Fig 4). Uno de ellos es evolucionar hacia PDR, donde existe un desequilibrio entre factores angiogénicos y antiangiogénicos producido por la hipoxia que favorece la neovascularización. Este proceso es más común en pacientes diabéticos tipo 1. El otro camino es la evolución hacia el edema macular diabético (DME). En este caso se observa una rotura de la barrera hematorretiniana (BHR) que provoca la acumulación de líquido

extracelular en la mácula y la consiguiente pérdida de la agudeza visual. El DME puede desarrollarse asociado a diferentes grados de DR y es más frecuentes en personas de edad avanzada y con DM tipo 2. El 10% de pacientes con NPDR moderada presentan DME, aumentando hasta un 70% en casos de PDR severa²⁰.

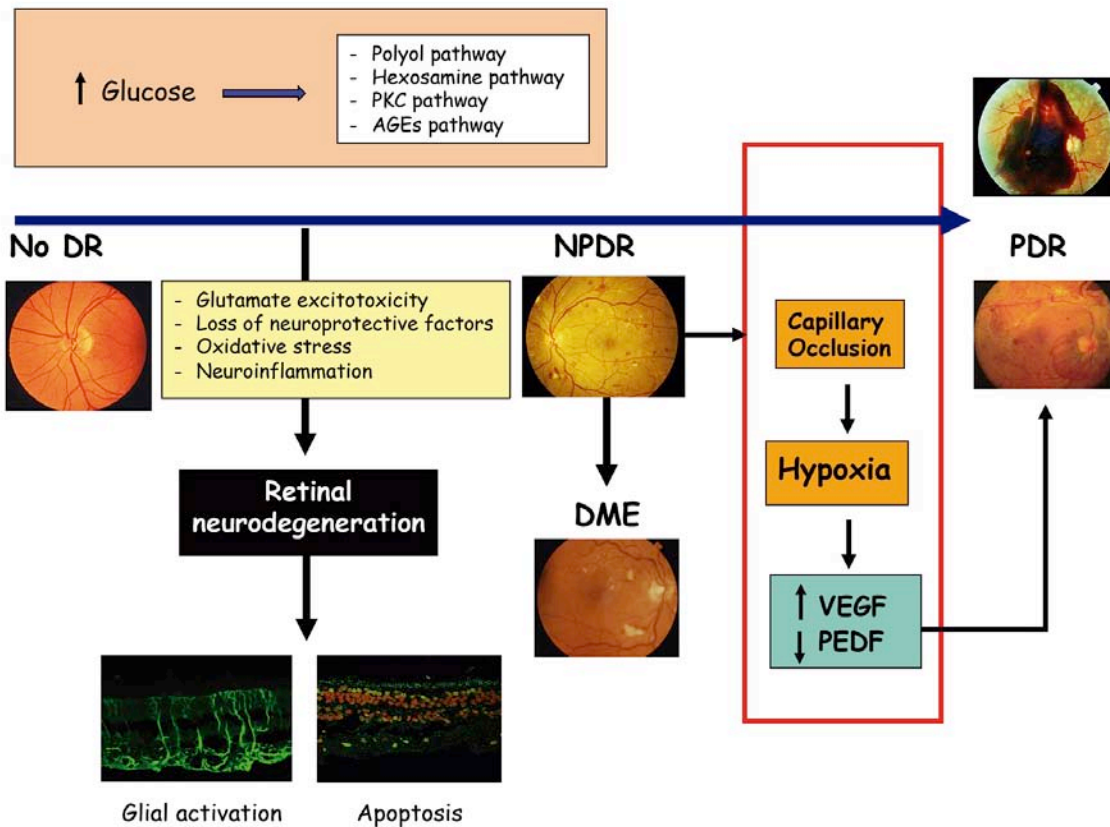


Figura 4. Diagrama donde se muestra la evolución de la DR hacia PDR o DME. DME: Edema macular diabético; DR: Retinopatía diabética; NPDR: Retinopatía diabética no proliferativa; PDR: Retinopatía diabética proliferativa. Adaptado de Simó R y Hernández C¹¹.

El DME es la principal causa de disminución de la agudeza visual en pacientes diabéticos. La manifestación clínica más relevante es una disminución de la visión central, asociada a la deformación de las imágenes y visión borrosa (Fig 5). El líquido acumulado en la mácula, que es la parte del ojo que provee la visión central clara, hace que ésta se inflame nublando la visión.



Figura 5. Síntomas del DME: disminución de la agudeza visual, deformación de imágenes y visión borrosa. (A) Visión normal. (B) Visión paciente con DME. DME: Edema macular diabético. Adaptado de www.gene.com

El DME se produce por el aumento de la permeabilidad vascular debido a la rotura de BHR. El incremento de mediadores inflamatorios como citoquinas, quimiocinas, angiotensina II, prostaglandinas, metaloproteinasas de matriz, selectinas, moléculas de adhesión celular (VCAM-1, ICAM-1) y células inflamatorias (macrófagos, neutrófilos y leucocitos) son elementos cruciales en el desarrollo del DME²¹.

Como se explica más adelante, la BHR se divide en dos partes, una interna formada por el endotelio vascular de la retina y otra externa constituida por las uniones celulares estrechas del epitelio pigmentario de la retina (RPE). En pacientes diabéticos la hiperglicemia mantenida y la hipoxia estimulan la producción de VEGF que, además de ser un factor angiogénico, tiene una importante actividad permeabilizante. Los cambios en las uniones celulares estrechas, la pérdida de pericitos y de células endoteliales, el incremento de permeabilidad del endotelio y el RPE así como la alteración de la matriz extracelular y el engrosamiento de la membrana basal, son factores que contribuyen en la disrupción de la BHR^{20,22,23}. Además, otros factores sistémicos como la hipertensión provocan un incremento en la presión hidrostática de los capilares y una disminución de la presión oncótica respectivamente²⁴. Todo ello favorece el aumento de permeabilidad de la BHR interna y la extravasación de líquido del compartimento intravascular al espacio extracelular, provocando así un engrosamiento de la retina en el área macular. El líquido extravasado se

acumula en la retina neurosensorial debido a que la membrana limitante externa dificulta el paso hacia el RPE que es el encargado de eliminarlo por transporte activo hacia los coriocapilares²⁵. Alrededor del área de engrosamiento pueden aparecer exudados duros, que están formados por material lipídico y proteínico extravasado de los vasos y depositado en las capas externas de la retina.

1.3. TRATAMIENTO

1.3.1. Control de los factores de riesgo

El buen control de la glucemia y de la presión arterial es esencial para prevenir o retardar la progresión de la DR^{26,27}. La dislipemia, aunque se ha asociado con la presencia de exudados duros en la retina^{28,29}, no parece jugar un papel fundamental en el desarrollo de la DR. Existen varios estudios clínicos realizados en pacientes diabéticos tipo 2 que han evaluado el efecto del tratamiento con terapias hipolipemiantes sobre la DR. En el estudio CARDS, el tratamiento con atorvastatina no demostró ninguna reducción en la progresión de la DR³⁰. En el estudio FIELD el tratamiento con fenofibrato redujo significativamente la necesidad de tratamiento con láser en estos pacientes. Sin embargo, este efecto protector del fenofibrato no estaba asociado con la reducción de los niveles plasmáticos de lípidos, cosa que sugirió que este fármaco tiene otros efectos sobre la DR que van más allá de sus propiedades hipolipemiantes³¹. Por último, en el estudio ACCORD-Eye se observó que el tratamiento con simvastatina más fenofibrato también supuso una reducción en la progresión de la DR.³²

1.3.2. Fotocoagulación con láser

El objetivo de este tratamiento no es mejorar ni recuperar la visión perdida, sino estabilizar la DR para evitar una pérdida de visión mayor. Se utilizan láseres de efecto térmico para conseguir una vaporización del tejido con necrosis celular, una desnaturalización de las proteínas y una coagulación intravascular, con lo que la zona tratada adquiere un aspecto

blanco-amarillento. Existen dos tipos de tratamiento con láser: la fotocoagulación focal y la panfotocoagulación. La primera está indicada en casos de edema macular clínicamente significativo y consiste en fotocoagular específicamente la zona de la mácula para mantener la visión y prevenir la pérdida visual progresiva. Se intenta reducir la permeabilidad vascular fotocoagulando los microaneurismas que presentan fugas y las zonas de rotura de la barrera hematorretiniana. Según los resultados del ETDRS la fotocoagulación focal con láser reduce en un 50% el riesgo de pérdida de la agudeza visual en pacientes con DME^{33,34}. En el caso de la panfotocoagulación se fotocoagula toda la retina con el objetivo de destruir zonas isquémicas de la retina periférica para reducir la inducción de factores angiogénicos. Está indicada en casos severos de NPDR y PDR, reduciendo en un 60% el riesgo de ceguera^{35,36}.

1.3.3. Vitrectomía

La vitrectomía está indicada en casos severos de PDR, especialmente cuando presenta hemorragia vítrea reciente o proliferación fibrovascular que traccione la retina y/o la mácula. Es un procedimiento quirúrgico que consiste en la realización de dos incisiones en la pars plana de la esclera para acceder a la cavidad vítrea con el fin de retirar la totalidad o parte del humor vítreo. Permite realizar una limpieza de las hemorragias vítreas y la eliminación de las membranas de tejido fibrótico causantes de desprendimientos de retina por tracción. También es posible aplicar la panfotocoagulación con endoláser durante la vitrectomía.

1.3.4. Terapias farmacológicas

Recientemente se han desarrollado nuevas las terapias farmacológicas dirigidas a bloquear la angiogénesis y que tienen como diana diferentes moléculas implicadas en los mecanismos bioquímicos de la DR. La administración sistémica de estos fármacos tiene el inconveniente de que debido a la existencia de la BHR se requieren dosis altas para alcanzar dosis efectivas en el vítreo y en la retina, además de los posibles efectos adversos sistémicos. Por este motivo la vía de administración suele ser local, en forma de gotas o inyecciones intravítreas.

Uno de los tratamientos más utilizados son las inyecciones intravítreas de antagonistas del VEGF (Pegaptanib³⁷⁻³⁹, Ranibizumab⁴⁰⁻⁴³, Bevacizumab⁴⁴⁻⁵⁰), que es un potente promotor de la angiogénesis y de la permeabilidad vascular. Ranibizumab y bevacizumab son anticuerpos que se unen e inhiben la actividad biológica de todas las isoformas de VEGF-A circulante (VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁, VEGF₁₁₀). Sin embargo Pegaptanib es un aptámero que se une específicamente al VEGF₁₆₅, que es la principal isoforma de VEGF responsable de la neovascularización patológica pero no de la fisiológica. Debido a la gran afinidad y especificidad del pegaptanib con el VEGF₁₆₅ se puede considerar la mejor opción de tratamiento para evitar los efectos sistémicos adversos de la inhibición de la angiogénesis en pacientes diabéticos. La FDA ha aprobado el uso de pegaptanib y ranibizumab para el tratamiento de la AMD húmeda en el 2004 y en el 2006 respectivamente. Posteriormente, la FDA también ha autorizado el uso de ranibizumab para el tratamiento del edema macular con oclusión de las venas retinianas en el 2010 y para el DME en el 2012. En el caso de bevacizumab fue desarrollado y aprobado por la FDA en el 2004 para el tratamiento de cáncer de colon metastásico y es de aplicación intravenosa. Aunque el uso intraocular no está indicado, también se está utilizando en casos de AMD, DME y como tratamiento previo a la vitrectomía en pacientes con PDR severa por ser un fármaco tan similar (derivan del mismo anticuerpo monoclonal) y efectivo como el ranibizumab pero mucho más barato^{51,52}. En el 2011 la FDA ha aprobado la utilización de Aflibercept (VEGF Trap-Eye), un fármaco de última generación para el tratamiento de la AMD húmeda. A diferencia de ranibizumab y bevacizumab que son anticuerpos anti-VEGF, aflibercept es una proteína de fusión que incorpora el segundo dominio de unión del receptor VEGFR-1 y el tercer dominio del VEGFR-2 a la región Fc de la inmunoglobulina G humana. Se une a todas las isoformas de VEGF-A circulantes, igual que ranibizumab y bevacizumab. En el 2014 la FDA ha aprobado el uso de aflibercept para el tratamiento del DME^{53,54}.

Otro de los tratamientos actuales de la DR y el DME son los fármacos antiinflamatorios como los corticosteroides (Triamcinolona, Fluocinolona, Dexametasona). Las inyecciones intravítreas de triamcinolona acetónido son una alternativa para pacientes que no han respondido al tratamiento con láser⁵⁵. Tienen la capacidad de estabilizar la BHR gracias a sus propiedades antiinflamatorias, antiapoptóticas, antiedematosas y antiangiogénicas, reduciendo los niveles de VEGF⁵⁶⁻⁵⁸. Existen ensayos clínicos en los que se ha demostrado el efecto

beneficioso de las inyecciones de triamcinolona en el tratamiento del DME⁵⁹. Una limitación de este tipo de tratamiento es la necesidad de repetidas inyecciones de triamcinolona y el riesgo asociado de endoftalmitis, hemorragia vítrea y desprendimiento de retina. Como alternativa se han desarrollado los implantes intravítreos que se colocan en el segmento posterior del ojo y liberan corticosteroides a nivel local durante periodos prolongados de tiempo. Estos implantes pueden ser de dos tipos, biodegradables como los de dexametasona (Ozurdex) o no biodegradables como los de fluocinolona (Retisert, Iluvien). En los ensayos clínicos realizados se ha observado una mejora del DME en pacientes diabéticos con implante Retisert, pero la necesidad de colocar y sustituir el implante de manera quirúrgica ha limitado el uso de este tipo de tratamiento⁶⁰. Iluvien, es un nuevo tipo de implante de fluocinolona acetónido, cuya principal mejora respecto Retisert es que se coloca mediante inyección intravítrea sin necesidad de cirugía. Los resultados de los ensayos clínicos demuestran una reducción del DME en pacientes diabéticos con Iluvien y la FDA ha autorizado en el 2014 su utilización en el tratamiento del DME^{61,62}. Ozurdex es un implante biodegradable de dexametasona que también se aplica mediante inyección intravítrea. Según el resultado de los ensayos clínicos el tratamiento con Ozurdex produce una mejora del DME en pacientes diabéticos^{63,64}. En el 2014 la FDA ha autorizado su aplicación para el tratamiento del DME.

1.3.5. Nuevas perspectivas terapéuticas

Los inhibidores selectivos de la PKC- β (Ruboxistaurina) son otra de las terapias en estudio. La hipertensión, hiperglicemia, VEGF, estrés oxidativo, AGEs y la activación del sistema renina-antigtotensia estimulan esta vía de señalización celular, aumentando la actividad de la PCK. Entre las diferentes isoformas, la PKC- β 2 es la que se activa por la hiperglicemia y la implicada en la patogénesis de la DR⁶⁵. Además de participar en la transducción de señales de los receptores de VEGF, regula la expresión del mRNA de VEGF y su activación provoca un aumento de permeabilidad debido a su efecto sobre las uniones celulares estrechas⁶⁶⁻⁶⁸. El uso de inhibidores como la ruboxistaurina previene y revierte las complicaciones microvasculares en modelos animales de diabetes, reduce la neovascularización e inhibe el efecto permeabilizante del VEGF⁶⁹. Según los ensayos clínicos la administración oral de ruboxistaurina

reduce el riesgo de pérdida de visión así como la necesidad de tratamiento con láser en casos de DR probablemente debido a su efecto sobre el edema macular⁷⁰. Por último hay que mencionar la somatostatina (SST) y sus análogos (octeótrido) como tratamiento potencial de la DR. La SST es una molécula que está presente de manera natural en el vítreo y tiene un efecto antiangiogénico directo sobre la retina debido a la existencia de receptores específicos¹⁷. Se ha observado un déficit de SST en el vítreo de pacientes con PDR y DME que podría estar implicado en la neovascularización retiniana^{71,72}. Según los estudios en pacientes con NPDR severa y PDR temprana, la administración de octeótrido reduce la incidencia y la progresión de la enfermedad hacia PDR^{73,74}. Se ha demostrado que la administración tópica de SST previene la neurodegeneración de la retina en ratas a las que se la inducido la diabetes con estreptozotocina, reduciendo la activación glial, apoptosis y la excitotoxicidad por glutamato⁷⁵. En estos momentos se está realizando el estudio clínico EUROCONDOR (*European Consortium for the Early Treatment of Diabetic Retinopathy*) financiado por la EC (*European Comission*) para evaluar si la administración tópica (colirio) de SST en humanos es efectiva para prevenir la neurodegeneración así como la aparición y desarrollo de la DR⁷⁶.

2. FISIOPATOLOGÍA DE LA BARRERA HEMATORRETINIANA

2.1. COMPOSICIÓN

2.1.1. Retina

La retina es una túnica semitransparente, delgada, de tejido nervioso que recubre los dos tercios posteriores de la pared del globo ocular. Es un órgano complejo, diseñado para captar la luz y convertirla en impulsos eléctricos que serán transmitidos al cerebro a través del nervio óptico para la interpretación de las imágenes. Está formada por diez capas, nueve de las cuales constituyen la neuroretina o retina sensorial y la décima corresponde al RPE que es una monocapa de células epiteliales polarizadas. La parte más interna de la neuroretina está en contacto con el humor vítreo y la parte más externa con el RPE. A continuación, entre el RPE y la coroides se encuentra la membrana de Bruch que permite la adhesión y la alineación del RPE⁷⁷. Su estructura es compleja y está formada por diferentes tipos celulares (Fig 6): *Neuronas* (fotorreceptores, células ganglionares, células bipolares, células horizontales y células amacrinas), *macroglía* (células de Müller y astrocitos), *microglía* (macrófagos residentes), *RPE* y *células de la microvasculatura* (pericitos y células endoteliales)⁷⁸.

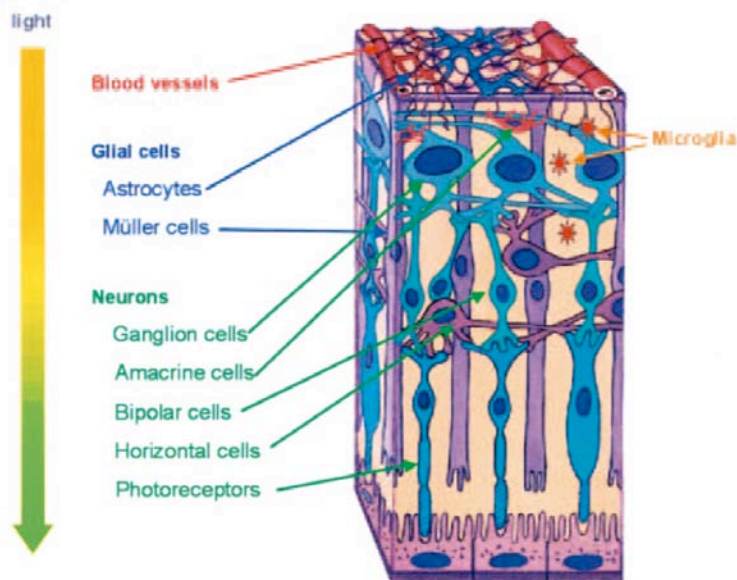


Figura 6. Representación esquemática de la estructura y componentes de la retina donde se muestran las células neuronales, macroglía, microglía, RPE y las células de la microvasculatura. Adaptado de Antonetti *et al*⁷⁹.

Las *neuronas* están organizadas en capas alternas, tres capas formadas por cuerpos celulares y dos capas formadas por sinapsis. Empezando por el lado más externo (próximo al RPE) se encuentra la capa nuclear externa (ONL) que contiene los cuerpos celulares de los fotorreceptores (conos y bastones). A continuación, en la capa plexiforme externa (OPL), los fotorreceptores establecen sinapsis con las células bipolares y horizontales. A su vez los bastones también interaccionan con el RPE como parte del ciclo de la visión para la regeneración de la rodopsina después de la fototransducción. La capa nuclear interna (INL) contiene los cuerpos celulares de las células bipolares, horizontales y amacrinas. La región de sinapsis entre dichas células amacrinas y bipolares con las células ganglionares está localizada en la capa plexiforme interna (IPL). Los cuerpos de las células ganglionares se encuentran en la capa de células ganglionares (GCL) (Fig 7). Cuando la señal luminosa llega a los fotorreceptores (neuronas de primer orden) es transformada en impulsos eléctricos que serán transmitidos a las células bipolares (neuronas de segundo orden) y de aquí a las células ganglionares (neuronas de tercer orden). Los axones de las células ganglionares forman la capa de fibras nerviosas y el nervio óptico, a través del cual transmiten la información a la corteza visual del cerebro.

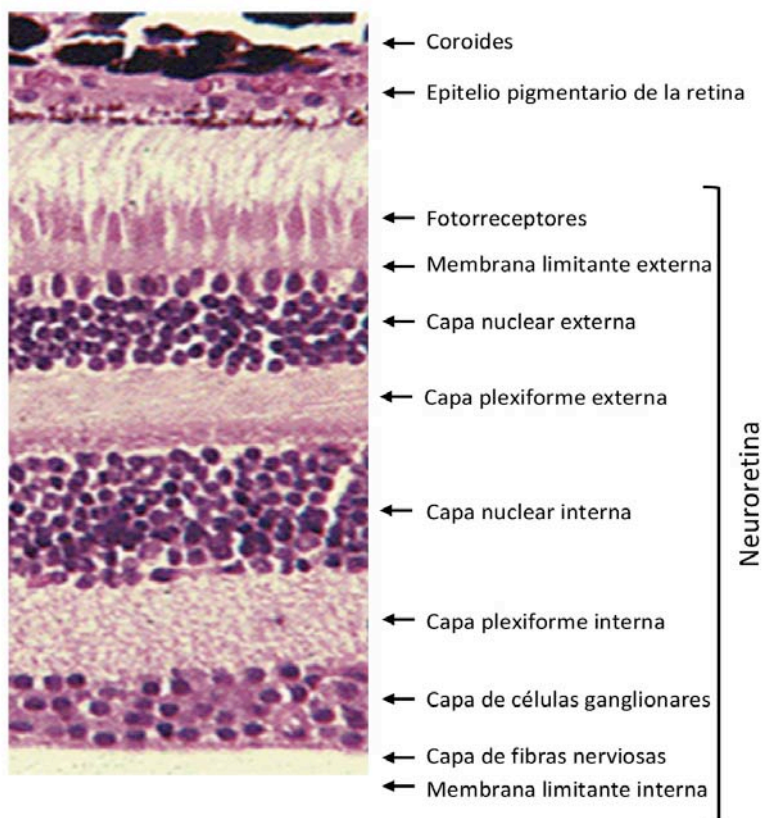


Figura 7. Sección de retina humana normal teñida con hematoxilina-eosina. Se muestran las nueve capas que componen la neuroretina y el RPE. Adaptado de Simó *et al*⁸⁰.

La *macroglía*, formada por las células de Müller y los astrocitos, aporta soporte nutricional a las neuronas y realiza funciones de sostén. Controla el microambiente celular regulando las concentraciones extracelulares de iones. Es importante para el desarrollo y el mantenimiento de la integridad de la pared vascular⁸¹ y puede volverse “reactiva” en cuanto se produce un daño en la retina como en el caso de la diabetes. La reactividad glial tiene como objetivo reparar el daño producido y normalizar los niveles de nutrientes y neurotransmisores. Suele preceder a la activación de la microglía e implica un aumento de la proliferación celular. La glía reactiva presenta células de mayor tamaño que cuando están en reposo y una sobreexpresión de proteínas del citoesqueleto como la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) y la tubulina. La *microglía* está constituida por macrófagos residentes en la retina. Se activan ante un estímulo inflamatorio o un daño en la retina, modificando su funcionalidad y comportamiento para reducir la inflamación y fagocitar células muertas por apoptosis. El último componente de la retina son las *células de la microvasculatura*, formadas por las células endoteliales y los pericitos. Las células endoteliales constituyen las paredes de los capilares, regulando el flujo sanguíneo y la homeostasis de la retina. Los pericitos son células modificadas de la musculatura lisa que rodean las células endoteliales y ayudan a la contracción de los vasos sanguíneos⁸².

La retina recibe su aporte sanguíneo de dos orígenes: los coriocapilares y las ramas de la arteria central de la retina. Los coriocapilares abastecen el tercio externo de la neuroretina y el RPE. La coroides recibe el mayor flujo sanguíneo (65-85%) y es imprescindible para el mantenimiento del tercio externo de la retina, especialmente para los fotorreceptores. El resto del flujo sanguíneo (20-30%) llega a la retina a través de las ramas de la arteria central de la retina para irrigar los dos tercios internos⁸³.

2.1.2. Barrera hematorretiniana

El concepto de barrera hematoencefálica (BHE) fue descrito por primera vez en 1885 por Ehrlich. En 1913 Goldman demostró en sus experimentos con el colorante azul de tripano que existe una barrera que separa y protege el cerebro de la circulación sistémica⁸⁴. En 1953 varios trabajos apuntaban la existencia en el segmento anterior del ojo de algún tipo de barrera

similar a la BHE, pero en el caso del segmento posterior la información era escasa⁸⁵. En 1965, Ashton y Cunha-Vaz describieron por primera vez la existencia de la barrera hematorretiniana (BHR) en el segmento posterior del ojo⁸⁶. En sus experimentos sobre el efecto de la histamina en la permeabilidad de los vasos sanguíneos oculares observaron que los capilares de la retina mostraban un comportamiento similar a los capilares de la BHE⁸⁷. Los estudios de microscopía electrónica revelaron la presencia de “zonulae occludente” entre las células endoteliales de los capilares de la retina. Este tipo de unión celular, también observado en los epitelios, explicaba la reducida permeabilidad de estos capilares⁸⁸. En base a los estudios morfológicos y de permeabilidad se propuso una estructura de BHR formada por dos componentes principales: las células endoteliales de los vasos sanguíneos de la retina (BHR interna) y el epitelio pigmentario de la retina (BHR externa) (Fig 8)⁸⁹.

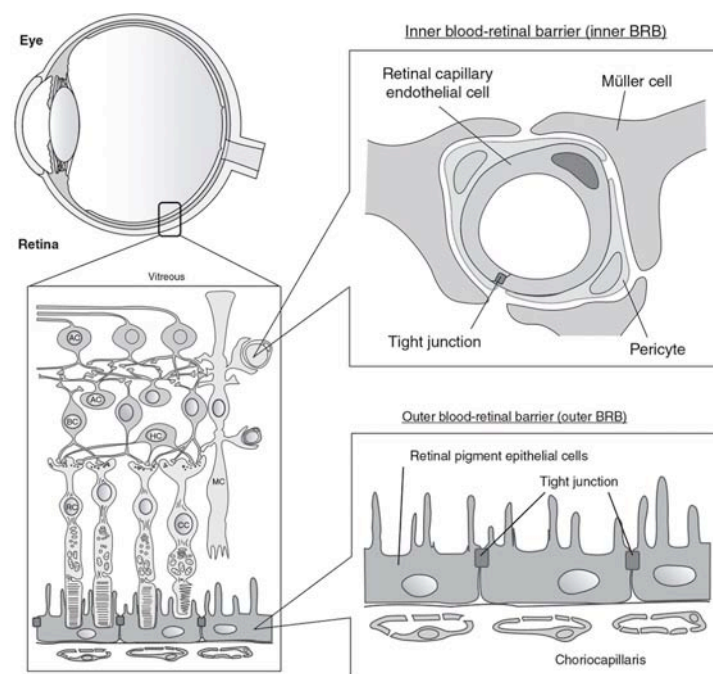


Figura 8. Esquema de la barrera hematorretiniana (BHR). La BHR interna está formada por las células endoteliales de los capilares de la retina, las cuales están rodeadas de pericitos y células de Müller. La BHR externa está formada por el epitelio pigmentario de la retina (RPE). El control de fluidos y solutos que atraviesan la BHR viene dado por uniones celulares estrechas (*tight junctions*). AC: Amacrine cell; BC: Bipolar cell; CC: Photoreceptor cell (cone cell); GC: Ganglion cell; HC: Horizontal cell; MC: Müller cell; RC: Photoreceptor cell (rod cell). Adaptado de Hosoya *et al*⁹⁰.

La BHR controla el microambiente de la retina a través de procesos de secreción, absorción y transporte⁹¹. Es una barrera selectiva que regula el balance osmótico, la concentración iónica y el transporte de nutrientes (azúcares, lípidos y aminoácidos). Hace de la retina un lugar inmunológicamente privilegiado ya que limita el paso de inmunoglobulinas y de células inmunes circulantes. Como se ha mencionado anteriormente, son las uniones celulares estrechas las responsables del control de fluidos y solutos que atraviesan la BHR^{78,92}. El correcto funcionamiento de la BHR es muy importante para la retina neural, ya que es un tejido muy vulnerable y cualquier alteración vascular que provoque una reducción de las propiedades de barrera puede afectar la función visual.

La rotura de la BHR es la principal causa implicada en la patogénesis del DME. En las primeras etapas del DME se produce una alteración en los capilares de la retina que forman la BHR interna. La disrupción de uniones celulares estrechas de las células endoteliales de la microvasculatura provoca la rotura de la BHR interna, permitiendo el paso de fluidos y proteínas desde la circulación hacia la neuroretina y aumentando la presión oncótica en este tejido. La membrana limitante externa, anterior al RPE, actúa como una barrera e impide que éste pueda eliminar el exceso de líquido que se está acumulando en la retina sensorial, desencadenando la formación del DME. La BHR externa, formada por el RPE, también juega un papel importante en la patogénesis del DME. Las células del RPE constituyen una importante barrera semipermeable localizada entre la retina sensorial y los coriocapilares. Contribuye al mantenimiento del microambiente de estas dos estructuras para garantizar su correcto funcionamiento. La alteración de las uniones celulares estrechas de cualquiera de las dos BHR favorece el aumento de permeabilidad y la extravasación del contenido intravascular, desencadenándose los procesos que conducirán a la formación del DME.

Barrera hemorretiniana interna

La BHR interna está formada por dos capas de capilares situadas en la capa de células ganglionares y en las capas plexiformes interna y externa. Los capilares que forman la BHR interna están formados por una monocapa de células endoteliales unida a la lámina basal y rodeada de otros tipos celulares como pericitos, astrocitos y microglía. Este conjunto se

conoce como unidad neurovascular. Las células endoteliales de los capilares de la retina presentan uniones estrechas, también llamadas *tight junctions* (TJ), que los hacen muy impermeables y limitan la difusión de moléculas desde la sangre hacia la neuroretina. Además de tener un elevado número de TJ, estas células carecen de fenestraciones. Estas dos características, similares a las del endotelio de la BHE, se traducen en una elevada resistencia eléctrica transendotelial y una permeabilidad paracelular restringida. Las propiedades de barrera del endotelio de la retina permiten el transporte selectivo de moléculas mediante dos procesos, la ruta paracelular y la ruta transcelular. El transporte paracelular está regulado por las uniones intercelulares de las células endoteliales mientras que en el transporte transcelular intervienen vesículas de transporte especializadas (caveolas) y transporte mediado por receptores⁹³.

Los pericitos son células de la musculatura lisa modificadas que rodean las células endoteliales. En la retina el ratio pericito/célula endotelial es alto (1:1) en comparación con la BHE (1:3) u otros capilares (1:10), sugiriendo una importante función en la BHR. Proporcionan soporte físico, intervienen en la contracción de los capilares de la retina y se comunican con las células endoteliales adyacentes, astrocitos, microglía y neuronas, formando la unidad neurovascular. En los capilares las células endoteliales y los pericitos están separados por la lámina basal pero ésta contiene agujeros a través de los cuales pueden establecer contactos directos. Las interacciones entre los pericitos y las células endoteliales son importantes para la maduración, remodelación y mantenimiento del sistema vascular⁹⁴.

Las células de la glía también ejercen un papel importante en el mantenimiento de la BHR interna. Los dos tipos principales de células de la macroglía son las células de Müller y los astrocitos. Mientras que los núcleos de las células de Müller se localizan en la INL y sus prolongaciones se extienden a través de todas las capas de la retina desde la membrana limitante externa a la interna, los astrocitos se encuentran en la capa de fibras nerviosas. Las células gliales dan soporte a la BHR, no solamente de un modo estructural si no que facilitan la comunicación entre las células neurales y la vasculatura. Participan en la formación y en el mantenimiento de la BHR, aportan nutrientes a las neuronas, realizan funciones de sostén,

recaptan los neurotransmisores de los terminales nerviosos y eliminan productos de desecho⁹⁵.

Los modelos experimentales de BHR interna más utilizados *in vitro* son los cultivos de células endoteliales de retina bovina (BREC). Pueden ser en forma de una única monocapa de células BREC cultivadas sobre soportes permeables (transwells) o en forma de cocultivos para generar modelos experimentales más complejos. En este último caso las células BREC crecen en una cara del filtro y los astrocitos en la cara opuesta, mientras que los pericitos se cultivan en el fondo del pocillo. Todos ellos permiten realizar estudios de resistencia eléctrica transendotelial (TEER) y de permeabilidad⁹⁶.

Barrera hematorretiniana externa

La BHR externa está formada por el RPE que se encuentra entre la superficie externa de los fotorreceptores y la coroides. El RPE está constituido por una monocapa de células epiteliales polarizadas que presentan uniones estrechas (TJ) y restringen el transporte paracelular de moléculas⁹⁷. A diferencia de los vasos sanguíneos que nutren la neuroretina, las paredes de los coriocapilares son finas y tienen múltiples fenestraciones. Esta característica hace que sean más permeables y que el plasma se escape al espacio extravascular. Por este motivo el RPE juega un papel importante limitando el paso de las moléculas que provienen de la circulación hacia la neuroretina. Además de esta función protectora, el RPE está implicado en otros procesos que contribuyen al correcto funcionamiento de la retina y que se detallan a continuación.

2.1.3. Epitelio pigmentario de la retina

El epitelio pigmentario de la retina (RPE) está formado por una monocapa de células epiteliales polarizadas y constituye la BHR externa. Situado entre la neuroretina y la coroides, tiene un origen neuroectodérmico y por tanto se considera parte de la retina. La membrana apical del RPE está en contacto con los segmentos externos de los fotorreceptores y la parte basolateral con la membrana de Bruch, la cual separa el RPE del

endotelio fenestrado de la coroides. Las células del RPE están conectadas entre ellas por uniones celulares estrechas (TJ) que lo hace impermeable al paso de macromoléculas y evita la entrada de componentes del plasma en la retina. La función oclusiva de estas uniones celulares es esencial para el mantenimiento de la integridad de la retina⁹⁸.

Las células del RPE son de vital importancia para el mantenimiento de la homeostasis de la retina. Las principales funciones del RPE son las siguientes: (1) transporte de nutrientes, iones y agua; (2) absorción de la luz y protección contra la fotooxidación; (3) reisolomerización del todo-*trans*-retinal en 11-*cis*-retinal, elemento clave para el ciclo de la visión; (4) fagocitosis de los discos membranosos de los segmentos externos de los fotorreceptores; (5) secreción de factores esenciales para el mantenimiento de la integridad estructural de la retina (Fig 9). Además de estas funciones, el RPE estabiliza la concentración de iones en el espacio subretiniano, lo cual es crucial para el mantenimiento de la excitabilidad de los fotorreceptores⁹⁹. Como parte de la BHR, el RPE está involucrado en el privilegio inmune del ojo y también a través de la secreción de factores inmunosupresores en el interior de dicha estructura⁸⁰. Un fallo en cualquiera de estas funciones puede tener graves consecuencias como la degeneración de la retina, la pérdida de visión y ceguera.

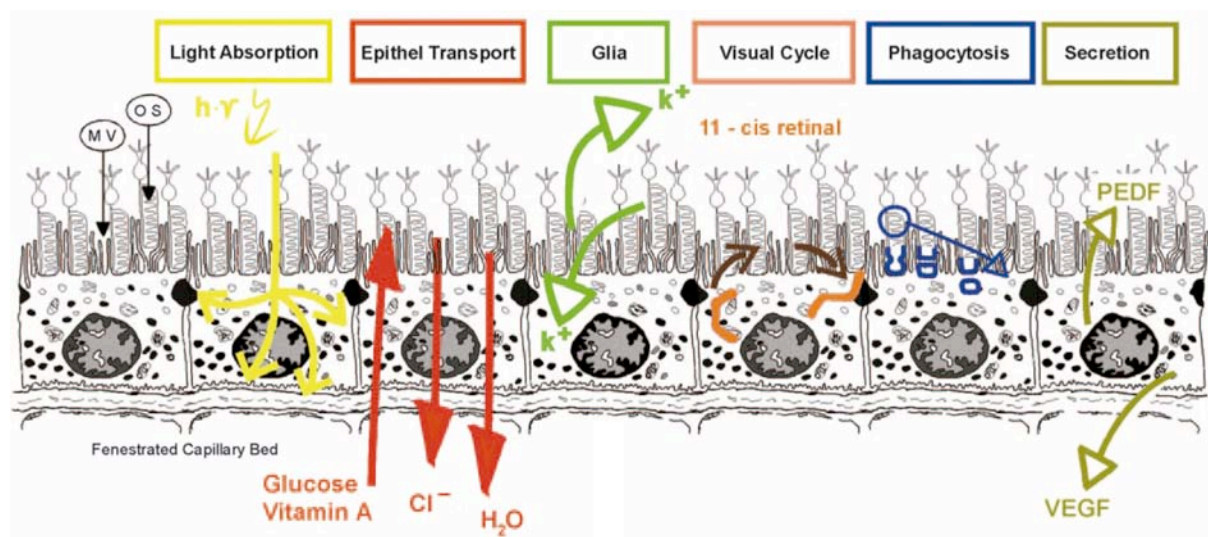


Figura 9. Principales funciones del epitelio pigmentario de la retina. PEDF: Pigment epithelium-derived factor, VEGF: Vascular endothelial growth factor. Extraído de Strauss O⁹⁸.

Transporte transepitelial

El transporte a través del RPE es bidireccional, del espacio subretiniano hacia la coroides transporta electrolitos y agua y en la otra dirección, desde la sangre hacia los fotorreceptores, transporta glucosa y otros nutrientes.

Debido a la elevada actividad metabólica de las neuronas y los fotorreceptores se produce una gran cantidad de agua en la retina. Por otra parte, la presión intraocular genera un movimiento de agua desde el cuerpo vítreo hacia la retina. Estos dos procesos hacen necesaria la eliminación constante de agua de la capa interna de la retina hacia la coroides¹⁰⁰. Este movimiento de agua del espacio subretiniano produce una fuerza de adhesión entre la retina y el RPE. El transporte transepitelial se debe a un transporte de Cl⁻ y K⁺ y utiliza la energía generada por la bomba Na⁺K⁺-ATPasa, localizada en la membrana apical del RPE^{101,102}. Las uniones celulares estrechas que existen entre las células del RPE hacen que la resistencia paracelular de esta barrera sea 10 veces mayor que la resistencia transcelular^{103,104}. Por esta razón el agua no puede atravesar el RPE por la vía paracelular y lo hace por la vía transcelular a través de la Aquaporina-1¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

En sentido contrario, desde la sangre hacia los fotorreceptores, el RPE absorbe nutrientes como la glucosa, retinol, ácido ascórbico y ácidos grasos. En las membranas apical y basolateral del RPE existen grandes cantidades de transportadores de glucosa (GLUT) siendo GLUT1 y GLUT3 los más expresados¹⁰⁸⁻¹¹⁰. GLUT3 media el transporte basal de glucosa, mientras que GLUT1 se encarga del transporte inducido de glucosa en respuesta a diferentes demandas metabólicas. Otra de las funciones importantes del RPE es el transporte de retinol para garantizar el suministro de retinal a los fotorreceptores. El *trans*-retinol formado en los fotorreceptores durante el ciclo de la visión es transportado al RPE donde se isomeriza a 11-*cis*-retinal para ser entregado nuevamente a los fotorreceptores¹¹¹. El transporte de ácidos grasos como el ácido docosahexaenoico (DHA) a los fotorreceptores es muy importante para la función visual ya que es un ácido graso esencial del tipo omega-3, que no puede ser sintetizado en el tejido nervioso y es indispensable para la estructura de las membranas de las neuronas y de los

fotorreceptores¹¹². Además, el DHA es el precursor de la neuroprotectina D1 (NPD1), un docosatrieno que protege el RPE contra el estrés oxidativo¹¹³.

Absorción de luz y protección contra la fotooxidación

La retina es el único tejido neural que está expuesto a la luz directamente y de manera continua, hecho que favorece la fotooxidación de lípidos que se vuelven extremadamente tóxicos para las células¹¹⁴. Además, es el tejido del cuerpo que proporcionalmente consume más oxígeno, generando así una elevada producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por este motivo el RPE tiene un papel muy importante contrarrestando el estrés oxidativo que se produce en la retina. Para llevar a cabo esta función contiene varios tipos de pigmentos como melanina y lipofucsina, especializados en diferentes longitudes de onda, que le permiten absorber y filtrar la luz¹¹⁵. En una segunda línea de defensa contiene antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa) y no enzimáticos (carotenoides, ascorbato)¹¹⁶⁻¹¹⁸. El glutatión y la melanina también contribuyen como protectores ante el estrés oxidativo.

Ciclo de la visión

El ciclo de la visión es una cascada de reacciones enzimáticas de fotólisis y regeneración de los pigmentos sensibles a la luz, presentes en los discos membranosos de los segmentos externos de los fotorreceptores. Es un proceso cíclico que depende del intercambio de retinoides entre los fotorreceptores y el RPE.

Se inicia con la absorción de la luz por la rodopsina, compuesta por una proteína receptora acoplada a una proteína G, llamada opsina, y por el cromóforo 11-*cis*-retinal. La absorción de la luz provoca la isomerización del 11-*cis*-retinal en todo-*trans*-retinal. Debido a que los fotorreceptores no tienen la isomerasa *cis-trans*, la regeneración del 11-*cis*-retinal debe hacerse en el RPE donde sí existe esta enzima. Para ello, es necesario que el todo-*trans*-retinal sea metabolizado a todo-*trans*-retinol en los fotorreceptores y transportado al RPE unido a la proteína de unión a interfotorreceptores retinoides (IRBP). En el RPE, el todo-

trans-retinol es esterificado y sometido a *trans*-isomerización a 11-*cis*-retinal gracias a la acción de dos enzimas, la proteína específica del epitelio pigmentario de la retina de 65 kDa (RPE65) y la 11-*cis*-retinol deshidrogenasa. El 11-*cis*-retinal reisolomerizado es transportado desde el RPE a los fotorreceptores unido a la IRBP¹¹⁹ (Fig 10). La IRBP es una glicoproteína que se sintetiza en los fotorreceptores y se extruye a la matriz interfotorreceptora. Solubiliza los retinoides hidrofóbicos insolubles en agua y dirige su transporte entre los diferentes compartimentos celulares¹²⁰⁻¹²².

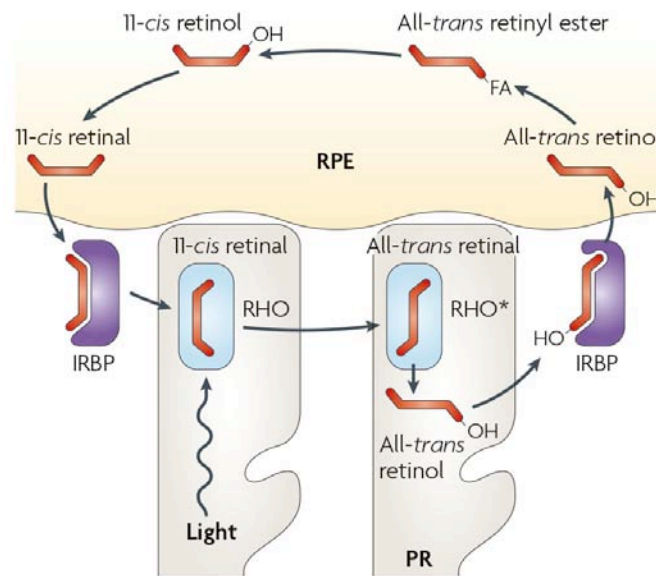


Figura 10. El ciclo de la visión. Cascada de reacciones enzimáticas para la regeneración de los retinoides utilizados durante la detección de la luz en los fotorreceptores. PR: Photoreceptor; RHO: Rhodopsin; RHO*: Rhodopsin-activated; IRBP: Interstitial retinol-binding protein; RPE: Retinal pigment epithelium; FA: Fatty acyl group. Extraído de Wright *et al*¹¹⁹

Fagocitosis

Otra de las funciones del RPE es el mantenimiento de la excitabilidad de los fotorreceptores a través de renovación de sus segmentos externos. La exposición constante a niveles intensos de luz produce la acumulación de proteínas y lípidos oxidados en el interior de los fotorreceptores que pueden interferir en el proceso de transducción de la luz. Con el fin de mantener su correcto funcionamiento y eliminar las sustancias tóxicas acumuladas, los segmentos externos de los fotorreceptores se renuevan constantemente reconstruyéndose desde su base^{123,124}. Las extremidades de los segmentos externos que

contienen mayor concentración de radicales libres, proteínas y lípidos fotooxidados se desprenden de manera coordinada y se forman nuevas extremidades, manteniendo una longitud constante. Las extremidades desprendidas de los segmentos externos son fagocitadas por el RPE, el cual las digiere y entrega a los fotorreceptores moléculas esenciales como DHA y retinal, para volver a reconstruir nuevos segmentos externos sensibles a la luz^{125,126}.

Secreción

Además de las funciones descritas anteriormente, el RPE produce y secreta diferentes factores que son esenciales para el mantenimiento de la estructura y la integridad de la retina y los coriocapilares^{17,127}. Produce moléculas que favorecen la supervivencia de los fotorreceptores y aseguran una estructura básica para la correcta circulación y suministro de nutrientes. También secreta factores inmunosupresores que contribuyen al mantenimiento del privilegio inmune del ojo. Entre todos estos factores destacan el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF)^{17,128,129}, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)^{17,130-133}, los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF-1, FGF-2 y FGF-5)^{17,134-137}, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β)^{17,138,139}, el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I)^{140,141}, el factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), la neurotropina-3 (NT-3), el factor neurotrófico ciliar (CNTF)^{142,143}, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)^{17,144,145}, el factor de crecimiento derivado el epitelio de la lente (LEDGF)¹⁴⁶, varios miembros de la familia de las interleucinas^{147,148}, quimiocinas, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α)¹⁴⁷, factores estimulantes de colonias (CSF), diferentes tipos de inhibidores tisulares de metaloproteinasas de matriz (TIMP)¹⁴⁹⁻¹⁵¹. El RPE es muy sensible a muchas citoquinas inflamatorias las cuales provocan respuestas como la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC) en superficie, expresión de moléculas de adhesión, alteración de la función de barrera y la secreción de otras citoquinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias¹⁴⁷.

Entre todos los factores sintetizados y secretados por el RPE, se consideran el PEDF y el VEGF como los más significativos. El PEDF actúa de dos maneras en el RPE: como factor

neuroprotector ante la apoptosis inducida por glutamato o hipoxia¹⁵²⁻¹⁵⁴ y como factor antiangiogénico inhibiendo la proliferación de las células endoteliales^{17,128}. El VEGF, sin embargo, es un factor proangiogénico pero en condiciones fisiológicas es secretado por el RPE a bajas concentraciones¹⁷. Previene la apoptosis de las células endoteliales y es esencial para el mantenimiento del endotelio y de los coriocapilares. Además, el VEGF regula la permeabilidad vascular y la estabilización de las fenestraciones del endotelio¹⁵⁵. El PEDF y el VEGF son secretados en lados opuestos del RPE. El PEDF se secreta en el extremo apical, actuando así sobre las neuronas y los fotorreceptores, mientras que la secreción del VEGF es basolateral para actuar sobre el endotelio de la coroides^{156,157}. El mantenimiento del equilibrio entre los niveles de factores proangiogénicos (ej. VEGF) y antiangiogénicos (ej. PEDF) es muy importante en la prevención del desarrollo de alteraciones retinianas asociadas a la diabetes como la retinopatía diabética.

Nuestro grupo de investigación ha identificado que el RPE también sintetiza SST, Epo y Apo A1. La somatostatina (SST) es fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de la retina. La concentración intravítrea de SST es mucho mayor que la plasmática, cosa que sugiere una importante producción intraocular, si se tiene en cuenta que los niveles de proteína total en el humor vítreo son 20 veces menores que en suero^{158,159}. Aunque también se sintetiza en la neuroretina, la mayor fuente de SST en el ojo es el RPE¹⁶⁰. También se han identificado en la retina los cinco subtipos de receptores para la somatostatina (SSTRs 1-5), siendo el SSTR1 y SSTR2 los más expresados¹⁶¹⁻¹⁶⁴. La presencia simultánea de SST y de SSTRs sugiere una acción autocrina en la retina. La SST es un factor angiostático, ya que reduce la proliferación de las células endoteliales y la neovascularización¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Está implicada en transporte de iones y de agua en el RPE, evitando así la acumulación de fluidos en la retina¹⁶⁸. Actúa como neuromodulador sobre diferentes vías como la señalización intracelular mediada por calcio¹⁶⁹, óxido nítrico¹⁷⁰ y la liberación de glutamato por los fotorreceptores¹⁷¹. Es uno de los factores neuroprotectores y neurotróficos más relevantes, cuyo déficit se ha relacionado con la neurodegeneración en las primeras etapas de la DR¹⁷².

El RPE también expresa eritropoyetina (Epo) y su receptor (Epo-R) a unos niveles mayores que la neuroretina^{173,174}. Como en el caso de la SST, los niveles intravítreos de Epo

son superiores a los plasmáticos¹⁷³. La Epo tiene función neuroprotectora¹⁷⁵, además de estimular la movilización de las células endoteliales progenitoras hacia zonas de la retina donde se ha producido un daño¹⁷⁶. Sin embargo, presenta un potencial angiogénico similar al VEGF¹⁷⁷. Por este motivo, en el caso de enfermedades como la DR, su efecto puede variar según el grado de evolución de la enfermedad. En estadios iniciales tiene un papel protector, mientras que etapas más avanzadas de la enfermedad su efecto angiogénico puede potenciar el efecto del VEGF y favorecer la neovascularización^{178,179}.

Otro de los factores secretados por el RPE es la apolipoproteína A1 (apoA1), siendo éste el mayor productor de apoA1 en la retina humana⁸⁰. El RPE es un importante regulador del transporte de lípidos en la retina debido a su gran capacidad de internalización y extrusión de lípidos. La apoA1 participa en el transporte reverso de estos lípidos para evitar su acumulación¹⁸⁰, la fotooxidación y la consecuente lipotoxicidad, además de contribuir a la eliminación de ROS^{181,182}.

2.2. LÍNEA CELULAR ARPE-19

Existen líneas celulares de RPE de humanos y de otras especies que han sido creadas por transformación con oncogenes o proteínas virales. Estas líneas se utilizan en investigación y son una buena alternativa al uso de cultivos primarios, para evitar dificultades en la obtención y purificación así como variabilidad entre donantes.

La línea celular ARPE-19 es una línea de células de RPE humano, obtenidas de manera espontánea en 1986 por Aotaki-Keen a partir de un cultivo primario de RPE de un donante masculino de 19 años muerto en un accidente de tráfico¹⁸³. A diferencia de la mayoría de líneas celulares obtenidas espontáneamente que suelen ser aneuploides, las ARPE-19 son células diploides con un cariotipo normal. Estas células forman monocapas estables que mantienen *in vitro* las características morfológicas y fisiológicas del RPE nativo. Su aspecto adoquinado y su rápida tasa de proliferación las distinguen de otros cultivos primarios de

RPE (Fig 11). Una de las características que aseguran la integridad funcional de las células ARPE-19 es la presencia de monocapas polarizadas (Fig 12).

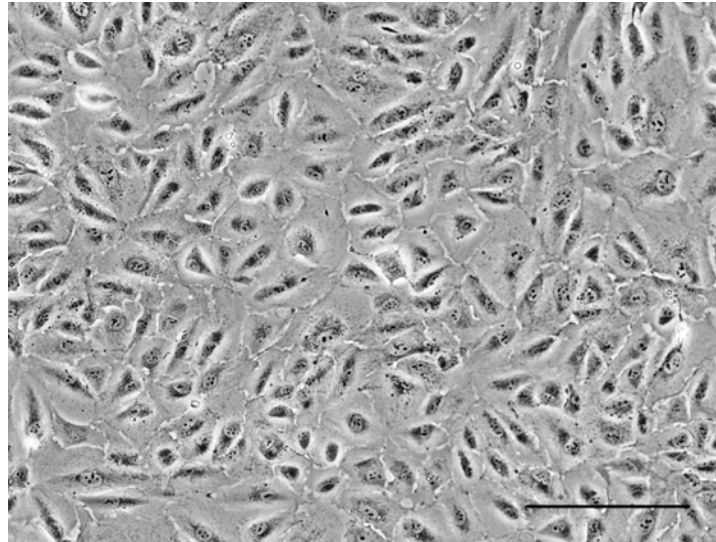


Figura 11. Monocapa de la línea celular ARPE-19 de epitelio pigmentario de retina humana. Escala=200 μm .

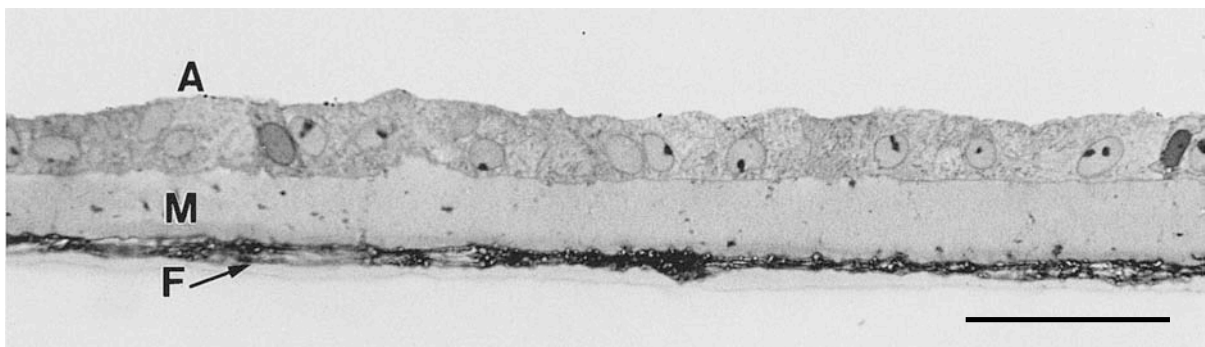


Figura 12. Sección de una monocapa de la línea celular ARPE-19. Las células han sido cultivadas sobre un soporte permeable (Transwell) con un recubrimiento de matrigel. A: Parte apical de las células; M: Matrigel; F: Filtro. Escala=50 μm . Extraído de Dunn *et al*¹⁸³.

La expresión y la localización de proteínas que forman parte de las uniones celulares estrechas (occludina, claudina-1, zonula occludens-1) y de la bomba ATPasa Na^+/K^+ , las cuales presentan una localización apical en el RPE, se utiliza para determinar la polarización de la monocapa y son indicativas de unas buenas propiedades de barrera (Fig 13). La medida de la resistencia transepitelial (TER) de los cultivos se utiliza para evaluar la funcionalidad de las uniones celulares. Las células ARPE-19 presentan un TER de $50\text{-}100 \Omega\text{-cm}^2$ pero puede variar según las condiciones de cultivo¹⁸³⁻¹⁸⁵. Los estudios de permeabilidad a diferentes tipos de moléculas marcadas, como el dextrano o la inulina, son otro método muy utilizado para evaluar las propiedades de barrera de los epitelios. Respecto a los marcadores bioquímicos de diferenciación, las células ARPE-19 expresan la proteína de unión al 11-*cis*-retinaldehído (CRALBP) y RPE65¹⁸³. Aunque este tipo de células pueden crecer sobre diferentes tipos de matrices, las células ARPE-19 que crecen directamente sobre plástico son las que mejor mantienen las características del RPE nativo^{186,187}.

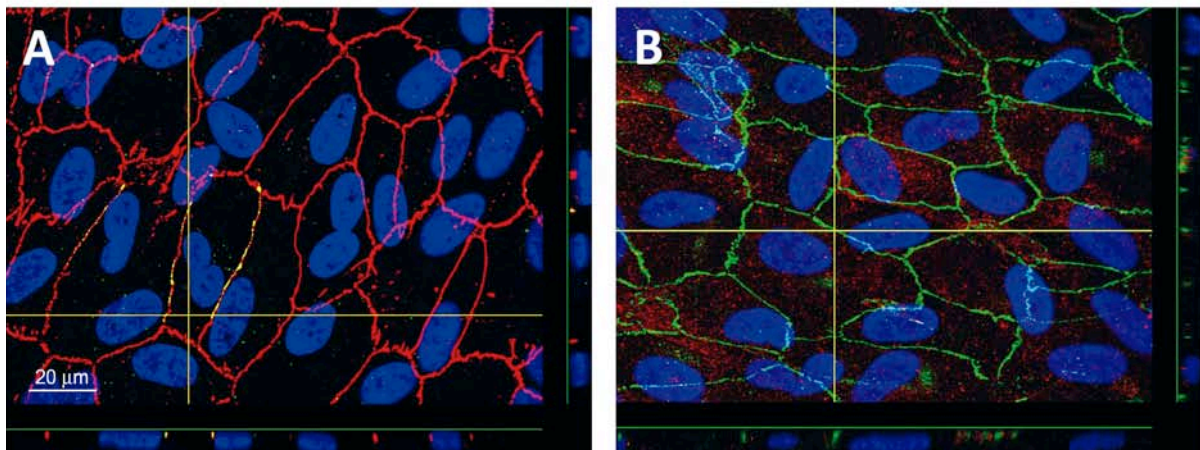


Figura 13. Inmunohistoquímica de una monocapa de células ARPE-19 obtenida por microscopía confocal. En la parte inferior de las imágenes se muestran las proyecciones-Z donde puede observarse la localización apical de las uniones celulares estrechas (*tight junctions*) y de la ATPasa Na^+/K^+ . (A) ZO-1: color rojo; Claudina-1: color verde. (B) ATPasa Na^+/K^+ : color rojo; Occludina: color verde. Escala=20 μm . Extraído de García-Ramírez *et al*¹⁸⁷.

2.3. TIGHT JUNCTIONS (UNIONES CELULARES ESTRECHAS)

2.3.1. Función y estructura

Las células epiteliales y endoteliales forman barreras celulares que separan diferentes tejidos y compartimentos de nuestro organismo. Para poder llevar a cabo esta función es necesario que se polaricen, es decir, que presenten un dominio apical y otro basolateral de diferente composición proteica y lipídica y que estén unidas entre ellas a través de uniones celulares. Las uniones celulares son puntos de contacto entre las membranas plasmáticas de las células o entre las células y la matriz extracelular.

En los vertebrados las células epiteliales están unidas por cuatro tipos de uniones intercelulares: *tight junctions* (uniones celulares estrechas), *adherens junctions* (uniones de adherencia), desmosomas y *gap junctions* (uniones de hendidura) (Fig 14). Las *tight junctions* (TJ) se encuentran en el extremo más apical de la membrana lateral y están unidas al citoesqueleto de actina. Forman una barrera semipermeable que limita la difusión paracelular de fluidos y solutos, además de limitar la difusión lateral de lípidos y proteínas de membrana para mantener la diferente composición entre los dominios apical y basolateral. Las *adherens junctions* están formadas por placas de cadherina unida a los microfilamentos de actina y pueden encontrarse cercanas a las TJ o distribuidas a lo largo de la membrana lateral, según el tipo de epitelio. Ayuda a las superficies epiteliales a resistir la separación durante las actividades contráctiles. Los desmosomas se localizan a lo largo de la membrana lateral y están formados por placas de cadherina, como las *adherens junctions*, pero asociada a los filamentos intermedios. Contribuyen al mantenimiento de la estabilidad cuando están bajo presión y ante la tracción mecánica. El último tipo de uniones celulares son las *gap junctions*, que forman poros intercelulares que permiten el intercambio de iones y pequeñas moléculas hidrofílicas entre las células vecinas. Estos poros están formados por proteínas llamadas conexinas que se unen para formar complejos llamados conexones, distribuidos a lo largo de la membrana lateral o en ocasiones intercalados con las TJ^{188,189}.

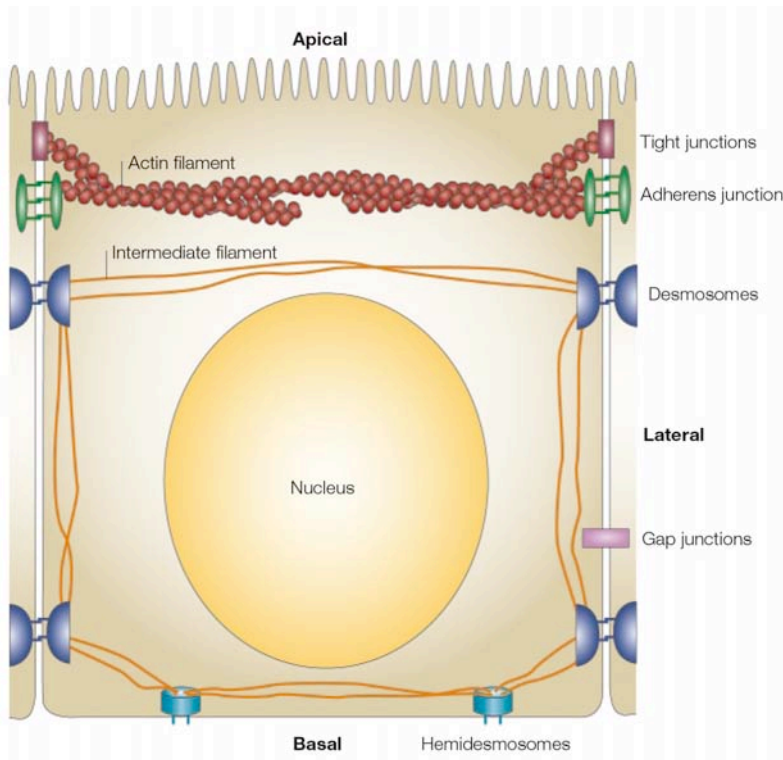


Figura 14. Tipos de uniones intercelulares. Esquema de una célula epitelial polarizada donde pueden observarse los diferentes tipos de uniones celulares y sus anclajes con el citoesqueleto. Extraído de Matter K y Balda MS¹⁸⁸.

Las uniones estrechas o TJ están localizadas en la zona más apical de las células polarizadas, especialmente en las células epiteliales y endoteliales de los vertebrados. Tienen dos funciones principales, por un lado actúan como una barrera para evitar el paso o la libre difusión de moléculas a través de la vía paracelular. Esta barrera es semipermeable y permite el paso selectivo de ciertos solutos¹⁹⁰. En segundo lugar evitan la difusión lateral de lípidos y proteínas de membrana, manteniendo así la diferente composición lipídica y proteica en las regiones apical y basolateral para formar diferentes dominios de membrana¹⁹¹. Además de estas funciones, las TJ son muy importantes para biogénesis, el mantenimiento y la funcionalidad de los epitelios. Intervienen en la adhesión, aportan resistencia mecánica y regulan vías de señalización reclutando moléculas que controlan la proliferación, diferenciación y expresión génica¹⁸⁸.

En el microscopio electrónico de transferencia se observan puntos donde las hemimembranas externas de las células adyacentes parece que se fusionen (*kissing points*). La técnica de criofractura da una idea tridimensional de las uniones estrechas y muestra en las zonas de contacto partículas de unos 10 nm organizadas en redes o filas. En estas zonas el

espacio intermembranoso queda obstruido, con una profundidad de $0,2-0,5 \mu\text{m}$ ¹⁹². En general la disposición de las filas es rectilínea o anastomosada y el número de filas es proporcional a la permeabilidad y a la resistencia eléctrica de la unión (Fig 15).

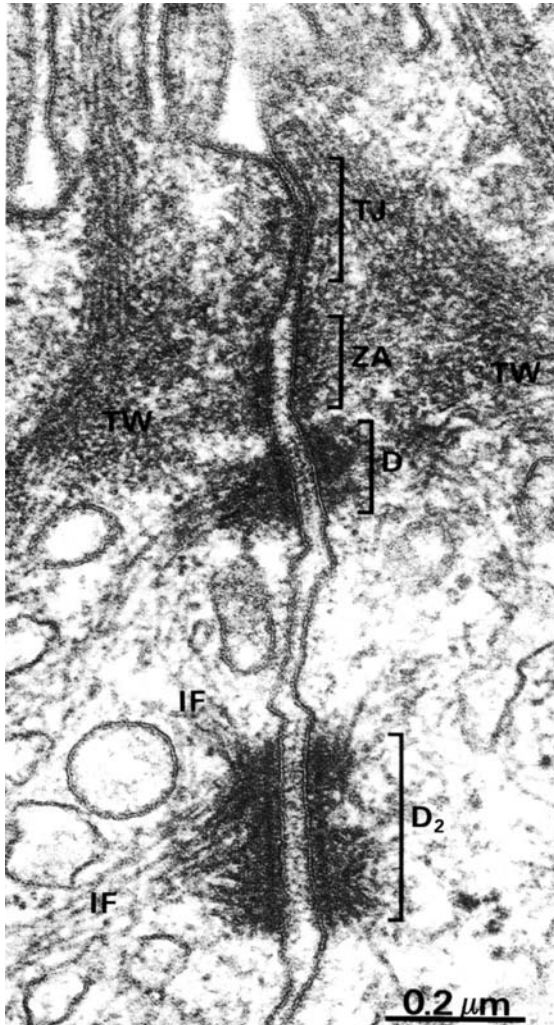


Figura 15. Fotografía de microscopía electrónica de las uniones celulares entre dos células epiteliales. TJ: Tight junction; ZA: Zonula adherens; D: Desmosoma; IF: Filamento intermedio. Extraído de Young B and Heath JW¹⁹³.

La estructura básica de las TJ consiste en varias proteínas transmembrana unidas a una placa citoplasmática formada por una red de proteínas adaptadoras que conectan las uniones celulares con el citoesqueleto (Fig 16). En esta placa citoplasmática es donde se reclutan las diferentes proteínas de señalización. Las proteínas transmembrana son las constituyentes de la barrera paracelular y las mediadoras de la adhesión celular y pueden ser de dos tipos: con un único dominio transmembrana (JAMs) o con cuatro dominios transmembrana (occludina, claudinas, tricelulina). Las proteínas de la placa citoplasmática actúan como conectores con el

citoesqueleto y como reguladores del ensamblaje y de la funcionalidad de las TJ. Muchas de estas proteínas de la placa (ZO-1, ZO-2, ZO-3, MUPP1, MAGI) interactúan con las proteínas transmembrana a través de dominios de unión-PDZ. Los dominios de unión-PDZ son dominios de 80-90 aminoácidos que ayudan a anclar proteínas transmembrana al citoesqueleto y a mantener unidos los complejos de señalización. Son frecuentes en proteínas estructurales y de señalización. PDZ es un acrónimo cuyas letras corresponden a las tres proteínas en las que se identificó el dominio por primera vez: PSD-95, Discs-large A y ZO-1. Las proteínas de la placa también pueden interactuar a través de otros dominios con otras proteínas reguladoras como las GTPasas, PKC o proteínas asociadas con el núcleo y complejos de adhesión (NACos)¹⁹⁴.

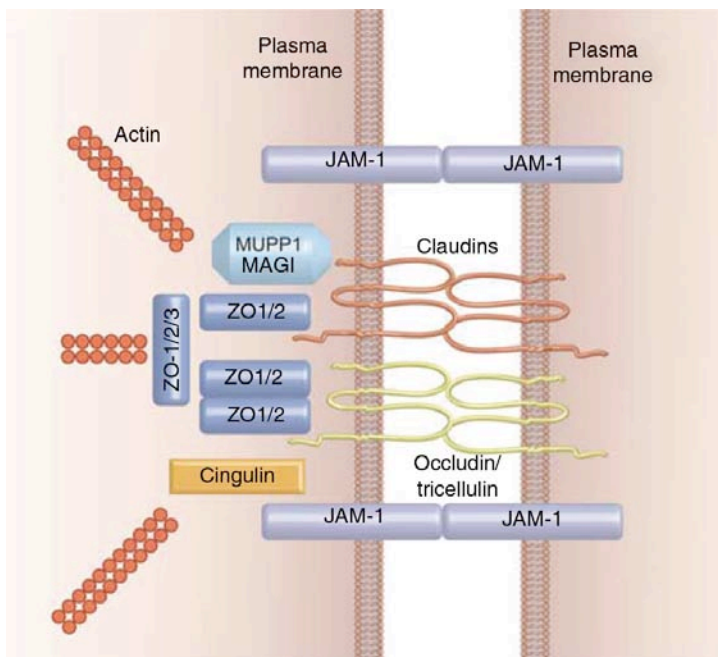


Figura 16. Representación esquemática de la estructura básica de los componentes de las uniones celulares estrechas (TJ). JAM-1: Molécula de adhesión de la unión 1; MAGI: Proteína guanilato quinasa invertida asociada a la membrana; MUPP1: Proteína 1 con múltiples dominios PDZ; ZO-1/2: Zonula occludens 1/2. Extraído de Niessen CM¹⁹⁵.

La alteración de las TJ provocada por la inflamación es una causa importante de enfermedades como la DR, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, fibrosis quística y algunos tipos de cáncer como el cáncer de mama y de próstata. Existen numerosos estudios sobre el efecto de las citoquinas y los factores de crecimiento en la funcionalidad y estructura de las TJ en este tipo de patologías. Las principales citoquinas que regulan las TJ son la interleuquina-1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el interferón γ (IFN- γ), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y el factor de crecimiento derivado de

las plaquetas (PDGF). Estas moléculas, además del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), producen un aumento de permeabilidad y una disminución de la expresión de ZO-1 o de ocludina en células endoteliales y epiteliales¹⁹⁶⁻¹⁹⁸.

2.3.2. Resistencia eléctrica transepitelial y permeabilidad

La resistencia de un epitelio está directamente determinada por las propiedades de las TJ, que regulan el paso de fluidos y solutos entre las células que componen el epitelio a través de la ruta de transporte paracelular. Existen diferentes modelos experimentales y estrategias para estudiar la formación de las TJ y su regulación. La mayoría de ellos consisten en el cultivo de una línea celular epitelial sobre un soporte permeable. Esta metodología permite la medida de parámetros característicos de la integridad y funcionalidad de las TJ que forman la barrera de difusión paracelular. Los dos parámetros que se miden más frecuentemente son la resistencia eléctrica transepitelial (TER) y la permeabilidad paracelular¹⁸⁷. Normalmente una reducción en la resistencia eléctrica transepitelial va acompañada de un aumento de permeabilidad.

La resistencia eléctrica transepitelial de una monocapa de células consiste en la medida instantánea de la conductividad iónica con el objetivo de determinar la integridad, así como la selectividad iónica de las TJ. Se utilizan voltímetros como el EVOM (World Precision Instruments) con un par de electrodos que se colocan a ambos lados de la monocapa y se genera el paso de corriente a través de ellos¹⁹⁹. Para ello es necesario que las células epiteliales se cultiven sobre soportes permeables (transwells) (Fig 17). La resistencia eléctrica transepitelial de una monocapa de células representa la suma de la resistencia paracelular (resistencia de la unión y del espacio intercelular) y de la resistencia transcelular (resistencia de la parte apical y basolateral de la membrana celular)²⁰⁰.

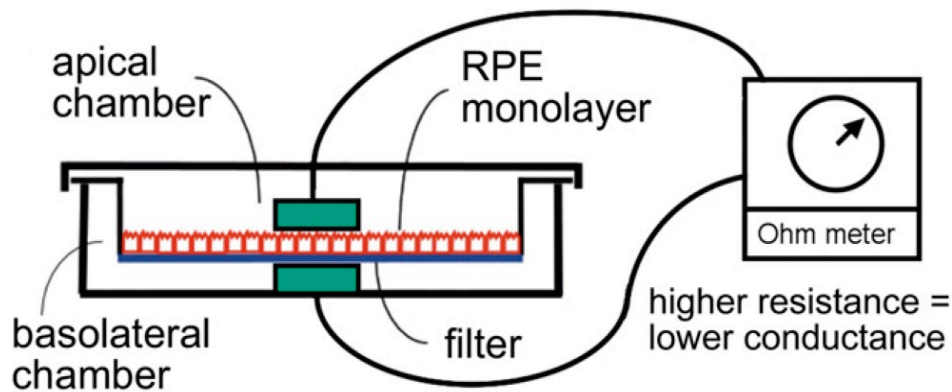


Figura 17. Cultivo de células RPE sobre soportes permeables (transwells) y medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TER). En verde se observan los dos electrodos, colocados en el compartimento apical y en el basal respectivamente, con el fin de cuantificar la resistencia de la monocapa al paso de corriente. Extraído de Rizzolo *et al*²⁰¹.

Otra de las determinaciones es la medida de la permeabilidad paracelular. Se utiliza para cuantificar el paso de moléculas hidrofílicas a través de la monocapa de células durante un periodo de tiempo de varias horas. Permite la evaluación de la difusión lenta a través de las TJ y la determinación de la selectividad por tamaño de la barrera de difusión paracelular. Para ello se utilizan moléculas de diferente peso molecular, como el dextrano conjugado con fluoresceína (FITC-dextran), o conjugadas con radiactividad, como el manitol tritiado o la inulina. La molécula marcada se añade al compartimento apical del transwell y se incuba durante varias horas a 37 grados para permitir su difusión hacia el compartimento basolateral a través de las TJ de la monocapa celular¹⁹⁹.

2.3.3. Componentes

Se han identificado más de 40 proteínas que están asociadas con las TJ, incluyendo proteínas transmembrana, adaptadoras y proteínas de señalización²⁰². Las más estudiadas, en lo referente a la BHR, son la ocludina, claudinas y la zonula occludens.

2.3.3.1. Ocludina

La ocludina fue la primera proteína integral de membrana de la familia de las TJ que se identificó. Fue aislada en 1993 a partir de hígado de pollo por Furuse *et al*²⁰³ y posteriormente en mamíferos por Ando-Akatsuka *et al*²⁰⁴. Su nombre deriva del latín “occludere” que significa cerrar. Igual que las claudinas son proteínas integrales con cuatro regiones transmembrana, dos dominios extracelulares y con los extremos carboxi terminal y amino terminal orientados hacia el citoplasma (Fig 18). En el caso de la ocludina los dos dominios extracelulares son aproximadamente del mismo tamaño, no presentan aminoácidos con carga y son muy ricos en tirosina. En el primer dominio extracelular más de la mitad de los residuos son tirosinas y glicinas (60%). El hecho de no presentar aminoácidos con carga en los dominios extracelulares hace pensar que la ocludina no contribuye directamente a la selectividad de moléculas por carga en los poros de las TJ. Sin embargo, puede aumentar la resistencia eléctrica transepitelial a través de la interacción con residuos cargados de los dominios extracelulares de las diferentes claudinas²⁰⁵. El extremo carboxi terminal se une con la proteína adaptadora ZO-1, así como con la ZO-2 y ZO-3, para unir la ocludina con el citoesqueleto de actina²⁰⁶. Además, tanto por el extremo amino terminal como carboxi terminal interacciona con factores que determinan su localización²⁰⁷.

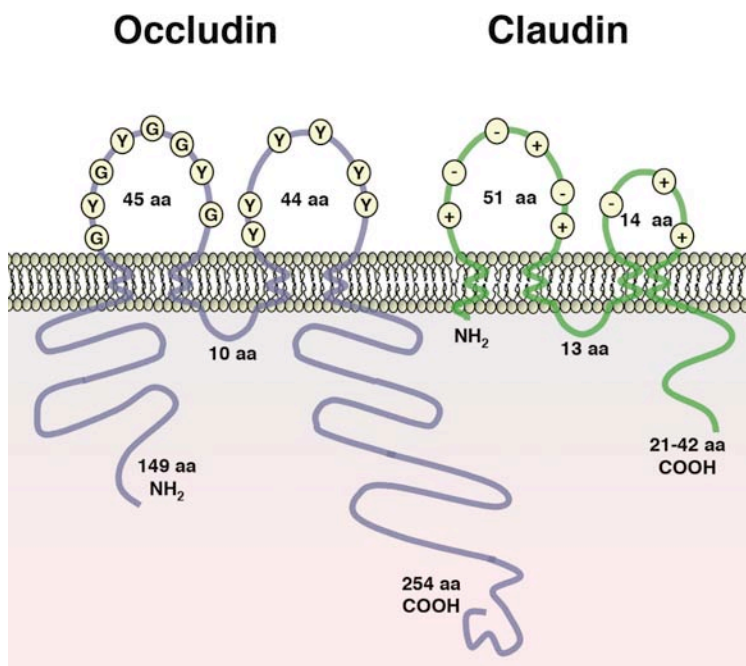


Figura 18. Representación esquemática de las principales proteínas integrales de membrana de las TJ, ocludina y claudina. Extraído de González-Mariscal *et al*²⁰².

La ocludina está formada por 504 aminoácidos y presenta un peso molecular de 55,9 kDa. En la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) se detectan múltiples bandas de ocludina de diferentes pesos moleculares, una de bajo peso molecular (62-68 kDa) y otra de mayor peso molecular (70-82 kDa). La diferencia de tamaño de las bandas corresponde a diferentes grados de fosforilación de la ocludina en residuos de serinas, treoninas y tirosinas. Este tipo de modificación postraduccional se lleva a cabo por proteínas quinasas como la PKC²⁰⁸, caseína quinasa 1 y 2 (CK1 y 2)²⁰⁹, p34^{cdc2}/complejo ciclina-B²¹⁰ y la tirosina quinasa c-yes²¹¹. De este modo se regula la distribución celular de la ocludina, su señalización y sus interacciones con las TJ. En las células epiteliales las ocludinas fosforiladas se localizan en las TJ, mientras que las poco o no fosforiladas se encuentran en el citoplasma²¹². En el caso de las células endoteliales el efecto es opuesto ya que los tratamientos con VEGF o citoquinas provocan un aumento de la fosforilación de la ocludina, cosa que se traduce en un aumento de permeabilidad⁶⁸. La desregulación de la PKC en la diabetes juega un papel importante en el desarrollo de la retinopatía diabética. Factores como el VEGF estimulan la actividad de esta enzima, cosa que provoca un aumento de la fosforilación de la ocludina y un incremento de la permeabilidad en las células endoteliales.

La ocludina es una molécula sensible a cambios de oxidación-reducción. En condiciones reductoras como en la hipoxia o ante el estrés oxidativo producido durante la inflamación, los oligómeros de ocludina tienden a disociarse, produciéndose un desensamblaje de las TJ. En cambio la oxidación favorece la oligomerización y el ensamblaje de las TJ²¹³.

Las ocludinas están implicadas en la función oclusiva de las TJ pero por sí solas no forman uniones estrechas, es necesaria la interacción con las claudinas ya sea directa o indirectamente²¹⁴. Se ha observado que la expresión de ocludina se correlaciona con las propiedades de barrera de algunos tejidos, como en el caso del endotelio arterial y cerebral. Estos tejidos presentan una elevada expresión de ocludina y forman una barrera muy impermeable para limitar el paso de solutos¹⁹⁶. En la retina se han realizado experimentos con RNA de interferencia (siRNA) en los que se demuestra que la ocludina contribuye a la función de barrera de las TJ y a la regulación de la permeabilidad. Phillips *et al.* observó que

el tratamiento de una línea celular humana de RPE (ARPE-19) con siRNA para la ocludina, además de reducir el contenido de esta proteína en un 65%, provocó una disminución del TER del 25% y aumentó la permeabilidad un 15%²¹⁵. Se han realizado estudios en retinas de ratas diabéticas por estreptozotocina en los que se demuestra una disminución en el contenido de ocludina y un cambio en su distribución inducido por el tratamiento con VEGF. Antonetti *et al.* observó el mismo efecto, tanto en ratas diabéticas como en células endoteliales de retina bovina (BREC) tratadas con VEGF, con el consiguiente aumento de permeabilidad²¹⁶. En cultivos de células de RPE el tratamiento con HGF produce cambios en la distribución y en el contenido de las TJ, así como un aumento de permeabilidad. Este efecto se debe a que el HGF estimula la fosforilación de la ocludina y de la ZO-1, induciendo su migración desde la membrana hacia el citoplasma, y provoca una reducción en el contenido neto de éstas¹⁹⁸. De todos estos estudios se concluye que los cambios en el contenido de la ocludina están asociados con una alteración de la permeabilidad en la retina y sugieren un posible papel en la regulación del flujo paracelular de iones y otras moléculas.

2.3.3.2. Claudinas

Las claudinas fueron descubiertas por Furuse y Tsukita en 1998 a partir de la misma fracción de hígado de pollo donde previamente habían identificado la ocludina. Después de los resultados obtenidos en los experimentos con ratones KO para la ocludina, Tsukita y sus colaboradores continuaron buscando otras proteínas de TJ y fue así como descubrieron las claudinas, en concreto la claudina-1 y la claudina-2²¹⁷. Su nombre deriva del latín “claudere” que significa cerrar.

Son una familia multigénica compuesta por 24 tipos diferentes de proteínas transmembrana con un peso molecular de 20-27 kDa. Son proteínas integrales con unos dominios estructurales similares a los de la ocludina. Presentan cuatro regiones transmembrana, dos dominios extracelulares y los extremos carboxi terminal y amino terminal orientados hacia el citoplasma (Fig 18). A diferencia de la ocludina los dos dominios extracelulares son de diferente tamaño, siendo el primer dominio mucho mayor que el segundo y presentan gran cantidad de residuos cargados (+, -) que influyen en el paso de iones

a través del espacio extracelular²⁰². La secuencia de aminoácidos del primer dominio varía entre los diferentes tipos de claudinas. Está implicado en las interacciones homofílicas (entre el mismo tipo de claudinas) y heterofílicas (entre diferentes tipos de claudinas) y es el responsable de la selectiva permeabilidad paracelular de las TJ^{218,219}. El extremo carboxi terminal de la claudina es más corto que el de la ocludina. Presenta sitios de fosforilación y motivos de unión PDZ, a través de los cuales se une a proteínas adaptadoras con dominios PDZ como la ZO-1, 2 y 3 para anclarse al citoesqueleto de actina²²⁰.

Las claudinas son los componentes mayoritarios de las uniones celulares estrechas. Son las responsables de la formación de las fibrillas características de las TJ y son un elemento fundamental en la regulación de la permeabilidad paracelular y en la formación de poros selectivos de iones. Cuando se transfectan fibroblastos, que normalmente no forman TJ, y se sobreexpresa la claudina se observan filas de partículas de 10 nm que forman las uniones celulares estrechas²¹⁴. La claudina-1 es un componente estructural de las TJ muy estable, con una fracción móvil del 25%. Cuando se elimina el extremo carboxi terminal que contiene el dominio de unión PDZ y se impide la interacción con la ZO-1 y 2, no se observan cambios en la estabilidad de la claudina-1. Este hecho sugiere que la interacción con la ZO no es necesaria para la estabilización de la claudina-1, una vez ensamblada en las TJ. A diferencia de la claudina, la ocludina presenta una fracción móvil del 80% y es mucho más dinámica. Tiene una función más importante como copolimerizadora y ayudando a regular la formación de las TJ, que como componente estructural. Mientras que la ocludina es una proteína sensible a cambios de oxidación-reducción, las claudinas se ven poco afectadas por el estrés oxidativo²²¹.

Los diferentes tipos de claudinas se pueden clasificar en dos categorías funcionales, las que aumentan la permeabilidad paracelular a través de la formación de poros como la claudina-2, 7, 10, 15 y 16, y las claudinas que reducen la permeabilidad paracelular porque tienen una función de sellado como la claudina-1, 3, 5, 11 y 19²²¹. Presentan una distribución variable según el tejido donde se expresen y son las responsables de la variedad de resistencias eléctricas y selectividad iónica paracelular de los epitelios y endotelios²⁰². La claudina-1 se expresa en muchos tejidos del cuerpo y tiene una función muy importante actuando como

barrera para aumentar la resistencia epitelial. Los ratones KO para claudina-1 presentan un fenotipo embrionario letal debido a un aumento en la permeabilidad de la epidermis que les provoca una grave deshidratación y la muerte al primer día de vida. En estos ratones, las células que expresan ocludina pero no claudina-1 permiten el paso de moléculas marcadas, demostrándose así que la combinación de claudina-1 y ocludina es necesaria para la formación de una barrera paracelular efectiva²²². Algunas claudinas son características de ciertos tipos celulares, como la claudina-5 en el caso de células endoteliales o la claudina-11 que se expresa en los oligodendrocitos y las células de Sertoli. Otras se expresan durante el desarrollo embrionario como la claudina-6. En el caso de la retina las claudinas mayoritarias son la claudina-5 en las células endoteliales y la claudina-1, 3 y 19 en el RPE. Otros tejidos con gran expresión de diferentes tipos de claudinas son el riñón, el tracto gastrointestinal y el tracto respiratorio²²³.

La regulación de las claudinas y por consiguiente de las propiedades de las TJ ocurre en varios niveles, como regulación transcripcional, modificaciones postraduccionales, interacción con proteínas adaptadoras, interacción con claudinas de la misma membrana (interacción-*cis*) o interacción con claudinas de células vecinas (interacción-*trans*). En conjunto, todos estos procesos determinan el ensamblaje de las TJ, la remodelación y su degradación. A nivel transcripcional los mayores reguladores de las claudinas son el TNF- α , el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) y el TGF- β . En condiciones experimentales el tratamiento con citoquinas como el TNF- α , IFN- γ e IL-13, las cuales se encuentran elevadas en la enfermedad inflamatoria intestinal, provoca una disminución de la expresión de las claudinas-1, 3, 4, 5, 7, 8 y un incremento de la claudina-2 (claudina formadora de poro) similar al observado en estos pacientes²²³. Amasheh *et al.* demostró en la línea celular intestinal HT-29/B6 que el tratamiento con TNF- α disminuía la expresión de claudina-1 y aumentaba la expresión de claudina-2 actuando a través de la vía del NF- κ B²²⁴. Resultados similares se han observado en el caso de la BHE, donde el TNF- α provoca una disminución de la expresión de claudina-5 a través de la vía de NF- κ B, afectando a la funcionalidad de dicha barrera²²⁵. El TGF- β también tiene un papel importante en la transición epitelio mesénquima en algunos tipos de tumores, así como en el desarrollo vascular y en el mantenimiento de la funcionalidad de la barrera intestinal. En células

endoteliales el TGF- β , a través de SMAD 2/3 produce una disminución de la expresión de claudina-5²²⁶. En tumores de cáncer de mama invasivos y en adenocarcinomas de colon, alteraciones en la vía del TGF- β /SMAD provocan diferencias de expresión en varios tipos de claudinas que están relacionadas con riesgo de metástasis^{227,228}. La localización de las claudinas y su inserción en las TJ se regula por diferentes mecanismos de modificación postraduccional siendo el más importante la fosforilación. El caso de la claudina-1 la fosforilación por enzimas como la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), PKC o PKA promueve su inserción en la TJ^{229,230}. Otros mecanismos de modificación postraduccional que determinan la localización de las claudinas son la palmitoilación y la O-glicosilación en residuos del extremo carboxi terminal, y la N-glicosilación en residuos del primer dominio extracelular²²³.

2.3.3.3. Zonula Occludens

En 1986, Stevenson *et al.* identificaron a partir de células epiteliales de riñón canino Madin-Darby (MDCK) la primera proteína asociada de TJ, a la que llamaron zonula occludens-1 (ZO-1)²³¹. A principios de los 90 se secuenció su cDNA y se descubrió su homología con la proteína supresora de tumores Dlg de *Drosophila* y con la proteína de unión sináptica PSD95/SAP90²³². Posteriormente ZO-2²³³ y ZO-3²³⁴ fueron identificadas como proteínas que coimmunoprecipitaban con la ZO-1. La ZO-1 es una proteína de 220 kDa, mientras que la ZO-2 y la ZO-3 tienen un peso molecular de 160 y 130 kDa respectivamente. Todas ellas pertenecen a la familia de las guanilato quinazas asociadas a la membrana (MAGUK), las cuales se caracterizan por tener tres dominios estructuralmente conservados: PDZ, de homología al dominio 3 de la proteína Src (SH3) y guanilato quinasa (GuK). Los dominios PDZ son muy importantes para el agrupamiento y el anclaje de proteínas transmembrana. Las proteínas que contienen múltiples dominios PDZ, como por ejemplo PSD95, Dlg y ZO-1, funcionan como adaptadores para reclutar proteínas integrales, de señalización o del citoesqueleto en regiones específicas de la membrana citoplasmática. En las proteínas MAGUK, el dominio GuK no es enzimáticamente activo debido a la ausencia de ciertos aminoácidos críticos para la unión del guanósín monofosfato (GMP) y del adenosín

trifosfato (ATP). En su lugar, el dominio GuK actúa mediando las interacciones entre proteínas y la asociación intramolecular con el dominio SH3. La ZO-1 contiene múltiples dominios de unión que le permiten organizar la estructura de las TJ (Fig 19). A través del dominio PDZ-1 interactúa con la claudina²²⁰, el dominio PDZ-2 facilita la dimerización de la ZO-1 mediante la interacción con la ZO-2²³⁵ y a la región SH3-GuK se unen diversas proteínas como la ocludina²³⁶ y dos proteínas de las uniones de adherencia, afadina²³⁷ y cadherina vía α -catenina²³⁸. Finalmente el extremo carboxi terminal, rico en prolina, interactúa con la F-actina para unir las TJ a los microfilamentos del citoesqueleto²³⁹.

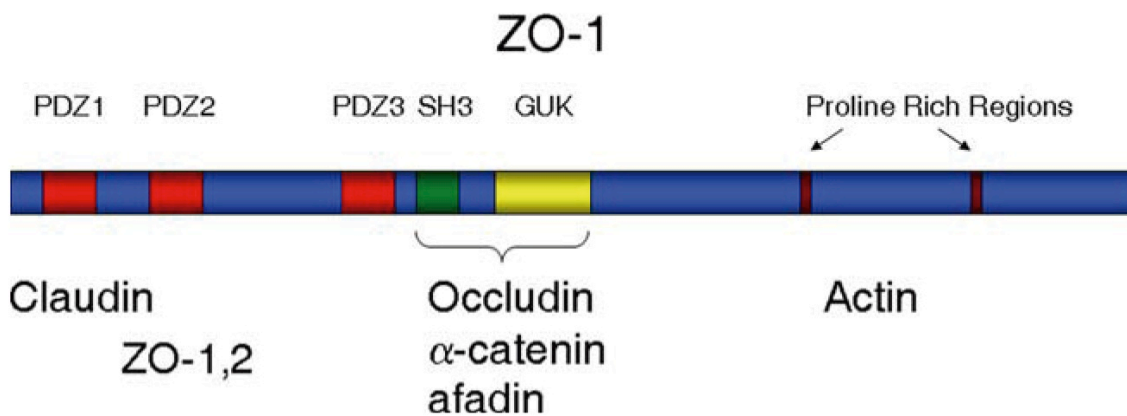


Figura 19. Representación esquemática de la proteína adaptadora de *tight junction* Zonula occludens 1 (ZO-1). Se muestran los diferentes dominios de unión, así como las proteínas con las que interactúa. Extraído de Erickson *et al*⁹².

Las tres ZO presentan diferente expresión según el tejido. La ZO-1 y ZO-2 se expresan tanto en células epiteliales como endoteliales, mientras que la ZO-3 se expresa exclusivamente en los epitelios. La expresión de la ZO-1 se regula a nivel postranscripcional por splicing alternativo. Esta proteína tiene en su extremo carboxi terminal un dominio de splicing alternativo de 80 aminoácidos llamado motivo α . La isoforma α^+ es cuantitativamente más abundante en células epiteliales y la α^- es mayoritaria en células endoteliales, aunque las dos se expresan en los dos tipos celulares. Estas isoformas tienen diferentes funciones, la α^+ está relacionada con la formación de TJ funcionales mientras que la α^- se relaciona con TJ dinámicas a lo largo de la membrana lateral de la célula como en el caso de las células de Sertoli o células que no presentan TER como los podocitos^{240,241}.

Las proteínas asociadas a TJ, como la ZO, tienen funciones muy diversas debido a las múltiples interacciones con otras moléculas. Su función principal es regular la permeabilidad paracelular y actuar como barrera. Permiten la polimerización de las claudinas en la parte apical de la membrana lateral y actúan como un nexo de unión entre las proteínas transmembrana de las TJ y el citoesqueleto de actina y miosina. Además, reclutan moléculas como las quinasas y las fosfatasas que regulan la estabilidad de las TJ. A parte de estas funciones juegan un papel muy importante en la organización de procesos como la morfogénesis, el establecimiento de la polaridad, la proliferación celular y la diferenciación²⁴². Por todo ello se cree que la placa citoplasmática de las TJ es una de las regiones donde se coordinan más vías de señalización. En dicha placa se pueden encontrar dos tipos de proteínas, las asociadas a las TJ y las proteínas de señalización. Las primeras son proteínas asociadas a la ZO-1, como la ZO-2, ZO-3, AF6 y cingulina, cuya función es organizar las proteínas transmembrana y anclarlas a otras proteínas citoplasmáticas y a los filamentos de actina. Las proteínas de señalización, como el factor de transcripción asociado a ZO-1 (ZONAB), RhoA, RalA y Raf-1, intervienen en el ensamblaje de las TJ, en la regulación de la permeabilidad y en la transcripción génica²⁰⁵. Un ejemplo es el caso de la ZO-1 que funciona como un inhibidor de la proliferación y lo hace a través del factor de transcripción ZONAB. En células que están proliferando, la ZO-1 se localiza en el núcleo a unos niveles bajos mientras que los niveles de ZONAB en el núcleo son elevados, estimulando así la transcripción de genes reguladores del ciclo celular. Sin embargo, en células confluentes se observa un aumento en los niveles de ZO-1 en las TJ y una redistribución de ZONAB que pasa del núcleo al citoplasma, para ser reclutado posteriormente en las TJ¹⁸⁹.

El grado de fosforilación de la ZO-1 tiene un papel esencial en la permeabilidad y la remodelación de las TJ. Antonetti *et al.* Observaron que el tratamiento con VEGF en células endoteliales de retina de rata producía un aumento de la fosforilación de la ZO-1 en los residuos de tirosina, así como un aumento de la fosforilación de la ocludina. En los dos casos, este aumento de la fosforilación estaba relacionado con un incremento de la permeabilidad paracelular²⁴³. En los experimentos realizados por Stevenson *et al.* en células MDCK, se observó que las células con menor TER presentaban mayores niveles de ZO-1 fosforilada en comparación con las monocapas que tenían TER elevado²⁴⁴. La ZO-1 puede

ser regulada por fosforilación en residuos de tirosina, mediada por la vía de señalización de MAPK, o por fosforilación en residuos de serinas y treoninas por parte de quinasas como la PKC o la quinasa asociada a la ZO-1 (ZAK)^{245,246}.

La inhibición de la expresión de los tres tipos de ZO demostró que tanto la ZO-1 como la ZO-2 son imprescindibles para la formación de las TJ y para su función de barrera. Umeda *et al.* utilizaron en sus experimentos una línea de células epiteliales (Eph4) que no expresaba la ZO-1 ni la ZO-3 y bloquearon la expresión de la ZO-2 con ARN de horquilla pequeña (shRNA). Como consecuencia de esta triple inhibición, las proteínas transmembrana de las TJ como la ocludina, claudina y JAM, estaban desorganizadas y se redujo la función de barrera del epitelio, observándose un aumento de permeabilidad y una disminución del TER. Sin embargo, la expresión exógena de ZO-1, ZO-2 o de las dos proteínas permitió la polimerización de la claudina y la formación de las TJ²⁴⁷.

Se han realizado estudios con citoquinas, hormonas, y factores de crecimiento que relacionan la abundancia de ZO-1 con el grado de oclusión de las TJ. En el caso de la BHE, citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β favorecen la ruptura de esta barrera debido a la degradación y disminución de la síntesis de las proteínas de TJ, especialmente de ocludina y ZO-1. El aumento de las metaloproteinasas (MMP) de la matriz extracelular y la reducción de los inhibidores de metaloproteinasas provocado por la inflamación, es una de las causas de la disrupción de la BHE²⁰⁵. En la retinopatía diabética también se observan alteraciones de la BHR debido a la degradación poteolítica de las TJ por parte de las metaloproteinasas. Se han encontrado niveles elevados de MMP-9 en células endoteliales de retina cultivadas en medio con elevada concentración de glucosa. Estas células presentaban un aumento de la degradación de ocludina y una alteración generalizada de las TJ²⁴⁸. Además de la glucosa y las citoquinas proinflamatorias, la hipoxia también contribuye a la producción de MMP en la retina. Lo hace estimulando la secreción de TGF- β por parte de las células de Müller, el cual favorece la síntesis endotelial de MMP²⁴⁹. Otro de los factores implicado en la disrupción de las TJ de las células endoteliales en la retina es el VEGF. Este factor produce una activación de la PKC, la cual fosforila a la ZO-1 y a la ocludina, provocando así un aumento de la permeabilidad vascular⁶⁸.

3. AMPK

3.1. ESTRUCTURA

La quinasa activa por monofosfato de adenina (AMPK) es un sensor de energía evolutivamente conservado en eucariotas. Se activa cuando aumenta la relación AMP/ATP en la célula, con el objetivo de estimular vías metabólicas que generen ATP e inhibir vías anabólicas que lo consuman para mantener el balance energético de la célula.

La AMPK es un complejo enzimático heterotrimérico formado por una subunidad catalítica (α) y dos subunidades reguladoras (β y γ) (Fig 20). Cada una de ellas tiene dos o más isoformas que se expresan de diferente manera según el tejido²⁵⁰. La subunidad catalítica AMPK α tiene dos isoformas ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) que en mamíferos están codificadas por dos genes (*PRKAA1* y *PRKAA2*) respectivamente. En el caso de la isoforma $\alpha 1$ es principalmente citoplasmática, mientras que la isoforma $\alpha 2$ es nuclear y juega un papel importante en la regulación transcripcional. Las dos isoformas contienen un dominio serina/treonina quinasa en la región N-terminal, con un residuo conservado de treonina (Thr) en la posición 172 cuya fosforilación es imprescindible para la correcta activación y funcionamiento de la AMPK²⁵¹. La región C-terminal es necesaria para la interacción de la subunidad α con la β . La subunidad reguladora AMPK β también tiene dos isoformas ($\beta 1$ y $\beta 2$) codificadas por los genes *PRKAB1* y *PRKAB2* respectivamente. La región C terminal de esta subunidad actúa como un puente donde se unen la subunidad α y la γ y permite el correcto ensamblaje de del complejo enzimático. También contiene un dominio central conocido como dominio de unión a glucógeno (GBD), a través del cual interacciona con moléculas de este carbohidrato. Se cree que es a través de este dominio GBD como la AMPK es sensible a las reservas celulares de energía en forma de glucógeno²⁵². Finalmente la subunidad AMPK γ tiene tres isoformas ($\gamma 1$, $\gamma 2$ y $\gamma 3$) codificadas por tres genes diferentes (*PRKAG1*, *PRKAG2* y *PRKAG3*). Esta subunidad reguladora contiene los sitios de unión de nucleótidos de adenina, formados por 4 repeticiones en tándem de una secuencia conocida como motivo CBS, debido a su identificación por primera vez en la enzima cistationina- β -sintasa. En una de las repeticiones

se une el adenosín monofosfato (AMP) específicamente y de una manera tan fuerte que no se intercambia con adenosín difosfato (ADP) o ATP. Esta unión tiene un papel estructural porque causa un cambio conformacional en la AMPK que impide la desfosforilación de la Thr¹⁷². Sin embargo en las otras repeticiones el AMP, ADP y ATP compiten por unirse, cosa que permite a la célula detectar su estado energético²⁵³.

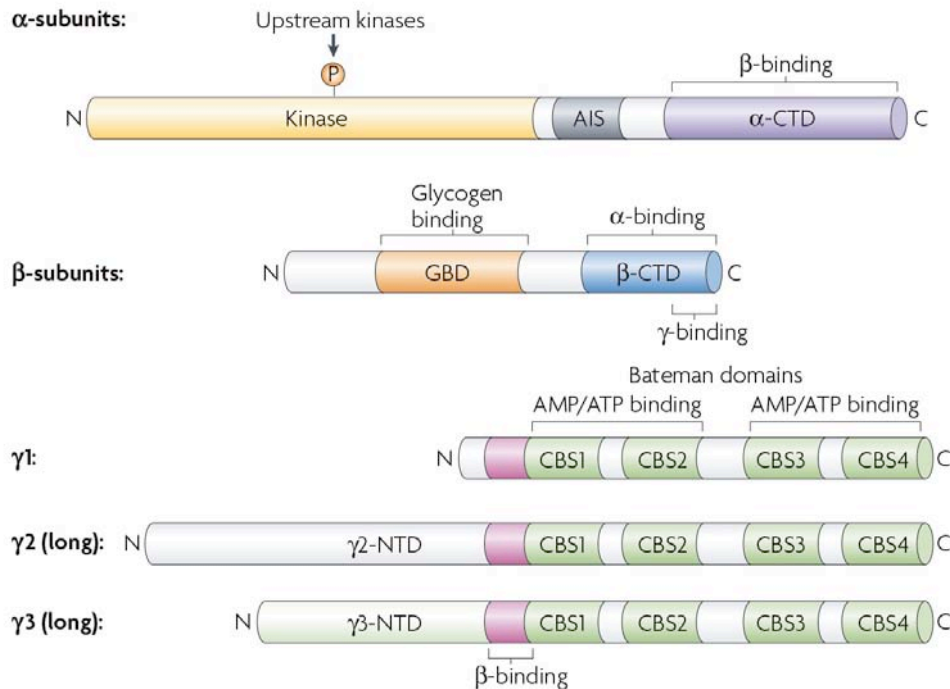


Figura 20. Estructura de las tres subunidades que componen la AMPK. Se muestran los diferentes dominios de cada una de las subunidades. Debido a que las isoformas $\alpha 1/\alpha 2$ y $\beta 1/\beta 2$ son muy similares se muestra un ejemplo de cada una de ellas. AIS: Autoinhibitory sequence; CBS: Cystathionine β -synthase; CTD: C-terminal domain; GBD: Glycogen-binding domain; NTD: N-terminal domain. Extraído de Hardie DG²⁵⁰.

3.2. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD

La activación de la AMPK se produce debido a un aumento en la concentración de AMP provocado por cambios metabólicos o estímulos ambientales que consumen ATP. La unión del AMP a la subunidad γ provoca un cambio conformacional que expone el residuo de Thr¹⁷² de la subunidad α a la acción de las quinasas para su fosforilación, además de activar

alostéricamente el complejo AMPK ya fosforilado. Este cambio conformacional reduce la afinidad de la AMPK por las fofastasas, como la proteína fosfatasa 2C (PP2C), evitando así la desfosforilación. Todos estos mecanismos en conjunto producen un aumento de la actividad de la AMPK superior a 2000 veces²⁵⁴. Como la AMPK es sensible a los cambios de AMP/ATP, cuando los niveles de ATP aumentan se produce una inactivación de esta enzima debido a la desfosforilación del residuo Thr¹⁷² por acción de las fosfatasas.

Existen tres tipos diferentes de quinasas que pueden fosforilar la AMPK. La principal activadora es la quinasa LKB1 y sus subunidades accesorias STRAD y MO25. LKB1 fue descubierta originariamente como una proteína supresora de tumores y está mutada en el síndrome de Peutz-Jeghers de susceptibilidad a cáncer humano²⁵⁵. En segundo lugar se encuentra la proteína quinasa dependiente de calcio-calmodulina (CaMKK β), que activa la AMPK estimulada por señales que provocan un aumento del calcio en el citoplasma en vez de un aumento de AMP. En este caso la activación de la AMPK puede entenderse como un mecanismo para anticipar grandes demandas de ATP, las cuales suelen ir acompañadas de un aumento de calcio citosólico. Mientras que LKB1 se encuentra en todos los tipos celulares, la expresión de CaMKK β es más restringida expresándose preferentemente en tejido neural, células endoteliales y células hematopoyéticas²⁵⁶⁻²⁵⁸. Finalmente, la proteína quinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante- β (TAK1) es otro de los activadores del dominio catalítico de la AMPK. TAK1 se fosforila en respuesta a los receptores de citoquinas y participa en la vía de señalización de las MAPK (JNK) y de NF- $\kappa\beta$ ²⁵⁹.

La AMPK puede ser activada farmacológicamente *in vitro* o *in vivo* por diferentes tipos de compuestos. El ribósido de 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR) es un análogo de la adenosina que se utiliza frecuentemente como activador farmacológico de la AMPK en estudios experimentales. El AICAR entra en las células mediante transportadores de adenosina y es convertido por la adenosina quinasa en un nucleótido monofosforilado llamado ZMP. En la célula el ZMP se une a la subunidad γ de la AMPK simulando todos los efectos del AMP, tanto en la activación alostérica de la quinasa como en la inhibición de la desfosforilación, aunque es un activador menos potente²⁶⁰. La AMPK también puede ser

activada por dos tipos de fármacos para el tratamiento de la diabetes de tipo 2, las biguanidas como la metformina y las tiazolidinedionas como la pioglitazona. Estos fármacos activan la AMPK de manera indirecta mediante la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria de la mitocondria, lo cual provoca una disminución en la síntesis de ATP y un aumento de la ratio AMP/ATP dentro de la célula²⁶¹. Sustancias naturales como el resveratrol y la berberina también producen una activación indirecta de la AMPK mediante la inhibición mitocondrial de la producción de ATP²⁶².

3.3. FUNCIONES

La función principal de la AMPK es actuar como un sensor de los niveles de energía en la célula. Esta enzima se activa cuando aumenta la ratio AMP/ATP debido a estímulos que inhiben la producción de ATP, como la hipoxia y la privación de glucosa, o procesos que favorecen el consumo de ATP, como la activación de proteínas motoras, la división celular y las vías biosintéticas. Una vez fosforilada, la AMPK activa vías catabólicas que generan ATP como la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos y también inhibe vías anabólicas como la síntesis de glucógeno, proteínas, colesterol y ácidos grasos, así como el crecimiento celular. Todo ello se consigue a corto plazo mediante la fosforilación de enzimas metabólicos clave y a largo plazo mediante la regulación de la transcripción de genes implicados en estos procesos²⁵⁰.

Además de sus efectos sobre el metabolismo, la AMPK juega un papel importante en establecimiento y el mantenimiento de la polaridad celular, especialmente en células epiteliales. Estudios en *Drosophila melanogaster* demostraron que la quinasa LKB1 es necesaria para la polarización de las células epiteliales y que mutaciones en este gen son letales durante el desarrollo de los embriones²⁶³. Baas *et al.* observó en sus experimentos con líneas celulares de epitelio intestinal (LS174T) que al inducir la expresión de la unidad reguladora STRAD y activar LKB1, se producía una remodelación del citoesqueleto de actina, la formación de las TJ y la completa polarización de dichas células²⁶⁴. En la misma línea celular se observó una respuesta muy similar cuando se activó la AMPK al reducir los niveles

de ATP utilizando 2-desoxiglucosa, un inhibidor de la glucólisis²⁶⁵. En experimentos con células epiteliales MDCK se ha observado que la activación de la AMPK es necesaria para la repolarización de la monocapa, después de haberse producido cambios en las concentraciones de calcio del medio. Esta eliminación de calcio del medio de cultivo provoca la disrupción de las TJ y la pérdida de polaridad. Una vez reintroducido el calcio, la activación de la AMPK juega un papel importante porque facilita el ensamblaje de las TJ y la repolarización de la monocapa^{266,267}.

Los efectos de la activación de la AMPK pueden ser diferentes según el tipo celular. Scharl *et al.* observó en células epiteliales de intestino (T₈₄) que el tratamiento con IFN- γ estimula la activación de la AMPK, independientemente de los niveles celulares de energía. Como consecuencia se produce una reducción del TER y un aumento de la permeabilidad celular, así como una disminución de la expresión de las proteínas de TJ ocludina y ZO-1, alterando las propiedades de barrera del epitelio intestinal²⁶⁸.

4. MATRIZ EXTRACELULAR

4.1. ESTRUCTURA

La membrana de Bruch (BM) es una estructura pentalaminar, situada entre el RPE y los capilares fenestrados de la coroides. Esta localización estratégica entre la retina y la circulación sistémica hace que juegue un importante papel en la funcionalidad de la retina regulando procesos como el intercambio de nutrientes, oxígeno y eliminación de desechos metabólicos así como la comunicación celular y la proliferación.

Según la clasificación de Hogan en 1960 la BM está formada por cinco capas (Fig 21)²⁶⁹. La primera de ellas, desde la retina hacia la coroides, es la membrana basal del RPE. Es una membrana basal continua de unas 0,14-0,15 μm de grosor y con una composición muy similar a la membrana basal de los coriocapilares (colágeno de tipo IV, laminina, fibronectina, heparán sulfato y condroitín/dermatán sulfato). A diferencia de la membrana basal de la coroides, la membrana basal del RPE no presenta colágeno VI. En segundo lugar se encuentra la capa de colágeno interna (ICL). Está formada por fibras de colágeno I, III y V organizadas en una estructura de red, entre las cuales se encuentran glicosaminoglicanos y componentes del sistema de coagulación y del complemento. La tercera capa es la capa de elastina (EL), formada principalmente por fibras de elastina y por algunas fibras de colágeno VI y fibronectina. Frecuentemente las fibras de la capa de colágeno interna y externa cruzan esta capa de elastina. A continuación se encuentra la capa de colágeno externa (ECL), de menor grosor que la ICL pero de idéntica composición. La última capa corresponde a la membrana basal de los coriocapilares. A diferencia de la membrana basal del RPE es discontinua y presenta colágeno VI como componente mayoritario. Este tipo de colágeno está implicado en la adhesión de la BM a las células endoteliales de los capilares de la coroides. También contiene laminina, heparán sulfato y colágeno de tipo IV y V²⁷⁰.

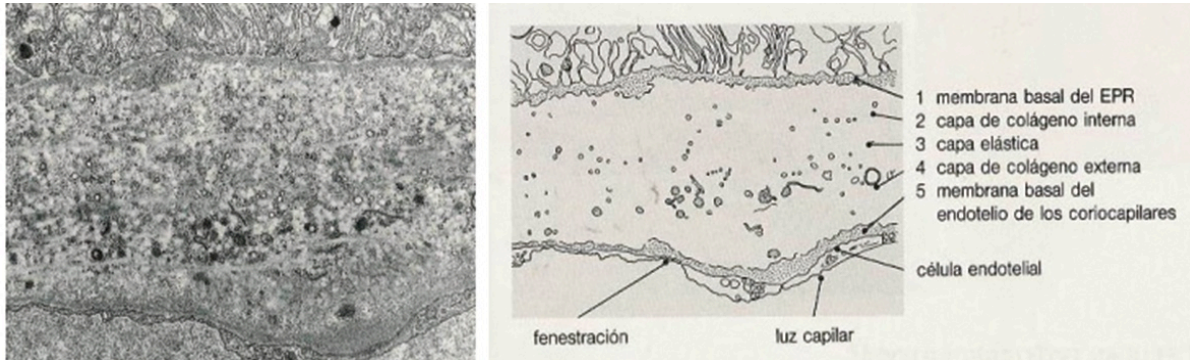


Figura 21. Fotografía de la membrana de Bruch obtenida con un microscopio electrónico de transmisión y representación esquemática donde se muestran las cinco capas que la componen. Extraído de <http://kepler.uag.mx>

En 1949 Ashton describió por primera vez una alteración estructural en la membrana basal de pacientes con DR al observar un aumento de grosor y de intensidad en las tinciones²⁷¹. Estudios posteriores en pacientes diabéticos tipo I y tipo II han establecido el engrosamiento de la membrana basal como una de las primeras y principales alteraciones estructurales de la DR debido a la acumulación excesiva de componentes de la matriz extracelular. El engrosamiento de la membrana basal afecta a la integridad y a la funcionalidad de la BHR. Provoca cambios estructurales en los capilares de la retina que resultan en una pérdida de células endoteliales, un incremento de la permeabilidad vascular y a largo plazo en una pérdida de visión asociada a DR²⁷².

4.2. COMPOSICIÓN

Como se ha mencionado en el punto anterior, la BM está compuesta por varias proteínas estructuradas de una manera muy organizada. Por su naturaleza acelular, la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular depende principalmente del RPE y de la coroides. El RPE también produce metaloproteinasas (MMP) e inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP), cuyo balance determina la remodelación de la BM. A lo largo de la vida se duplica su grosor debido a la reducción de la solubilidad de las fibras de colágeno

al aumentar el número de entrecruzamientos y al incremento en la deposición de moléculas²⁷³. Los componentes principales de la BM son colágeno IV, fibronectina, laminina y proteoglicanos como el heparán sulfato (Fig 22).

4.2.1. Colágeno IV

El colágeno IV es un tipo de colágeno que se encuentra exclusivamente en la membrana basal y tiene un peso molecular de 500 kDa. Tiene una estructura de triple hélice, formada por dos cadenas $\alpha 1$ idénticas y una cadena $\alpha 2$. Las moléculas de colágeno IV interaccionan entre ellas para formar dímeros por el sitio de unión NC1 localizado en el extremo C-terminal. Estos dímeros se entrecruzan con otros por el dominio 7S situado en el extremo N-terminal para crear una organización en forma de red. El colágeno IV también presenta sitios de unión, como el dominio CD3, a través de los cuales interacciona con las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ permitiendo la adhesión de las células a la membrana basal y el inicio de la señalización celular²⁷⁴. Diferentes estudios han demostrado que tanto la diabetes como la hiperglicemia estimulan la síntesis de colágeno IV en las células vasculares de la retina contribuyendo al engrosamiento de la membrana basal^{272,275}.

4.2.2. Fibronectina

La fibronectina es un componente muy importante de la membrana basal porque facilita el mantenimiento de la organización y de la estructura. Interviene en la adhesión, migración, crecimiento celular y diferenciación debido a interacciones específicas con otros componentes de la matriz extracelular. Es un dímero formado por dos grandes subunidades idénticas de 250 kDa unidas por el extremo C-terminal a través de puentes disulfuro²⁷⁶. Como en el caso del colágeno IV, existen estudios *in vivo* e *in vitro* donde se observa un aumento de la síntesis de fibronectina y una acumulación de esta proteína en la membrana basal de las células vasculares de la retina^{272,277}.

4.2.3. Laminina

Esta glicoproteína es el componente mayoritario de la membrana basal. Con un peso molecular de 820 kDa está formada por tres cadenas polipeptídicas: α , β y γ que presentan sitios de unión a integrinas y a heparán sulfato. Como otras proteínas de matriz interviene en la adhesión celular, proliferación, diferenciación y movilidad.

4.2.4. Heparán sulfato

Este proteoglicano es otro de los componentes mayoritarios de la membrana basal. Está formado por cadenas largas de glicosaminoglicanos de 65 kDa cada una, unidas covalentemente a una única cadena polipeptídica de 400 kDa. Su función principal es contribuir a la adhesión celular mediante la interacción con otros componentes de la membrana basal.

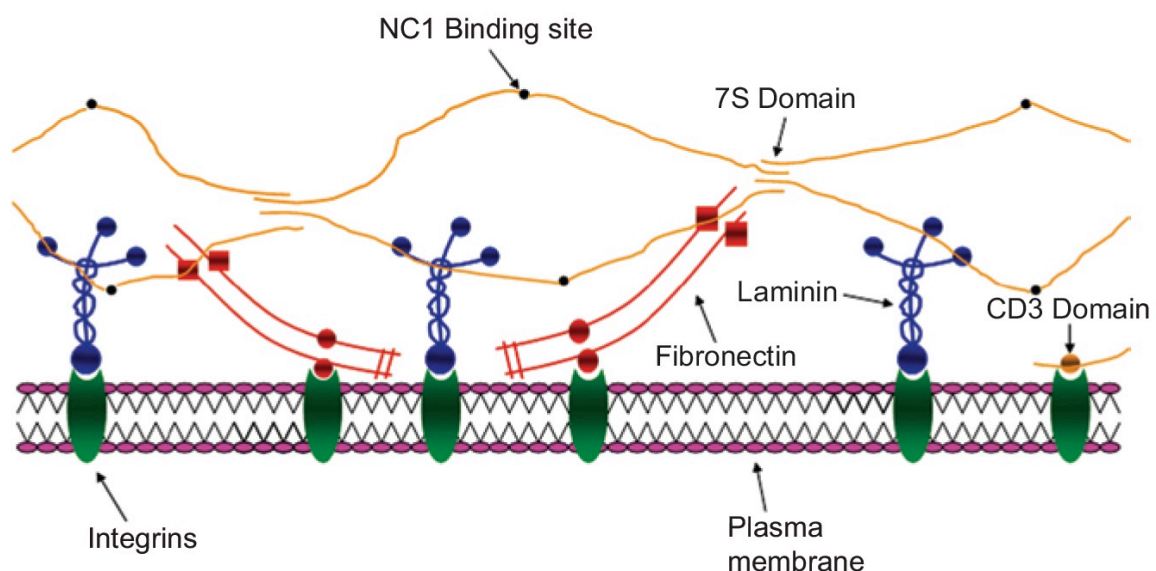


Figura 22. Composición de la membrana basal e interacciones entre sus componentes. En amarillo se muestran los dímeros de colágeno IV unidos entre sí por el sitio de unión NC1 e interaccionando con otros dímeros por el dominio 7S. También pueden unirse a integrinas (verde) por el dominio CD3. El resto de componentes como la fibronectina (rojo) y laminina (azul) pueden interaccionar tanto con el colágeno IV como con las integrinas a través de sitios específicos e unión. Extraído de Roy *et al*²⁷⁸.

4.3. FUNCIONES

Debido a su localización estratégica entre la retina y la circulación sistémica, la BM ejerce un papel muy importante en la funcionalidad retiniana y en la patología ocular. Además de regular el intercambio de nutrientes también participa en la diferenciación celular, proliferación, migración y remodelación de tejidos durante los procesos patológicos. Las principales funciones de la membrana basal y por consiguiente de la membrana de Bruch de la cual forma parte son tres: regula la difusión de moléculas entre la coroides y el RPE, aporta un soporte físico para la adhesión del RPE a la membrana y actúa como una barrera física para prevenir la migración celular a través de la membrana.

Difusión de moléculas

La BM actúa como una barrera semipermeable regulando el intercambio de moléculas entre la retina y la coroides. Debido a la ausencia de componente celular en esta membrana el transporte de moléculas es pasivo y está regulado por procesos de difusión. La difusión a través de la BM depende principalmente de su composición molecular, que puede variar según la edad y la localización en la retina, y también de otros factores como la presión hidrostática a los dos lados de la membrana y de la concentración de las sustancias que se intercambian. Las que atraviesan la BM desde la coroides hacia el RPE son nutrientes, lípidos, precursores de pigmentos, vitaminas, oxígeno, minerales y antioxidantes, todas ellas moléculas necesarias para el correcto funcionamiento de los fotorreceptores y de la neuroretina. En sentido contrario, desde el RPE hacia la coroides, se transportan principalmente productos de deshecho como CO₂, agua, iones, lípidos y colesterol oxidados y otros metabolitos resultantes del ciclo de la visión así como fragmentos de los segmentos externos de los fotorreceptores.

Adhesión y diferenciación

Otra de las funciones de la BM es proporcionar soporte para facilitar la adhesión celular del RPE. En la membrana basal del RPE se expresan integrinas que interaccionan con

componentes de la matriz extracelular como laminina, fibronectina y colágeno IV para asegurar la adhesión del RPE a la BM. La especificidad de las integrinas por estos componentes viene determinada por las diferentes combinaciones de las subunidades α y β . Además de participar en la adhesión también están implicadas en el inicio de la señalización celular de procesos como la supervivencia y la diferenciación del RPE^{279,280}.

Barrera para la migración celular

Las células del RPE que forman la BHR externa actúan como una barrera semipermeable previniendo el paso de moléculas mayores de 300 kDa. La BM aporta un soporte físico a estas células para favorecer la correcta función de barrera. En el caso de la BHR interna, la membrana basal de los capilares de la retina evita la infiltración de los leucocitos y del componente inflamatorio²⁸¹.

4.4. MATRIZ EXTRACELULAR Y RETINOPATIA DIABÉTICA

En pacientes diabéticos se observa un engrosamiento de la BM debido a un aumento en la síntesis de los componentes de la matriz extracelular estimulada por la hiperglicemia. Estas alteraciones biosintéticas ocurren en las primeras etapas de la diabetes y son detectables antes de que se observen otras lesiones morfológicas propias de la DR . A parte del incremento de la síntesis de componentes de la matriz extracelular, la hiperglicemia afecta otros mecanismos que en conjunto favorecen el engrosamiento de la membrana basal (Fig 23).

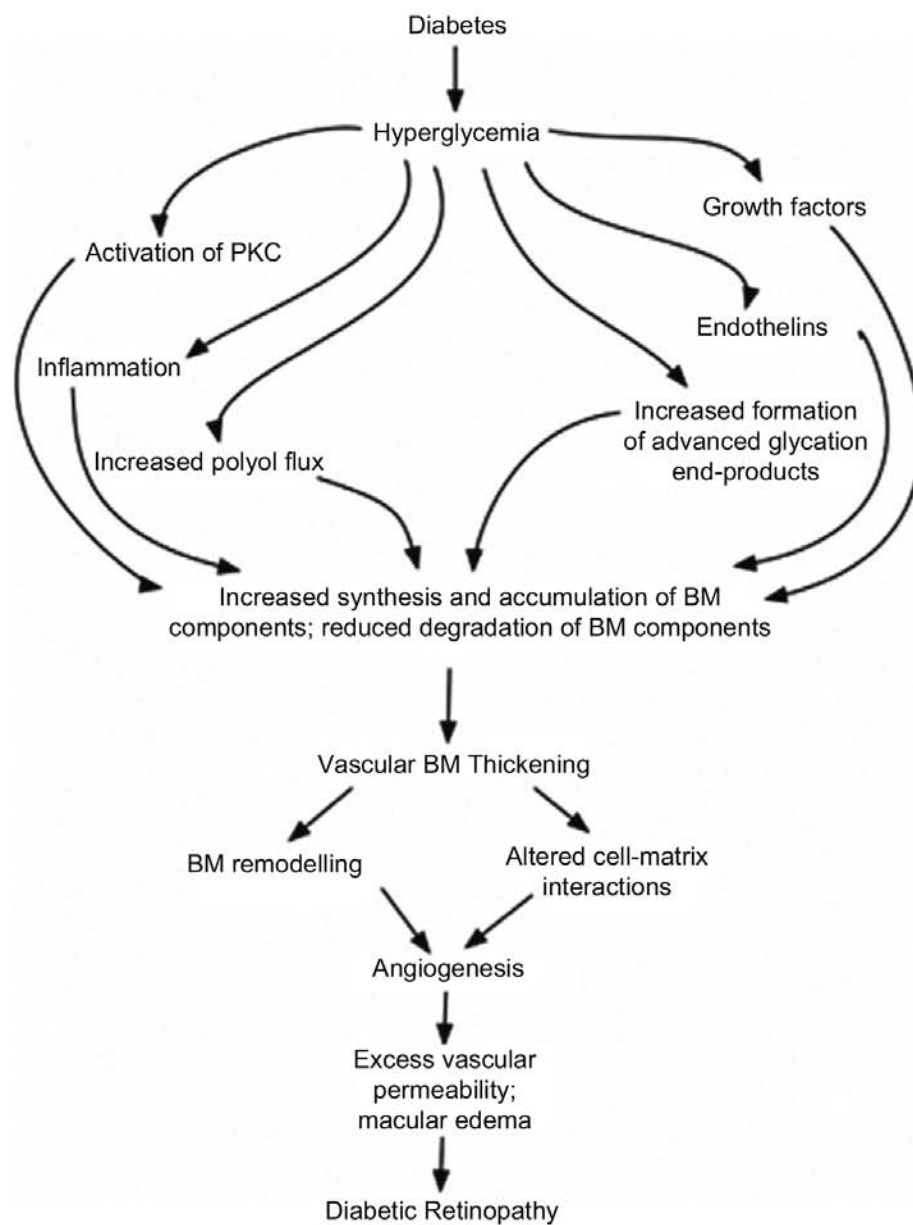


Figura 23. Efecto de la hiperglicemia sobre el engrosamiento de la membrana basal y su influencia en el desarrollo de la retinopatía diabética. Extraído de Roy *et al*²⁷⁸.

La principal causa del engrosamiento de la BM es la ruptura del balance que existe en condiciones normales entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz extracelular. Hay que mencionar que la actividad de las MMP y de la uroquinasa, encargadas

de la degradación de la matriz extracelular, están elevadas en pacientes con DR como mecanismo compensatorio. Mientras que la síntesis de colágeno IV y de fibronectina aumenta en condiciones de hiperglicemia, la tasa de degradación por parte de las MMP es insuficiente, produciéndose una acumulación de estas proteínas y un engrosamiento de la BM²⁴⁸.

Otro de los factores que contribuye al engrosamiento de la BM es la activación de la PKC. Existen estudios donde se ha demostrado un aumento en la síntesis de colágeno IV, fibronectina y laminina en respuesta a la activación de la PKC²⁸². La acumulación de AGEs también estimula la producción de estos componentes de la matriz extracelular y disminuye su degradación, alterando el balance entre los dos procesos y favoreciendo el engrosamiento de la BM^{283,284}. Factores de crecimiento como el TGF- β y el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) se sintetizan en la retina estimulados por las elevadas concentraciones de VEGF existentes en condiciones de hiperglicemia. Estos factores de crecimiento son potentes activadores de la expresión de colágeno IV, fibronectina y laminina^{285,286}. Las endotelinas también estimulan la síntesis de los componentes de la BM, en concreto la isoforma endotelina-1. En estudios en ratas diabéticas el tratamiento con inhibidores de los receptores de endotelina, como el Bosentan, redujo la sobreexpresión de colágeno IV y fibronectina provocada por la hiperglicemia y previno el engrosamiento de la BM de los capilares de la retina²⁸⁷. Por último, la inflamación así como el aumento de flujo de la vía de los polioles también se han asociado a un engrosamiento de la BM^{288,289}.

5. EFECTO DEL FENOFIBRATO EN LA RETINOPATÍA DIABÉTICA

El uso de los fibratos empezó en 1962 con la descripción del clofibrato por Thorp y Waring²⁹⁰. Posteriormente se desarrollaron otros fármacos como el gemfibrozilo, fenofibrato, bezafibrato y ciprofibrato. Todos ellos son derivados del ácido fíbrico y se usan en clínica para el tratamiento de las dislipemias.

5.1. FARMACOCINÉTICA

El fenofibrato, es un fibrato de tercera generación que fue introducido en la práctica clínica en 1975. Actualmente es uno de los fibratos más prescritos a nivel mundial para el tratamiento de la dislipemia, en especial de la hipertrigliceridemia. Químicamente se conoce como 1-metiletil éster del ácido 2-[4-(4-clorobenzoil)fenoxi]-2-metilpropanoico (Fig 24).

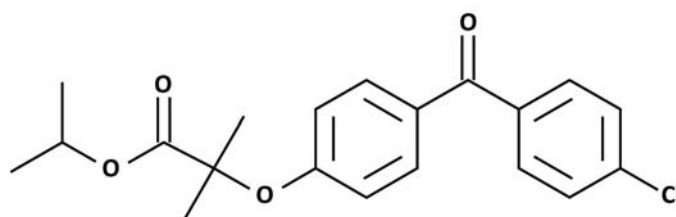


Figura 24. Estructura química del fenofibrato. Las líneas indican enlaces de carbono. O: Oxígeno; Cl: Cloro. Extraído de Noonan *et al*²⁹¹.

El fenofibrato se administra de forma oral como un profármaco que posteriormente es hidrolizado por las esterasas en el intestino y en el hígado para convertirse en su metabolito activo, el ácido fenofíbrico. Después de la administración oral de una dosis de 200 mg/día de fenofibrato micronizado y tras una rápida absorción, se alcanza una concentración

plasmática media de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido fenofíbrico. La concentración máxima en plasma (C_{max}) se observa a las 5 horas después de su administración. Aproximadamente el 99% del ácido fenofíbrico se encuentra unido a proteínas plasmáticas, concretamente a la albúmina. En pacientes con una función renal normal no se ha observado acumulación del fármaco tras un tratamiento continuado. Tiene una vida media de aproximadamente 20 horas, permitiendo así la administración de una sola dosis diaria. Tras ser metabolizado por el citocromo hepático P450 (CYP3A4) se excreta principalmente por la orina conjugado con ácido glucorónico (60%) y por las heces (25%)²⁹².

5.2. FARMACODINÁMICA

5.2.1. PPARs

El fenofibrato es un agonista de una superfamilia de receptores nucleares, los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPARs), en concreto de la isoforma α . Esta superfamilia está formada por tres miembros (PPAR- α , PPAR- γ , PPAR- β/δ) codificados por diferentes genes y con un patrón de distribución variable según el tejido. En el núcleo actúan como factores de transcripción modulando la expresión de genes implicados en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos, adipogénesis, inflamación y estrés oxidativo. Los PPARs también regulan su propia expresión mediante retroalimentación positiva o interaccionando con otros factores de transcripción. Pueden ser activados por ligandos endógenos como los ácidos grasos o sus derivados (prostaglandinas y leucotrienos) o por agonistas sintéticos como el fenofibrato, en el caso del PPAR- α , o las tiazolidinedionas, en el caso del PPAR- γ ^{293,294}. Los PPAR- α presentan una expresión elevada en tejidos que tienen una alta tasa de β -oxidación mitocondrial o peroxisomal de ácidos grasos, como el hígado, el corazón, el riñón, el músculo esquelético, el tejido adiposo marrón y la retina. Los PPAR- α también están presentes en monocitos, macrófagos y células endoteliales. Los PPAR- β/δ tienen una expresión ubicua en casi todos los tejidos y participan en la proliferación, angiogénesis e inflamación. Finalmente los PPAR- γ juegan un papel

importante en el metabolismo de la glucosa y sensibilidad a la insulina, regulan el metabolismo de lípidos aumentando su absorción y almacenamiento y participan en la diferenciación y funcionalidad de adipocitos²⁹⁵.

El ácido fenofibrico producido por la acción de las esterasas se une al PPAR- α del citoplasma y lo activa provocando su migración hacia el núcleo de la célula. Una vez allí, el PPAR- α activado heterodimeriza con el receptor nuclear X retinoide (RXR) que a su vez se encuentra unido a su ligando, el ácido 9-*cis*-retinoico. Estos dímeros se unen a secuencias específicas de ADN llamadas elementos de respuesta a PPARs (PPREs) para activar o inhibir la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico²⁹¹ (Fig 25).

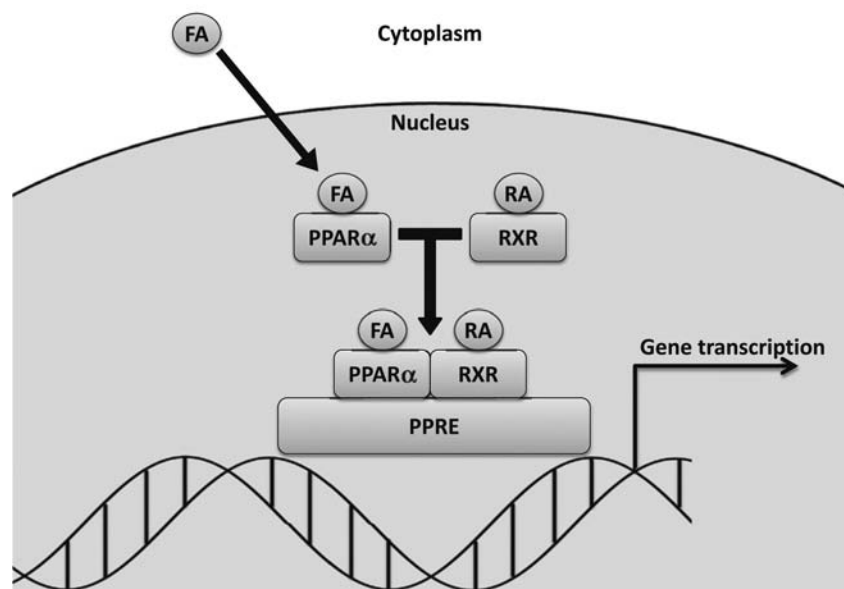


Figura 25. Mecanismo de acción del ácido fenofibrico en la célula. FA: Ácido fenofibrico; RA: ácido 9-*cis*-retinoico; PPAR α : receptor activador de la proliferación de peroxisomas; RXR: receptor X retinoide; PPRE: elemento de respuesta a PPARs. Extraído de Noonan *et al*²⁹¹.

5.2.2. Mecanismos de acción

Mecanismos lipídicos

El fenofibrato está indicado en el tratamiento de la hipertrigliceridemia y la dislipemia mixta. Los efectos que ejercen los derivados del ácido fíbrico sobre el perfil lipídico a través de los PPAR- α se caracterizan por una reducción importante de los niveles de triglicéridos en plasma (20-50%) y un aumento de la concentración de colesterol HDL (10-50%). También producen una disminución moderada de las concentraciones de colesterol total, colesterol unido a proteínas de baja densidad (LDL) (5-20%) y de colesterol VLDL.

La activación de los PPARs provoca un aumento de la lipólisis gracias al aumento en la expresión de la lipoproteína lipasa (LPL) y a una reducción del inhibidor de la lipoproteína lipasa apoC3. Además de disminuir la expresión de apoB, el tratamiento con fenofibrato también estimula la síntesis de la apoA1 y apoA2, principales proteínas de las HDL²⁹⁶.

A pesar de la importancia del fenofibrato reduciendo los niveles de lípidos circulantes, parece que estas acciones no están relacionadas con sus efectos beneficiosos sobre la DR observados en los estudios clínicos. Es importante destacar que en la retina de pacientes diabéticos se ha observado una sobreexpresión de la apoA1^{297,298}. La apoA1 es un factor clave para el transporte intrarretiniano de lípidos, evitando así su deposición y por consiguiente la lipotoxicidad. También elimina los ROS y protege a la retina del estrés oxidativo. Por estos motivos el alto contenido en apoA1 que presentan los pacientes diabéticos se considera un mecanismo protector contra la deposición de lípidos (exudados duros) y contra el estrés oxidativo^{298,299}.

Mecanismos no lipídicos

Además de su efecto hipolipemiante el fenofibrato, o su metabolito activo el ácido fenofíbrico, participa en otros mecanismos moleculares no lipídicos a través de los cuales podría ejercer sus efectos beneficiosos sobre la DR.

Efecto neuroprotector: Como se ha mencionado anteriormente, la neurodegeneración juega un papel importante en la patogénesis de la DR. Ocurre en etapas muy iniciales de la RD, incluso antes de que ésta sea detectable. En modelos experimentales de isquemia cerebral y de neurodegeneración se ha demostrado que la activación de los PPAR- α produce un efecto neuroprotector independiente de los cambios en la concentración de lípidos del suero. Sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antiapoptóticas se han relacionado con este efecto³⁰⁰. En ratones diabéticos db/db, se ha observado como el tratamiento con ácido fenofibrico produce un efecto protector sobre la neurodegeneración retiniana. Los ratones db/db se consideran un buen modelo animal de diabetes tipo 2 para el estudio de la neurodegeneración porque desarrollan unas alteraciones similares a las observadas en pacientes diabéticos en las primeras etapas de la DR³⁰¹. El tratamiento de estos ratones con ácido fenofibrico a corto plazo (1 semana) reduce la activación glial y la apoptosis en la GCL, produce una mejora en los electroretinogramas y previene la disminución de la expresión del transportador de glutamato/aspartato (GLAST). Este transportador facilita la eliminación del glutamato por parte de las células de Müller, evitando la acumulación en el espacio extracelular. Debido a la importancia de la excitotoxicidad en el proceso de neurodegeneración inducida por la acumulación de glutamato, es posible que los efectos del ácido fenofibrico sobre la expresión de GLAST estén relacionados con su acción neuroprotectora³⁰². En otros trabajos se ha demostrado que el tratamiento con fenofibrato provoca una disminución de la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína (Lp-PLA2) que, igual que ocurre con el glutamato, produce muerte celular en el cerebro y podría causar efectos similares en la retina. En este último caso se necesitan más estudios para confirmar si la capacidad reductora del fenofibrato sobre los niveles de Lp-PLA2 puede estar implicada en sus efectos neuroprotectores en la retina³⁰³.

Mejora de la función endotelial y de la actividad antiapoptótica: El ácido fenofibrico ejerce un efecto protector sobre la microvasculatura, suprimiendo la apoptosis y estimulando la fosforilación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y por consiguiente la producción de óxido nítrico (NO). Estos efectos protectores no son dependientes de la activación de los PPAR- α , sino que son mediados por la AMPK tal y como se ha demostrado en diferentes modelos celulares, incluyendo las células endoteliales de la retina humana³⁰⁴.

³⁰⁷. Además, en células de RPE se ha observado que el ácido fenofíbrico ejerce un efecto dual, inhibiendo las vías de señalización activadas por el estrés celular y activando las vías de supervivencia y autofagia³⁰⁸.

Actividad antioxidante y antiinflamatoria: El fenofibrato, a través de la activación de los PPAR- α , estimula la expresión y la activación de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa³⁰⁰. Esta activación de los PPAR- α también induce la apoptosis de los macrófagos derivados de monocitos e inhibe la expresión de las moléculas de adhesión endoteliales, dos efectos importantes en la prevención de la leucostasis^{309,310}. Además, el fenofibrato reduce la inflamación sistémica y aumenta los niveles plasmáticos de adiponectina, la cual ejerce un efecto protector sobre los vasos sanguíneos de la retina modulando la vía de del TNF- α ^{311,312}. El efecto antiinflamatorio del fenofibrato se lleva a cabo mediante la inhibición de la actividad de NF- κ B³¹³ y evita el aumento en la expresión de IL-6 y la ciclooxigenasa 2 (COX-2) inducido por la IL-1^{314,315}. Otros estudios han demostrado como el fenofibrato es capaz de inhibir la vía de señalización celular de Wnt evitando la fosforilación del coreceptor LRP6 y la acumulación de β -catenina. En la DR la hiperglicemia y el estrés oxidativo activan la vía de Wnt, provocando un aumento en la generación de ROS y estimulando la transcripción de genes proangiogénicos. Los efectos beneficiosos del fenofibrato sobre la inhibición de la vía de Wnt son debidos a un mecanismo dependiente de los PPAR- α ^{291,316}. Todos estos experimentos demuestran como el tratamiento con fenofibrato es capaz de mejorar el estrés oxidativo y la inflamación, que son factores muy importantes en el desarrollo de la DR.

Actividad antiangiogénica: En células endoteliales humanas de cordón umbilical, se ha observado que la activación de los PPAR- α provoca una inhibición de la expresión del receptor 2 del VEGF y de la neovascularización³¹⁷. Existen otros estudios como el de Varet *et al.* en los que se demuestra como el tratamiento con fenofibrato inhibe la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*³¹⁸. En otros experimentos con modelos murinos de DM tipo 1, tras la administración oral e intravítrea de fenofibrato se observa una mejora de la leucostasis y de la permeabilidad vascular, así como una reducción de la sobreexpresión de moléculas de adhesión y de VEGF³¹⁹. Estos efectos beneficiosos del fenofibrato pueden bloquearse con el

uso de antagonistas de los PPAR- α , hecho que nos sugiere que este fármaco actúa en estos casos a través de un mecanismo dependiente de los PPAR- α .

5.3. ESTUDIOS CLÍNICOS

5.3.1. Estudio FIELD

El estudio FIELD (*Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes*) fue un estudio clínico específicamente diseñado para evaluar el efecto del fenofibrato sobre los accidentes cardiovasculares en pacientes con DM tipo 2. Se llevó a cabo en 63 centros de Australia, Nueva Zelanda y Finlandia y se reclutaron 9795 pacientes diabéticos tipo 2 con edades comprendidas entre 50 y 75 años y sin tratamiento con estatinas de base. La mitad de los pacientes (n=4895) recibieron de manera randomizada tratamiento con fenofibrato micronizado (200 mg/día) y el resto de pacientes (n=4900) recibió placebo. El estudio clínico duró 5 años y los pacientes fueron visitados a intervalos de 4-6 meses. Una vez finalizado, no se observó un efecto significativo del fenofibrato sobre el objetivo primario del estudio, la reducción de la muerte por enfermedad cardiovascular e infarto de miocardio (11% de reducción vs. placebo; $p=0.16$). Sin embargo el tratamiento con fenofibrato sí redujo significativamente la incidencia general de accidentes cardiovasculares (disminución del 13,9% al 12,5% placebo vs. fenofibrato; $p=0.035$). El 8% del total de pacientes del estudio FIELD presentaba DR (retinopatía proliferativa o DME) al inicio del estudio y la evaluación del efecto del tratamiento con fenofibrato sobre la progresión de la DR y la necesidad de tratamiento con fotocoagulación con láser se incluyeron como un objetivo terciario. En el grupo de pacientes tratados con fenofibrato se observó una reducción significativa del 30% en la necesidad de tratamiento con láser (5.2% vs. 3.6%; $p=0.0003$) en casos de DR. En pacientes con DME esta reducción fue del 31% (3.4% vs. 2.4%; $p=0.002$) y en pacientes con PDR la reducción fue del 30% (2.2% vs. 1.5%; $p=0.015$). No se observaron diferencias significativas en la concentración de lípidos entre los pacientes que requirieron láser y los que no lo necesitaron, hecho que sugiere que los efectos beneficiosos del fenofibrato, ya

evidentes a los 8 meses desde el inicio del tratamiento, son independientes de su acción hipolipemiante. Sólo se observaron diferencias significativas en la reducción de la necesidad de tratamiento con láser en pacientes sin DR al inicio del estudio^{320,321}.

El estudio FIELD incorporó un subestudio oftalmológico en el cual se tomaron fotografías de fondo de ojo de manera sistemática. En el subestudio se incluyeron 1012 pacientes sin evidencia de retinopatía clínicamente significativa (proliferativa o no proliferativa severa), DME o historia de tratamiento con láser al inicio del estudio. A diferencia del estudio principal, en el subestudio oftalmoscópico el tratamiento con fenofibrato sí redujo de manera significativa la progresión de la DR en el subgrupo de pacientes con DR preexistente (14.6% vs. 3.1%; $p=0.0004$) pero no en aquellos sin DR. Además el fenofibrato redujo la progresión de la DR equivalente a dos niveles en la clasificación ETDRS, el desarrollo de DME clínicamente significativo y la reducción de la necesidad de tratamiento con láser en un 34% ($p=0.022$) (Fig 26)³¹.

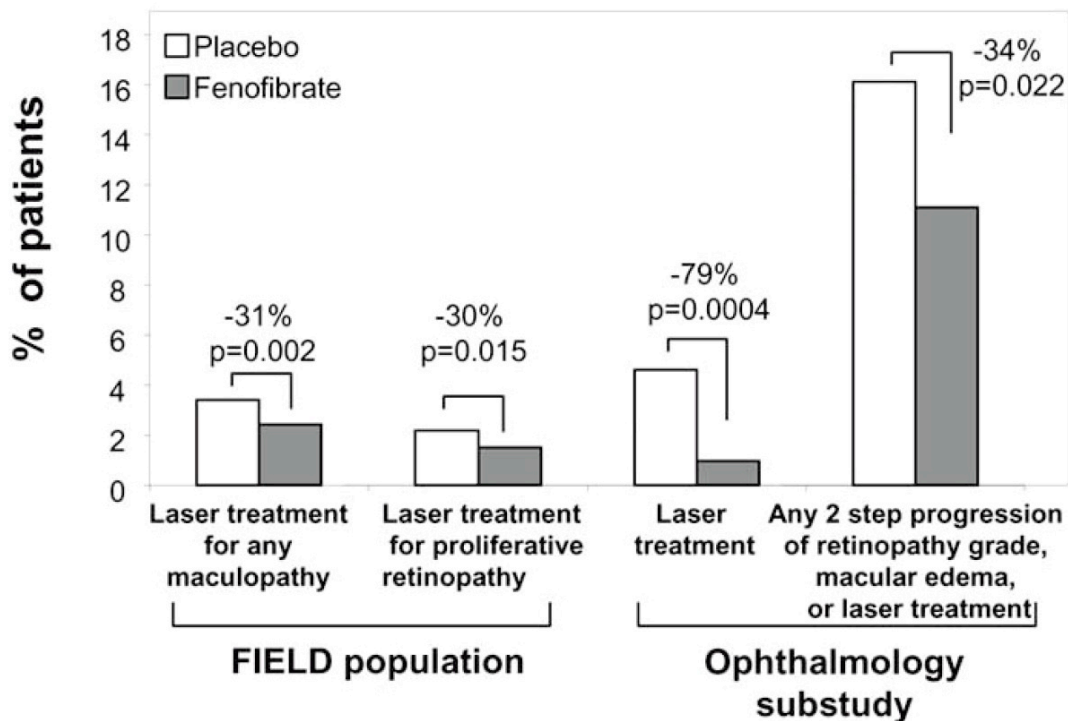


Figura 26. Porcentaje de pacientes que necesitaron tratamiento con láser en el estudio FIELD y en el subestudio oftalmoscópico. Extraído de Ansquer *et al*³²².

Existen una serie de puntos débiles en el estudio FIELD que hay que tener en cuenta para interpretar sus resultados. Primeramente, en el estudio principal la DR se valoró por datos de la historia clínica y no se realizaron retinografías de forma sistemática. Esto es importante ya que el mayor determinante de la progresión de la DR es la propia situación basal de ésta. En segundo lugar, los criterios que debían seguir los centros participantes respecto a la indicación de la fotocoagulación no se definieron al inicio del estudio y, en consecuencia, fueron heterogéneos. En tercer lugar, el número de eventos en el subestudio oftalmológico fue muy pequeño. Únicamente 28 pacientes requirieron tratamiento con láser, de los cuales 23 recibieron placebo y 5 fenofibrato. En cuarto lugar, existe una discrepancia entre el estudio principal y el estudio oftalmológico: en el primero el fenofibrato sólo fue efectivo en los pacientes sin historia de DR, mientras que en el subestudio oftalmológico lo fue sólo en los pacientes que ya la presentaban. La posible razón es que los pacientes del estudio principal catalogados como “sin retinopatía” en realidad sí la tuvieran, cosa que se habría objetivado si se hubieran realizado retinografías al inicio del estudio³²³.

5.3.2. Estudio ACCORD

El estudio ACCORD (*Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes*) fue un estudio clínico diseñado para evaluar el efecto de diferentes estrategias de control intensivo (glucemia, concentraciones séricas de lípidos y presión sanguínea) sobre los accidentes cardiovasculares en pacientes con DM tipo 2 con riesgo cardiovascular. Este estudio duró 4 años, se llevó a cabo en 77 centros de Estados Unidos y Canadá y se reclutaron 10251 pacientes diabéticos tipo 2. Se les asignó de manera randomizada un control intensivo de la glucemia ($HbA1c < 6.0\%$) o un control estándar ($7.0\% < HbA1c < 7.9\%$). Del total de pacientes, a 5518 que presentaban dislipemia se les asignó aleatoriamente un tratamiento combinado de fenofibrato en cápsulas (160 mg/día) más simvastatina o placebo más simvastatina. Esta dosis de fenofibrato administrada junto a una estatina (simvastatina) es bioequivalente a los 200 mg de fenofibrato micronizado administrado en el estudio FIELD³²⁴. Los 4733 pacientes restantes fueron sometidos de manera randomizada a un control intensivo de la presión sanguínea

(presión sistólica < 120 mm Hg) o un control estándar (presión sistólica < 140 mm Hg). Respecto al objetivo primario del estudio, el tratamiento con fenofibrato y simvastatina no redujo significativamente la tasa de accidentes cardiovasculares en comparación con la administración de simvastatina sola^{32,325}.

El estudio ACCORD incorporó un subestudio oftalmológico (ACCORD-Eye) con el objetivo de determinar si alguna de las tres intervenciones evaluadas en el estudio ACCORD (control glicémico intensivo, combinación de fenofibrato más estatina y control intensivo de la presión sanguínea) producía una reducción del riesgo de aparición o progresión de DR, en comparación con los tratamientos estándares. En este estudio la progresión de la DR se definió como tres o más niveles en la clasificación ETDRS o PDR con necesidad de tratamiento con láser o vitrectomía. 1593 pacientes con DM tipo 2 de un total de 2856 incluidos en el subestudio ACCORD-Eye fueron tratados con fenofibrato (n=806) o con placebo (n=787). A diferencia del estudio FIELD, la duración de la diabetes en los pacientes del estudio ACCORD fue mayor (10.0 años vs. 5.1 años) y presentaban una prevalencia más elevada de DR preexistente (50% vs. 8%) al inicio del estudio. Sin embargo, los resultados generales del estudio ACCORD-Eye fueron consistentes con los obtenidos en el estudio FIELD, observándose un 40% de reducción en la progresión de la retinopatía tras el tratamiento con fenofibrato (10.2% vs. 6.5%; p=0.006) y un mayor beneficio en pacientes con evidencia de DR al inicio del estudio. Respecto al resto de intervenciones se observó una reducción de la progresión de la DR con el control glicémico intensivo (7.3% vs. 10.4%; p=0.003) y también con el control intensivo de la presión sanguínea (10.4% vs. 8.8%; p=0.29). De las tres estrategias evaluadas, sólo el control intensivo de la glicemia y el tratamiento combinado de la dislipemia redujeron de una manera significativa la progresión de la DR^{32,326}.

En resumen, los resultados del estudio FIELD y del estudio ACCORD-Eye nos demuestran que los efectos beneficiosos del fenofibrato en la progresión de la DR y del DME van más allá de su acción hipolipemiante. Probablemente sus propiedades antiapoptóticas, antiinflamatorias y antioxidantes mejoran la vasculatura, atenuando la progresión de la DR y la necesidad de tratamiento con láser pero se necesitan más estudios para determinar los mecanismos exactos a través de los cuales actúa el fenofibrato sobre la DR.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La etiopatogenia del DME ha sido menos estudiada que la de la DR pero se sabe que para su desarrollo es necesario que se produzca una disrupción de la BHR. Como se ha explicado anteriormente existen dos barreras hematorretinianas: la BHR interna, formada por las uniones celulares estrechas o TJ de las células endoteliales de los vasos sanguíneos de la retina y la BHR externa, formada por el RPE que también presenta uniones celulares de tipo TJ. La alteración de cualquiera de estos dos sistemas debido a la disrupción de las TJ provoca un aumento de permeabilidad y la extravasación del contenido intravascular, iniciándose diferentes procesos que conducen al desarrollo del DME.

El estudio de los factores que modulan la permeabilidad de la BHR es fundamental, no sólo para el mejor conocimiento de la etiopatogenia del DME, sino para establecer las bases que permitan el diseño de nuevas estrategias terapéuticas. Mientras que la alteración de las proteínas implicadas en la disrupción de las TJ de la BHR interna ha sido ampliamente estudiada, existe poca información sobre este proceso en el RPE que forma la BHR externa. Por este motivo el primer objetivo de esta tesis doctoral ha sido evaluar el efecto del medio diabético sobre la permeabilidad celular y la expresión de moléculas de TJ que determinan el funcionamiento de la BHR externa (occludina, zonula occludens-1 y claudina-1) en cultivos de células de RPE.

Como segundo objetivo se ha estudiado el efecto del fenofibrato en cultivos de RPE, un fármaco que ha resultado eficaz para reducir la progresión del DME en ensayos clínicos. Según los resultados observados en el estudio FIELD, el tratamiento con fenofibrato redujo en un 30% la necesidad de tratamiento con láser en pacientes diabéticos de tipo 2 con DME y DR. En el estudio ACCORD-Eye se demostró una reducción del 40% en la progresión de la DR. Los efectos beneficiosos del fenofibrato sobre la progresión de la DR observados en estos ensayos clínicos no están relacionados con su efecto hipolipemiente, pero no se conocen los mecanismos específicos a través de los cuales actúa en la retina. Por este motivo, además de evaluar el efecto protector del tratamiento con fenofibrato, se han estudiado diferentes vías de señalización para determinar el mecanismo de acción de este fármaco en la BHR externa.

En base a lo explicado anteriormente, los objetivos del presente estudio han sido:

Capítulo I: *Efecto de la hiperglicemia sobre la funcionalidad de la barrera hematorretiniana externa y la expresión de las proteínas de tight junction en células de epitelio pigmentario de la retina humana (ARPE-19).*

1. Estudio del efecto de dos concentraciones de glucosa, 5.5 mM (normoglicemia) y 25 mM (hiperglicemia) sobre la permeabilidad y la resistencia transepitelial (TER) de una monocapa de células ARPE-19.
2. Estudio del efecto de dos concentraciones de glucosa, 5.5 mM (normoglicemia) y 25 mM (hiperglicemia) sobre la expresión de las tres principales proteínas de *tight junction* en el RPE: ocludina, ZO-1 y claudina-1.

Capítulo II: *Efecto protector del ácido fenofibrico sobre la disrupción del epitelio pigmentario de la retina inducida por la IL-1 β a través de la supresión de la activación de la vía de la AMPK.*

1. Determinación de las condiciones de cultivo de las células ARPE-19 que mejor simulan la alteración de la barrera hematorretiniana externa observada en pacientes diabéticos.
2. Evaluación del efecto protector de dos concentraciones de ácido fenofibrico, el metabolito activo del fenofibrato, sobre el aumento de permeabilidad inducido por la IL-1 β y la expresión de las proteínas de *tight junction* (occludina, ZO-1 y claudina-1).
3. Estudio de la implicación de la vía de la AMPK en la hiperpermeabilidad provocada el medio diabético y como posible mecanismo de acción a través del cual el ácido fenofibrico ejerce su efecto protector en el RPE.

RESULTADOS

CAPÍTULO I

Efecto de la hiperglicemia sobre la funcionalidad de la barrera hematorretiniana externa y la expresión de las proteínas de tight junction en células de epitelio pigmentario de la retina humana (ARPE-19).

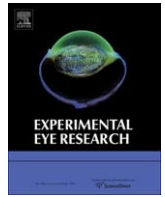
No existen estudios sobre el efecto directo de la concentración de glucosa en el RPE. Por este motivo el objetivo de nuestro trabajo fue estudiar el efecto de la elevada concentración de glucosa sobre la permeabilidad y la expresión de las proteínas de TJ (occludina, ZO-1 y claudina-1) en una línea celular humana de RPE (ARPE-19).

Las células ARPE-19 se mantuvieron en cultivo durante 3 semanas a 5.5 mM de D-Glucosa, simulando condiciones fisiológicas de normoglicemia, y a 25 mM de D-Glucosa, simulando la hiperglicemia existente en pacientes diabéticos. Para evaluar la funcionalidad de la monocapa realizamos medidas de la resistencia transepitelial (TER) en células cultivadas sobre transwells así como ensayos de permeabilidad con dextrano marcado de varios pesos moleculares. Las células crecidas en condiciones de hiperglicemia (25 mM D-Glucosa) presentaron valores de TER significativamente más elevados que las cultivadas en condiciones de normoglicemia (5.5 mM D-Glucosa). Las medidas de permeabilidad de los cultivos mantenidos a 25 mM de D-Glucosa fueron significativamente menores en comparación con los cultivos mantenidos a 5.5 mM de D-Glucosa, tanto para dextrano de 40 kDa como de 70 kDa.

La expresión de las proteínas de TJ se evaluó por PCR a tiempo real y por Western Blot. No se observaron diferencias significativas en los niveles de mRNA y de proteína de occludina y de ZO-1 entre los cultivos mantenidos a 5.5 y a 25 mM de D-Glucosa. Sin embargo, en el caso de la claudina-1 se observaron niveles significativamente mayores de mRNA y de proteína en las células cultivadas en condiciones de hiperglicemia. Para determinar si este aumento de claudina-1 estaba relacionado con una mejora de la permeabilidad y de la funcionalidad del RPE transfectamos las células con siRNA para bloquear la expresión claudina-1. No observamos diferencias significativas en las medidas de TER ni en los ensayos de permeabilidad en condiciones de hiperglicemia en las células transfectadas. Mediante inmunohistoquímica, confirmamos que las células crecían formando una monocapa y que estaban correctamente polarizadas. Para ello utilizamos anticuerpos para detectar las tres proteínas de TJ (occludina, ZO-1 y claudina-1) y para la Na⁺/K⁺-ATPasa que es un marcador de polarización que presenta una localización apical en el RPE. Los resultados de la inmunohistoquímica corroboraron que a 25 mM de D-Glucosa se produce un aumento de

expresión de claudina-1 en comparación con las células mantenidas a 5.5 mM de D-Glucosa. En las células ARPE-19 en las que se había silenciado la expresión de claudina-1 mediante siRNA no observamos diferencias significativas en la disposición de las otras proteínas de TJ, ZO-1 y ocludina, manteniéndose la integridad y la funcionalidad de la monocapa celular.

De los experimentos realizados podemos concluir que la hiperglicemia produce una disminución de la permeabilidad en las células ARPE-19 y un aumento de los niveles de claudina-1. Sin embargo, la sobreexpresión de claudina-1 inducida por la hiperglicemia no está relacionada con los mecanismos a través de los cuales la glucosa aumenta la función oclusiva de las TJ.



Effects of high glucose concentration on the barrier function and the expression of tight junction proteins in human retinal pigment epithelial cells

Marta Villarroya^a, Marta García-Ramírez^{a,b}, Lidia Corraliza^{a,b}, Cristina Hernández^{a,b}, Rafael Simó^{a,b,*}

^a Diabetes and Metabolism Research Unit, Institut de Recerca Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain
^b CIBER for Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM), Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 February 2009
 Accepted in revised form 29 July 2009
 Available online 4 August 2009

Keywords:

blood–retinal barrier
 cell culture
 retinal pigment epithelium
 tight junction

ABSTRACT

There is no information on the direct effect of high glucose concentrations on the barrier function of retinal pigment epithelium (RPE). The aim of this study was to explore the effect of high glucose concentrations on the permeability and the expression of tight junction proteins (occludin, zonula occludens-1 (ZO-1) and claudin-1) in a human RPE line (ARPE-19). For this purpose, ARPE-19 cells were cultured for 3 weeks in a medium containing 5.5 mM D-glucose (mimicking physiological conditions) and 25 mM D-glucose (mimicking hyperglycemia that occurs in diabetic patients). The permeability was evaluated by measuring transepithelial electrical resistance (TER) and apical–basolateral movements of dextran. The expression of tight junction proteins was evaluated by real-time PCR (RT-PCR) and Western blot. Cells grown at 25 mM of D-glucose showed a significant higher TER and a significant lower dextran diffusion than the ones maintained at 5.5 mM of D-glucose. Occludin and ZO-1 mRNA levels and protein content were similar in cultures maintained in 5.5 mM and 25 mM D-glucose. By contrast, high glucose concentrations induced a significant overexpression of claudin-1 (mRNA: 1.03 ± 0.48 vs 2.29 ± 0.7 RQ; $p = 0.039$, at 21 days. Protein levels: 0.92 ± 0.12 vs 1.14 ± 0.28 arbitrary units; $p = 0.03$, at 21 days). However, after blocking claudin-1 expression using siRNA no changes in TER and permeability were observed. We conclude that high glucose concentration results in a reduction of permeability in ARPE-19 cells. In addition, our results suggest that the overexpression of claudin-1 induced by high glucose concentrations is not involved in the mechanisms by which glucose increases the tight junction sealing function. Further studies addressed to unravel the complexity of permeability regulation in RPE are needed.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The retinal pigment epithelium (RPE) is a highly specialized epithelium that serves as a multifunctional and indispensable component of the vertebrate eye (Strauss, 2005). RPE forms the outer blood retinal barrier (BRB), thus controlling the flow of solutes and fluid from the choroidal vasculature into the outer retina (Erickson et al., 2007; Strauss, 2005). The inner BRB is constituted by the blood vessels of the retina and directly controls the flux into the inner retina (Erickson et al., 2007; Strauss, 2005). The strict control of fluid and solutes that cross the BRB is achieved through well-developed tight junctions. Over 40 proteins have been found to be associated with tight junctions (Gonzalez-Mariscal et al., 2003).

Zonula occludens-1 (ZO-1), claudins and occludin are the most studied of these proteins, especially regarding how they are related to the BRB.

Diabetic macular edema is one of the primary causes of poor visual acuity in patients with diabetic retinopathy (Congdon et al., 2003; Lightman and Towler, 2003). The breakdown of the BRB due to the disruption of the tight junctions is the main factor accounting for diabetic macular edema (Joussen et al., 2007). While extensive work has been carried out to identify the factors involved in the disruption of the tight junctions of the inner BRB, the mechanisms implicated in the outer BRB regulation have been poorly explored.

Treatment of RPE cells with either serum, interferon- γ , tumor necrosis factor- α , hepatocyte growth factor (HGF), interleukin (IL)-1 β or placental growth factor-1 (PLGF-1) decreased transepithelial electrical resistance (TER), increased permeability and altered the expression or content of tight junction molecules (Abe et al., 2003; Chang et al., 1997; Jin et al., 2002; Miyamoto et al., 2007; Zech et al., 1998). However, to the best of our knowledge the direct effect of high glucose concentrations has never been reported.

* Corresponding author at: Diabetes and Metabolism Research Unit, Institut de Recerca Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934894172; fax: +34 934894015.

E-mail address: rsimo@ir.vhebron.net (R. Simó).

The aim of the study was to explore the effect of 5.5 mM D-glucose and 25 mM D-glucose on the permeability and the expression of tight junction proteins (occludin, ZO-1 and claudin-1) in a human RPE line (ARPE-19).

2. Methods

2.1. Human RPE cell cultures

ARPE-19 was obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The cells used in these experiments were between passages 16 and 19. Initially, the culture was started at a concentration of 80,000 RPE cells/well (800,000 cells/mL) in a medium with 10% FBS and 5.5 mM D-glucose (0.2 mL on the apical side and 0.6 mL on the basolateral side). Seven days after the culture was started, half of the transwells were maintained with D-glucose 5.5 mM and the other half were switched to D-glucose 25 mM. Cells grew in these conditions for 21 days (total time in culture: 28 days). The media were changed every 3–4 days. In order to rule out a potential bias by an osmotic effect the experiment was also performed using mannitol (5.5 mM D-glucose + 19.5 mM mannitol vs 25 mM D-glucose) as an osmotic control agent.

Cultures were grown directly on plastic (polyester filters; HTS-Transwell; Costar, Corning Inc, NY, USA) instead of matrices. This is because RPE cells grown on plastic have the closest gene expression profile to native RPE (Tian et al., 2004), and synthesize a matrix that is similar to its in vivo basement membrane (Campochiaro et al., 1986).

2.2. Measurement of TER

TER was measured using an epithelial voltmeter (MILLICELL-ERS; Millipore, Billerica, MA, USA) with STX100C (for 24-well format) electrode (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) according to the manufacturer's instructions. Net TER measurements were calculated by subtracting the resistance of the filter alone (background) from the values obtained with the filters with RPE cells. Measurements were performed every 3 days on 4 different wells (twice each).

2.3. Permeability assay

The permeability of the RPE cells was determined at 21 days by measuring the apical-to-basolateral movements of fluorescein isothiocyanate (FICT) dextran (40 and 70 kDa) (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA). The test molecule was added to the apical compartment of the cells in a concentration of 100 µg/mL. 200 µL samples were collected from the basolateral side at 3, 30, 60, 90, 120, 195 and 270 min after adding the molecules. A minimum of three cultures were used for each time measurement. The absorbance was measured at 485 nm of excitation and 528 nm of emission with a microplate reader (SpectraMax Gemini; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

2.4. Real-time PCR

RNA was extracted with the Rneasy Mini kit with DNAase digestion. RT-PCR specific primers were used (TaqMan assays): OCLN Hs00170162_m1; TJP1 (ZO-1) Hs00268480_m1; CLN1 Hs00221623_m1. Automatic relative quantification data was obtained with ABI Prism 7000 SDS software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using β -actin as endogenous control gene (ACTB Hs99999903_m1). The measurements were performed at 14 and 21 days. The $\Delta\Delta C_t$ method was applied to estimate relative transcript levels. Levels of β -actin amplification were used for endogenous reference to normalize each sample C_t (threshold cycle) value. D-glucose (5.5 mM) medium at 14 days was used as a calibrator. Units are expressed as relative quantification (RQ).

2.5. Western blot analysis

Protein was extracted and a total of 20 µg protein was resolved by 10% SDS-PAGE (for claudin-1 and occludin) and 7.5% SDS-PAGE (for ZO-1) and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). Incubation with rabbit anti-claudin-1, rabbit anti-occludin and mouse anti-ZO-1, all diluted 1:1000, (Zymed Lab Gibco; Invitrogen, San Diego, CA, USA), was performed at

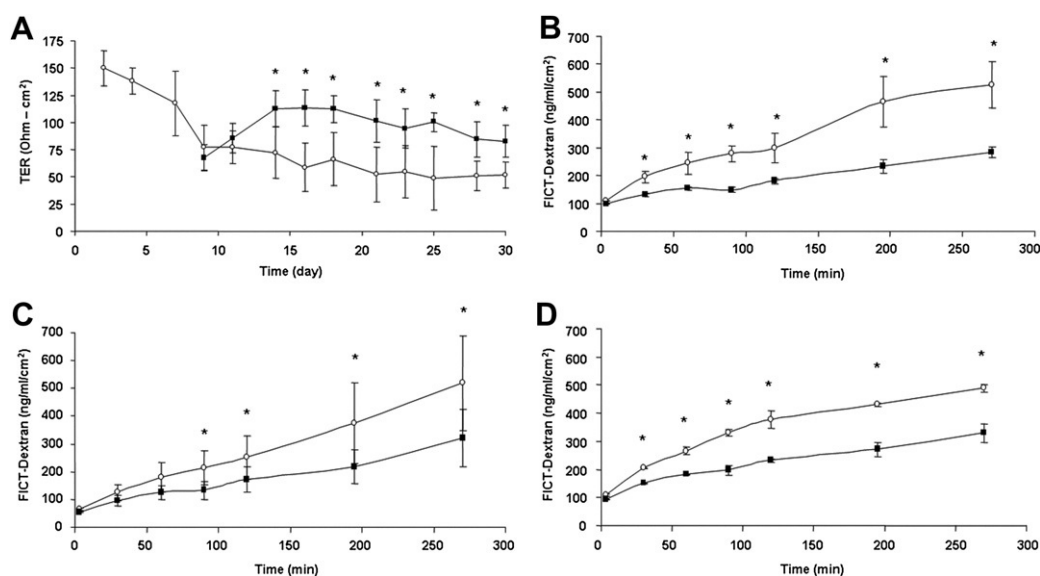


Fig. 1. (A) Results of TER. The vertical axis represents the TER, expressed in $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$, and the horizontal axis the time. (B) Results of 70 kDa dextran permeability. (C) Results of 40 kDa dextran permeability. The vertical axis is the concentration of dextran and the horizontal axis is the time after addition of the molecule. (—■—) 25 mM D-glucose; (—○—) 5.5 mM D-glucose. (D) Results of 40 kDa dextran permeability controlling by osmotic effect with mannitol. (—■—) 25 mM D-Glu; (—○—) 5.5 mM D-Glucose + 19.5 mM Mannitol. Dextran permeability was measured at 3, 30, 60, 90, 120, 195 and 270 min. Results are expressed as the mean \pm SD. * $p < 0.05$.

room temperature (RT) for 1 h. After washing, goat anti-rabbit or mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Pierce; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) was applied and proteins were visualized using the enhanced chemiluminescence detection system (Supersignal CL-HRP Substrate System; Pierce; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). The same blot was stripped and reblotted with a mouse primary antibody specific to β -actin (Calbiochem; Merck, Nottingham, UK) to normalize the protein levels. Densitometric analysis of the autoradiographs was performed with a GS-800 calibrated densitometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and analyzed with Quantity One 4.6.2 software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The measurements were performed at 14 and 21 days. Results are presented as densitometry arbitrary units.

2.6. siRNA experiments

To determine whether claudin-1 protein expression contributes to maintenance of barrier function in the RPE, we used small interfering RNA (siRNA) to inhibit transiently the expression of claudin-1 in the ARPE-19 cells.

A siRNA probe targeted to Claudin-1 was purchased from Dharmacon (Dharmacon, Inc., Lafayette, CO, USA). The target sequences for the human-specific CLDN1 Accell SMARTpool siRNA mixture were as follows: UCAUGAUGUGUGAGUGUAA (A-017369-17), CUUUGAACAUACAUAUGC (A-017369-18), CCGUUGGCAUGAAGU GUAU (A-017369-19), GUGUGAAUUAUUAUAGUU (A-017369-20). A control Accell siRNA pool of cyclophilin B (CYP B) (D-001970-01) was used in the experiments. ARPE-19 were transfected with Accell siRNAs in Accell delivery media (B-005000) according to the manufacturer's instructions. Cell monolayers grown for 3 weeks in euglycemic or hyperglycemic conditions in 24-well transwells were treated with Accell siRNA probes for 72 h (from day 25 to day 28) and then the medium was replaced by standard conditions for an additional 24 h (from day 28 to day 29). TER and permeability measurements were performed as described above.

2.7. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed in cells grown for 21 days at confluence in 24-well plates containing one circle cover slip of glass (12 mm of diameter) (Thermo scientific, Menzel-Gläser; Braunschweig, GE) inside each well. Cells were washed with PBS and fixed with methanol for 10 min, washed again with PBS two times and blocked with PBS BSA 2% 0.05% Tween overnight at 4 °C. Rabbit anti-claudin-1 or occludin, mouse anti-ZO-1 (Zymed Lab Gibco; Invitrogen, San Diego, CA, USA), and mouse anti- Na^+/K^+ ATPase (Millipore, Billerica, MA, USA) all diluted 1/200 were incubated for 1 h at RT. After washing with PBS, cells were further incubated with Alexa 488 goat anti-rabbit and Alexa 594 donkey anti-mouse secondary antibodies (Invitrogen; San Diego, CA, USA) for 1 h at RT. After washing with PBS the slides were mounted with Vectashield mounting medium for fluorescence with DAPI (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA). Images were acquired with a confocal laser scanning microscope (FV1000; Olympus, Hamburg, Germany).

2.8. Cell counting

Nuclei from seven fields of each condition were counted to determine the total number of cells and cells in division per field. Images, equivalent to an area of 0,57 mm², were acquired at 20x with a fluorescence microscope (BX61; Olympus, Hamburg, Germany).

2.9. Cytotoxicity

Lactate dehydrogenase (LDH) was measured as an indicator of cell death by using a cytotoxicity detection kit (Roche; Applied Science, Barcelona, Spain). LDH activity was measured in a 96-well plate with two replicates for each condition at an absorbance of 490 nm. Results are expressed as percentage of cells showing cytotoxicity \pm SD. Percent cytotoxicity = (Exp Value – Low Control)/(High Control – Low control) \times 100.

2.10. ATP measurements

ARPE-19 cells were plated in 96-well white plates (Costar, Corning Inc, NY, USA). ATP concentration in cultures maintained in 5.5 mM of D-Glucose and 25 mM of D-Glucose was detected using the ApoSENSOR™ Cell Viability Assay Kit (MBL International, Woburn, MA, USA) based on the luciferin-luciferase reaction. Luminescence was measured with a microplate reader (SpectraMax Gemini; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Results are expressed as [ATP] in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

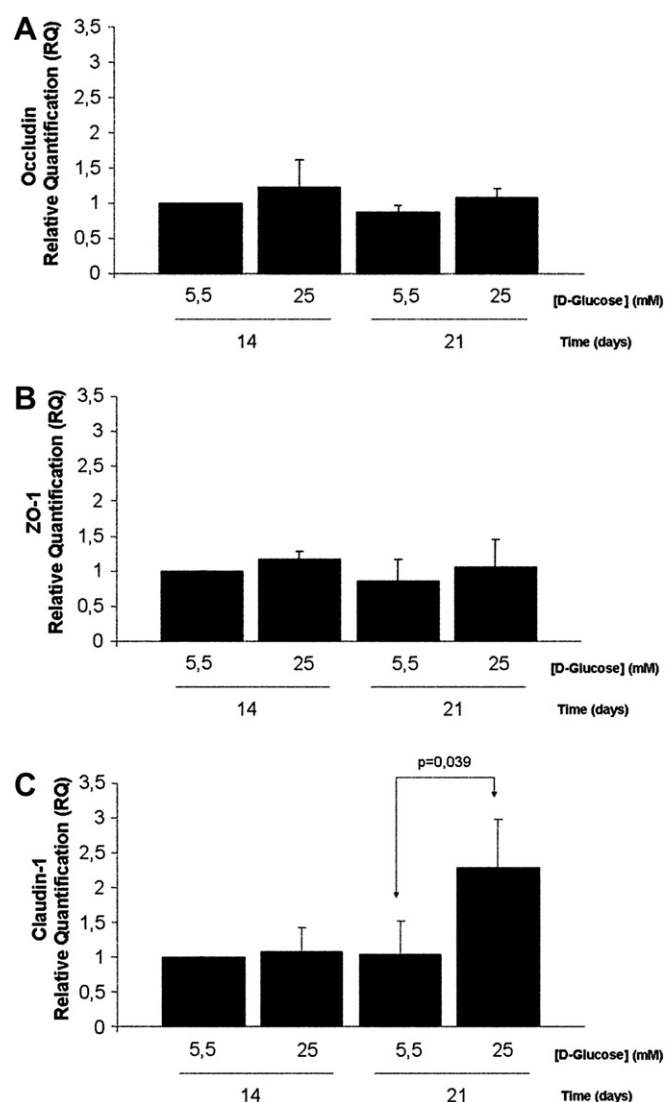
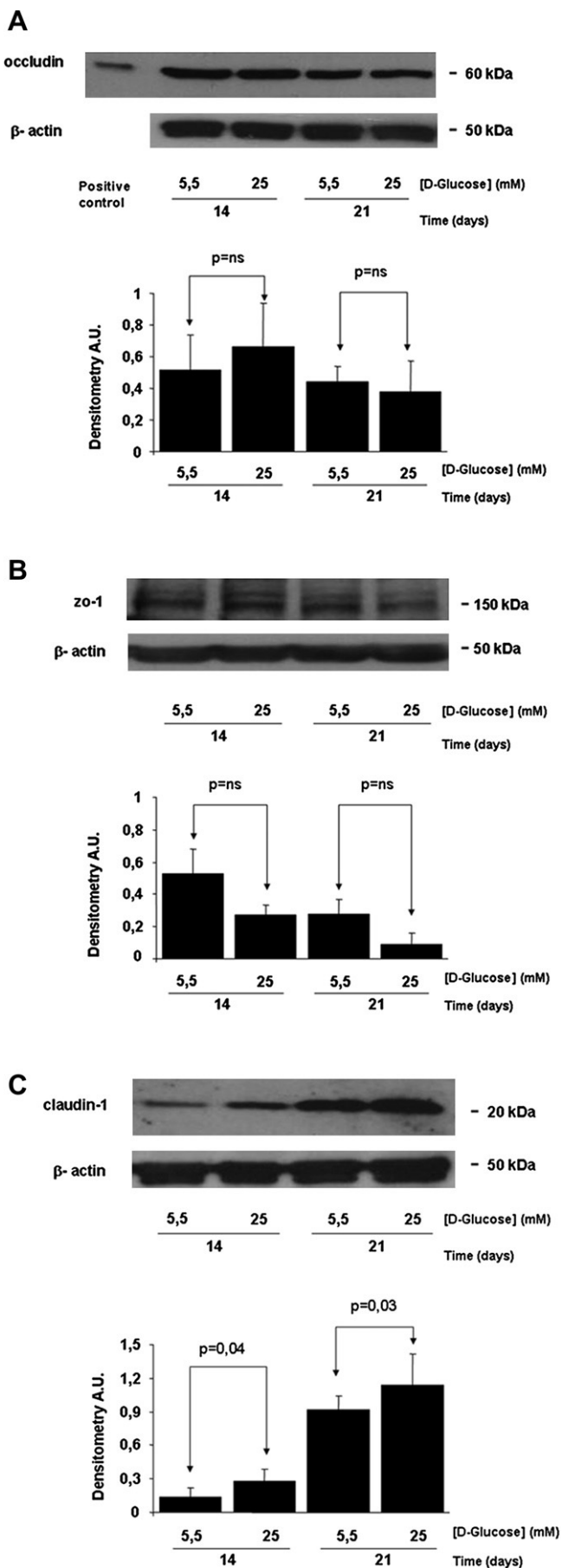


Fig. 2. Results of Real-Time PCR. Results of mRNA levels of occludin (A), ZO-1 (B) and claudin-1 (C). The vertical axis is the relative quantification (RQ) level of each gene. Bars represent the mean \pm SD of the values obtained. Levels of statistical significance were set at $p < 0.05$.



2.11. Statistical analysis

Student's *t* test was used to compare continuous variables that were expressed as mean \pm SD. Levels of statistical significance were set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Measurement of TER

The cells grown at 25 mM of D-glucose showed higher TER values than the ones maintained at 5.5 mM of D-glucose (Fig. 1A). These differences were already evident at 7 days of switched on 25 mM ($p < 0.001$) and continued to be significantly different for at least two weeks ($p \leq 0.002$ at days 14, 16, 18, 21, 23, 25, 28, 30).

3.2. Permeability assay

Permeability was significantly lower in cultures under 25 mM of D-glucose in comparison with 5.5 mM of D-glucose. These results were similar when using 70 kDa dextran ($p < 0.05$ at 30, 60, 90, 120, 195 and 270 min) (Fig. 1B), 40 kDa dextran ($p < 0.05$ at 90, 120, 195 and 270 min) (Fig. 1C) or after controlling by osmotic effect using mannitol (5.5 mM D-glucose + 19.5 mM mannitol) ($p < 0.05$ at 30, 60, 90, 120, 195, 270 min) (Fig. 1D).

3.3. Real-time PCR

Occludin and ZO-1 mRNA levels were similar in cultures maintained in 5.5 mM and 25 mM of D-glucose at 14 and 21 days (Fig. 2A and B). By contrast, high glucose concentration produced a clear upregulation of claudin-1 mRNA expression at 21 days (1.03 ± 0.48 vs 2.29 ± 0.7 ; $p = 0.039$) (Fig. 2C).

3.4. Western blot analysis

The results of Western blot analysis are displayed in Fig. 3. For occludin there were no significant differences between both glucose conditions in the measurements performed at 14 days (0.52 ± 0.22 vs 0.66 ± 0.28 ; $p = 0.42$) and at 21 days (0.44 ± 0.10 vs 0.38 ± 0.19 ; $p = 0.56$) (Fig. 3A). For ZO-1, a low protein content was observed in samples grown at 25 mM of D-glucose at 14 (0.53 ± 0.15 vs 0.27 ± 0.06 ; $p = 0.09$) and 21 days (0.28 ± 0.09 vs 0.09 ± 0.07 ; $p = 0.10$), but these differences were not significant (Fig. 3B). By contrast, we found significant differences in claudin-1 expression between the two glucose conditions. At 14 days we observed a significantly higher claudin-1 protein content in cells cultured under 25 mM of D-glucose (0.14 ± 0.08 vs 0.28 ± 0.11 ; $p = 0.04$). This difference was even more evident at 21 days (0.92 ± 0.12 vs 1.14 ± 0.28 ; $p = 0.03$) (Fig. 3C).

3.5. siRNA to claudin-1

siRNA to claudin-1 was able to significantly reduce mRNA levels of claudin-1 ($p = 0.002$) as well as the protein content ($p = 0.03$) (Fig. 4A and B).

siRNA to claudin-1 in ARPE-19 cells failed to demonstrate any differences in TER (Fig. 4C) and permeability (Fig. 4D) and,

Fig. 3. Results of Western blot analysis. (A) Results of occludin, (B) ZO-1 and (C) claudin-1. Protein levels are expressed in arbitrary units after correction for β -actin. Bars represent the mean \pm SD. Levels of statistical significance were set at $p < 0.05$. NS: no significant.

therefore, its role in reducing permeability under high (25 mM) glucose concentrations was negligible.

3.6. Immunohistochemistry

To demonstrate that the cells were grown forming a monolayer and exhibiting polarity, ARPE-19 cells were stained with ZO-1, occludin, claudin-1 and with the apical marker enzyme Na^+/K^+ ATPase (Fig. 5). As expected, the confocal vertical (X-Z) sections showed a predominant apical Na^+/K^+ ATPase localization (Fig. 5H) and apical staining pattern for the tight junction proteins ZO-1 (Fig. 5B), occludin (Fig. 5D) and claudin-1 (Fig. 5F).

The results of the immunohistochemistry performed in cells grown under euglycemic and hyperglycemic conditions are shown in Fig. 6. When cells were cultured at 25 mM of D-Glucose, claudin-1 immunostaining (Fig. 6D, green) appeared to be stronger than when cultured at 5.5 mM (Fig. 6A). Claudin-1 was observed to colocalize with ZO-1 in junctional complexes (Fig. 6C and F, yellow). Claudin-1 immunoreactivity disappeared to the background level when cells were treated with siRNA to claudin-1 (Fig. 6G). However, monolayer integrity was maintained (Fig. 6H).

3.7. Cell counting and cytotoxicity detection

In order to rule out a potential bias in the results due to changes in cell proliferation, the total number of cells and cells in division were counted. No significant differences were found in the total cell number between 5.5 mM of D-glucose and 25 mM (146 ± 27.37 vs 141.29 ± 20.01 ; $p = \text{ns}$). The number of cells in division was similar between both glucose concentrations (16.14 ± 4.95 vs 19.57 ± 7.00 ; $p = \text{ns}$). In addition, we did not observe any significant differences regarding cytotoxicity as measured by LDH assay ($5.43\% \pm 0.56$ vs $6.72\% \pm 0.46$; $p = \text{ns}$).

3.8. ATP measurements

ATP concentrations were measured in order to determine whether 25 mM of D-Glucose maintained ATP better than 5.5 mM of D-Glucose. ATP concentrations of cells grown under hyperglycemic conditions were higher than the ATP of cells grown in euglycemic media but these differences were not significant (2.86 ± 0.86 vs 2.16 ± 0.58 $\mu\text{g}/\text{ml}$; $p = 0.17$).

4. Discussion

The effect of the RPE on the properties of the neighboring cells is well documented but the effects of neighboring environments on RPE are less well studied (King and Suzuma, 2000; Peng et al., 2003). Intercellular junction integrity of RPE can be impaired by several proinflammatory cytokines, HGF and PLGF-1 (Abe et al., 2003; Jin et al., 2002; Miyamoto et al., 2007; Zech et al., 1998). However, the specific effects of high glucose concentrations on the function and molecular constituents of RPE cell tight junctions have never been reported. In the present study, we have found that glucose at a concentration mimicking severe hyperglycemia significantly increases TER and decreases permeability. In addition, this reduction in permeability was associated with a significant increase of expression and content of claudin-1. Therefore, it seems that high glucose concentrations strengthen rather than weaken the tight junction properties of ARPE-19 cells.

Tight junction integrity in cell culture is generally measured using TER and/or paracellular tracer flux. TER is measuring the resistance of the paracellular pathway rather than transcellular permeability and, therefore, the higher the TER the lower the permeability (Harhaj and Antonetti, 2004). In fact, in the present study we have observed an inverse relationship between TER and permeability assessed by dextran diffusion (data not shown).

We did not find any significant difference in the cell count and cytotoxicity assay between both glucose conditions. In addition, we

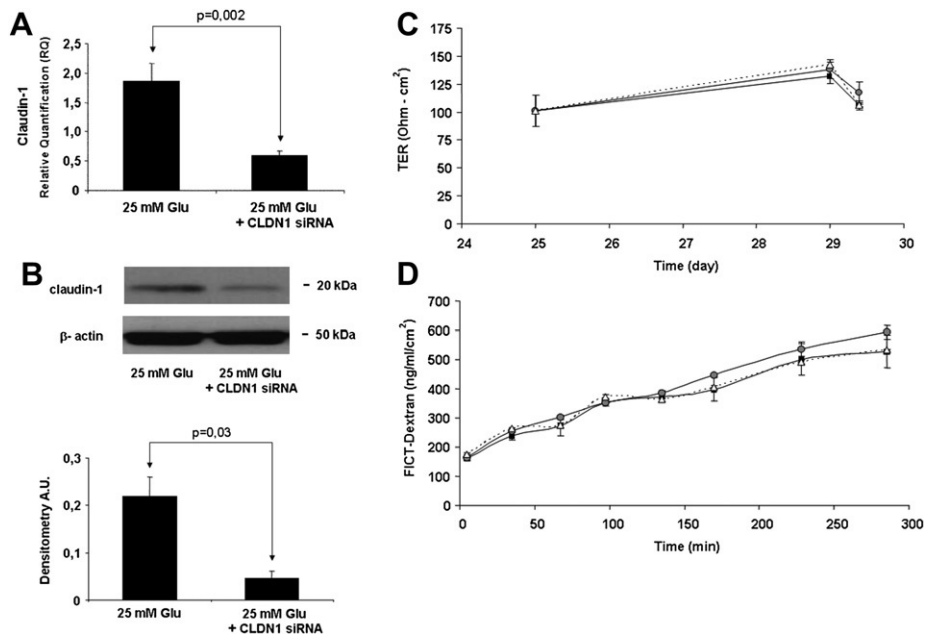


Fig. 4. Results of siRNA to claudin-1 experiments. (A) Results of Real-Time PCR. The vertical axis is the relative expression level of claudin-1. Gene expression levels were calculated after normalizing with β -actin. (B) Results of Western blot analysis of claudin-1. Protein levels are expressed in arbitrary units after correction for β -actin. Bars represent the mean \pm SD. (C) Results of TER. The vertical axis represents the TER, expressed in $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$, and the horizontal axis the time. (D) Results of 40 kDa dextran permeability. The vertical axis is the concentration of dextran and the horizontal axis is the time after addition of the molecule. (—) 25 mM D-glucose; (---) 25 mM D-glucose + CLDN1 siRNA; (---) 25 mM D-Glucose + CYP B siRNA (positive control). Dextran permeability was measured at 5, 35, 67, 97, 135, 170, 228 and 285 min. Results are expressed as the mean \pm SD. Levels of statistical significance were set at $p < 0.05$. TER and permeability values were not significant ($p > 0.05$).

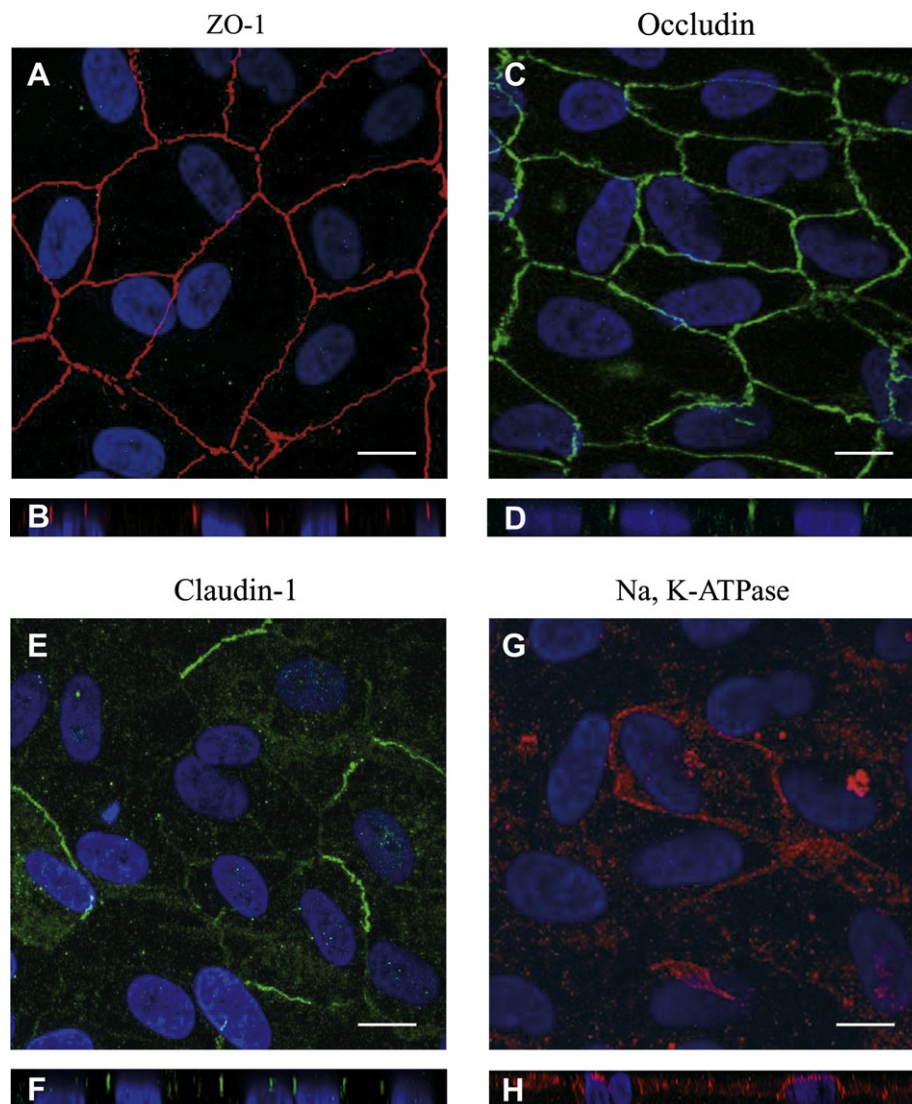


Fig. 5. Evidence for tight junctions and polarity in ARPE-19 monolayers. (A) Expression of ZO-1, (C) occludin, (E) claudin-1 and (G) Na^+/K^+ ATPase. Confocal vertical (X-Z) sections showing polarization of ARPE-19 cells. (H) Immunofluorescence of the apical marker enzyme Na^+/K^+ ATPase and (B) ZO-1, (D) occludin and (F) claudin-1 staining showing apical localization of tight junctions. Bar: 10 μm .

monitored by means of confocal microscopy that the growing cells were forming a monolayer. These results suggest that the significant differences observed in TER and permeability detected in the medium with high glucose concentration were not due to changes in cell proliferation, damage or cell growth in multilayers. In addition, the difference between 5.5 mM and 25 mM of glucose on ARPE-19 permeability cannot be attributed to osmotic effects because similar results were obtained after controlling the osmotic effect using mannitol.

There is little information regarding the effect of glucose and cytokines on ARPE-19 tight junction proteins. Abe et al. reported that IL-1 β impaired the barrier function in ARPE-19 cells and was accompanied by an aberrant expression of the tight junction molecules (Abe et al., 2003). Ghassemifar et al. (2006) demonstrated that VEGF significantly upregulates ZO-1 α^+ and ZO-1 α^- transcripts and proteins resulting in a significant increase in their TER. Miyamoto et al. (2007) reported that PLGF-1 increases ARPE-19 permeability and that injection of PLGF-1 into the vitreous of Lewis rats induced an opening of the RPE tight junctions with subsequent sub-retinal fluid accumulation and retinal edema. In

the present study we have found that high glucose concentrations lead to a decrease of permeability and a differential expression of tight junction proteins in ARPE-19 cells. Whereas occludin expression was unaffected, a low but not significant protein content of ZO-1 was detected. The significant upregulation of claudin-1 expression, observed in cultures treated with glucose 25 mM, might suggest that glucose exerts its effects on the barrier function by a process involving a specific increase in this tight junction protein. However, after blocking claudin-1 expression by using siRNA there were no effects on measurements of TER and permeability, thus arguing against claudin-1 as a significant contributor to the increase of sealing function associated with high glucose concentrations. The complexity of the tight junction complex is just beginning to be understood in epithelial model systems and the relative contribution of the various junctional proteins to BRB properties and the changes in permeability in disease states will be critical areas for future studies. However, our observations suggest that occludin, ZO-1 and claudin-1 are unrelated to the functional strengthening in RPE that occurs in hyperglycemic conditions. Therefore, further studies focused on

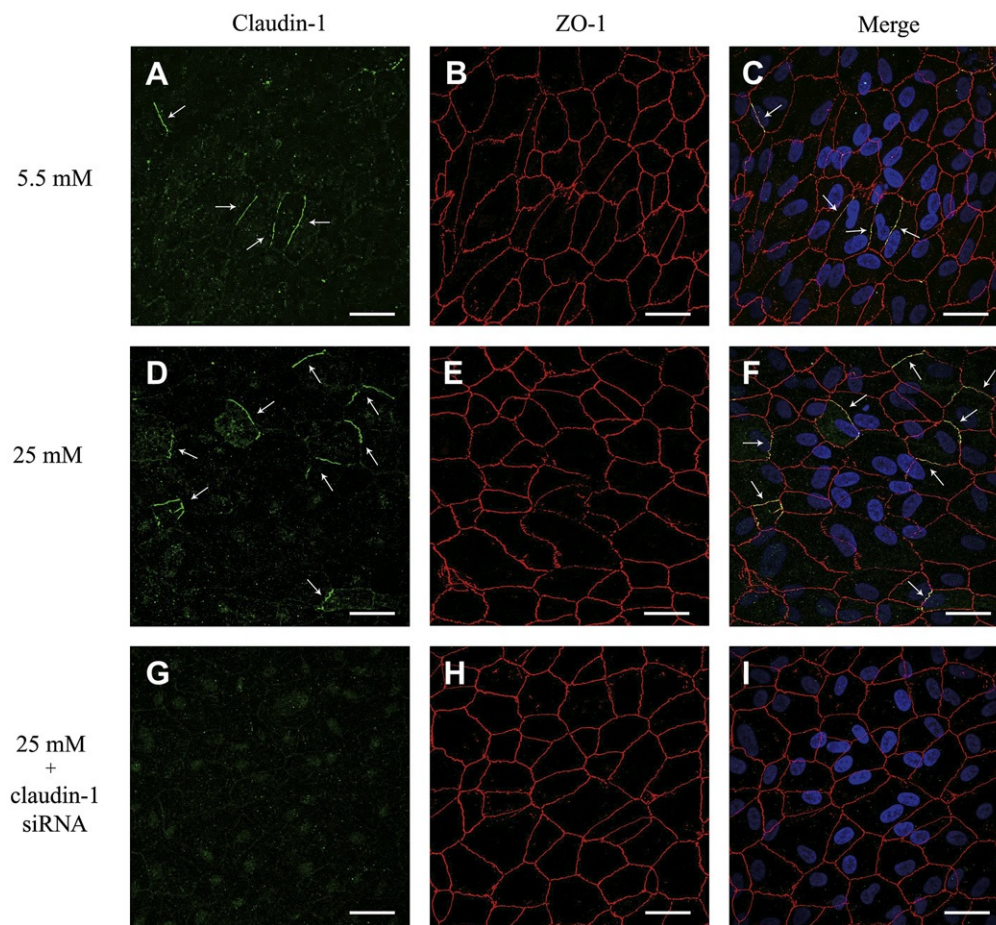


Fig. 6. Immunohistochemistry performed in cells grown under 5.5 mM and 25 mM of D-Glucose and cells treated with siRNA to claudin-1. (A, D) Expression of claudin-1 and (B, E) ZO-1 in ARPE-19 cultured cells. (C, F) Merged image showing colocalization of claudin-1 and ZO-1 (yellow). (G) Claudin-1 staining in siRNA treated cells. Note that the immunostaining disappears giving way to the background level. Bar: 25 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

other tight junction proteins, as well as other systems involved in RPE permeability are needed.

Our results cannot be easily transferred to clinical practice because the diabetic milieu is something more than high blood glucose levels, and other elements such as cytokines, growth factors, reactive oxygen species and advanced glycation end-products could be involved in tight junction dysfunction. However, our findings strongly suggest that hyperglycemia per se is not an important factor accounting for the impairment of the outer BRB in diabetic retinopathy. It is worth noting that Busik et al. (2008) have recently reported that in vivo diabetes-related endothelial injury in the retina may be due primarily to the release of cytokines induced by glucose but not a direct effect of high glucose. Another potential weakness of our study is that cultured cells do not perfectly fit in as a model of the tissue from which they were derived, simply because cells need to interact with their environment to maintain a native phenotype. One of the most difficulty properties to retain in epithelial cell culture is precisely the barrier function performed by tight junctions. However, ARPE-19 cell line is a line of human RPE that retains barrier function and, therefore, is a good model for studying RPE tight junctions (Luo et al., 2006).

In conclusion, high glucose concentration results in a reduction of permeability in ARPE-19 cells. This finding has important implications in both the design and the interpretation of the results of in vitro experimental studies using ARPE-19 cultured cells. In addition, our results suggest that the overexpression of claudin-1

induced by high glucose concentrations is not involved in the mechanisms by which glucose increases the tight junction sealing function.

Competing interests

None.

Acknowledgments

This study was supported by grants from Novo Nordisk Pharma S.A, Fundaci3n para la Diabetes, the Generalitat de Catalunya (2005SGR0030), and Ministerio de Ciencia y Tecnologa (SAF2006-05284). CIBER for Diabetes and Associated Metabolic Diseases is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III.

References

- Abe, T., Sugano, E., Saigo, Y., Tamai, M., 2003. Interleukin-1 β and barrier function of retinal pigment epithelial cells (ARPE-19): aberrant expression of junctional complex molecules. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 4097–4104.
- Busik, J.V., Mohr, S., Grant, M.B., 2008. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species toxicity to endothelial cells is dependent on paracrine mediators. *Diabetes* 57, 1952–1965.
- Campochiaro, P.A., Jerdon, J.A., Glaser, B.M., 1986. The extracellular matrix of human retinal pigment epithelial cells in vivo and its synthesis in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 27, 1615–1621.

- Chang, C.W., Ye, L., Defoe, D.M., Caldwell, R.B., 1997. Serum inhibits tight junction formation in cultured pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 1082–1093.
- Congdon, N.G., Friedman, D.S., Lietman, T., 2003. Important causes of visual impairment in the world today. *JAMA* 290, 2057–2060.
- Erickson, K.K., Sundstrom, J.M., Antonetti, D.A., 2007. Vascular permeability in ocular disease and the role of tight junctions. *Angiogenesis* 10, 103–117.
- Ghassemifar, R., Lai, C.M., Rakoczy, P.E., 2006. VEGF differentially regulates transcription and translation of ZO-1 α^+ and ZO-1 α^- and mediates trans-epithelial resistance in cultured endothelial and epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 323, 117–125.
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., Jaramillo, B.E., 2003. Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 81, 1–44.
- Harhaj, N.S., Antonetti, D.A., 2004. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1206–1237.
- Jin, M., Barron, E., He, S., Ryan, S.J., Hinton, D.R., 2002. Regulation of RPE intercellular junction integrity and function by hepatocyte growth factor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 2782–2790.
- Joussen, A., Smyth, N., Niessen, C., 2007. Pathophysiology of diabetic macular edema. *Dev. Ophthalmol.* 39, 1–12.
- King, G.L., Suzuma, K., 2000. Pigment-epithelium-derived factor: a key coordinator of retinal neuronal and vascular functions. *N. Engl. J. Med.* 342, 349–351.
- Lightman, S., Towler, H.M., 2003. Diabetic retinopathy. *Clin. Cornerstone* 5, 12–21.
- Luo, Y., Zhuo, Y., Fukuhara, M., Rizzolo, L.J., 2006. Effects of culture conditions on heterogeneity and the apical junctional complex of the ARPE-19 cell line. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 3644–3655.
- Miyamoto, N., de Kozak, Y., Jeanny, J.C., Glotin, A., Mascarelli, F., Massin, P., BenEzra, D., Behar-Cohen, F., 2007. Placental growth factor-1 and epithelial haemato-retinal barrier breakdown: potential implications in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 50, 461–470.
- Peng, S., Rahner, C., Rizzolo, L.J., 2003. Apical and basal regulation of the permeability of the retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 808–817.
- Strauss, O., 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* 85, 845–881.
- Tian, J., Ishibashi, K., Handa, J.T., 2004. The expression of native and cultured RPE grown on different matrices. *Physiol. Genomics* 17, 170–182.
- Zech, J.C., Pouverau, I., Cotinet, A., Goureau, O., Le Varlet, B., deKozak, Y., 1998. Effect of cytokines and nitric oxide on tight junctions in cultured rat retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 1600–1608.

CAPÍTULO II

Efecto protector del ácido fenofibrico sobre la disrupción del epitelio pigmentario de la retina inducida por la IL-1 β a través de la supresión de la activación de la vía de la AMPK.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto protector del ácido fenofibrico (el metabolito activo del fenofibrato) sobre la funcionalidad de la BHR externa y los niveles de expresión de las proteínas de TJ (occludina, ZO-1 y claudina-1) en células de epitelio pigmentario de la retina.

Para llevar a cabo este estudio utilizamos una línea celular humana de RPE (ARPE-19) la cual se mantuvo en cultivo durante 18 días en condiciones de normoglicemia (5.5 mM de D-Glucosa) e hiperglicemia (25 mM de D-Glucosa). En cada uno de estos cultivos se probaron 4 condiciones diferentes: (1) células control, las cuales no recibieron ningún tratamiento, (2) células tratadas con IL-1 β (10 ng/mL) durante 48h (días 16 y 17; 1 aplicación diaria) con la finalidad de provocar la disrupción de la monocapa, (3) células tratadas con dos concentraciones de ácido fenofibrico, 25 μ M y 100 μ M durante 72h (días 15, 16 y 17; 1 aplicación diaria) para evaluar los efectos citotóxicos de dicho fármaco y (4) células tratadas con dos concentraciones de ácido fenofibrico, 25 μ M y 100 μ M durante 72h (días 15, 16 y 17; 1 aplicación diaria) y con IL-1 β (10 ng/mL) durante 48h (días 16 y 17; 1 aplicación diaria) para evaluar el efecto protector del ácido fenofibrico sobre el daño celular provocado por la IL-1 β .

Los experimentos de permeabilidad realizados sobre células ARPE-19 cultivadas sobre transwells, revelaron que el tratamiento con ácido fenofibrico reducía significativamente el incremento de permeabilidad provocado por la IL-1 β de un modo dosis-dependiente. En los ensayos de inmunohistoquímica pudimos observar como la monocapa de células cultivadas a 25 mM de D-Glucosa y tratadas con IL-1 β presentaba una alteración en la estructura y en la distribución de las TJ. El tratamiento con una concentración de 25 μ M de ácido fenofibrico redujo significativamente la desorganización de las TJ, mientras que concentraciones mayores de este fármaco (100 μ M) potenciaron su efecto protector manteniendo la integridad de la monocapa celular totalmente preservada. En relación a los niveles de expresión de las proteínas de TJ no se observaron diferencias significativas entre las diferentes condiciones en el caso de la occludina y de la ZO-1. Sin embargo, el tratamiento

con IL-1 β provocó un aumento de expresión de claudina-1 que se redujo de manera dosis-dependiente cuando las células fueron tratadas previamente con ácido fenofibríco.

Con la finalidad de determinar si la vía de señalización de la AMPK estaba implicada en los efectos protectores del ácido fenofibríco sobre la funcionalidad del RPE estudiamos la activación de esta enzima en las diferentes condiciones de cultivo. El tratamiento con IL-1 β produjo una activación máxima de la AMPK por fosforilación de la Thr172 de la subunidad catalítica α . El tratamiento con 25 μ M de ácido fenofibríco redujo parcialmente la activación de la AMPK mientras que una concentración superior (100 μ M), previa a la suplementación con IL-1 β , previno la fosforilación de la AMPK y la mantuvo a niveles similares a las células control. Para evaluar la contribución de la activación de la AMPK sobre la permeabilidad epitelial y la organización de las TJ se trataron las células ARPE-19 con AICAR, un precursor del AMP que provoca la activación de dicha enzima. Los experimentos de permeabilidad e inmunohistoquímica demostraron como el tratamiento con AICAR producía un aumento de permeabilidad y una disrupción de la monocapa celular similar a la producida por la IL-1 β . El tratamiento con 100 μ M de ácido fenofibríco, previo a la adición de AICAR, previno de manera significativa la desorganización de las TJ preservando la integridad de la monocapa de células ARPE-19. Realizamos experimentos con RNA de transferencia para confirmar que la AMPK α jugaba un papel importante en el aumento de permeabilidad inducido por la IL-1 β . Para ello transfectamos las células ARPE-19 con siRNA para silenciar las dos isoformas de la AMPK, la α 1 y la α 2. Los resultados de estos experimentos demostraron que en las células en las que se había bloqueado la expresión de la AMPK α se redujo significativamente el aumento de permeabilidad inducido por la IL-1 β . Además, en los ensayos de inmunohistoquímica se pudo observar como en las células transfectadas se mantuvo parcialmente la estructura de la monocapa después del tratamiento con IL-1 β . Finalmente quisimos evaluar los niveles de fosforilación de la AMPK en el RPE de donantes diabéticos con NPDR y donantes no diabéticos. De acuerdo con los resultados obtenidos en los cultivos celulares, observamos como los niveles de fosforilación de la AMPK eran superiores en los pacientes diabéticos en comparación con los no diabéticos. A su vez, estos niveles de fosforilación eran similares a los obtenidos en células ARPE-19 cultivadas a 25 mM de D-Glucosa y tratadas con IL-1 β , condición escogida en este

estudio para simular *in vitro* la lesión que se produce en el RPE de pacientes diabéticos después de años de evolución de la enfermedad.

Los resultados de este estudio demuestran como el tratamiento de las células ARPE-19 con ácido fenofibrato reduce significativamente, y de manera dosis-dependiente, el aumento de permeabilidad y la disrupción de la monocapa celular provocada por la IL-1 β . Este efecto obedece a que el ácido fenofibrato suprime la activación de la AMPK inducida por el medio diabético. Estos hallazgos contribuyen a aumentar nuestro conocimiento sobre los efectos beneficiosos del fenofibrato en el tratamiento del DME y sobre su mecanismo de acción en el RPE.

Fenofibric acid prevents retinal pigment epithelium disruption induced by interleukin-1 β by suppressing AMP-activated protein kinase (AMPK) activation

M. Villarroel · M. Garcia-Ramírez · L. Corraliza ·
C. Hernández · R. Simó

Received: 3 November 2010 / Accepted: 18 January 2011 / Published online: 3 March 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract

Aims/hypothesis The mechanisms involved in the beneficial effects of fenofibrate on the development and progression of diabetic macular oedema (DMO) remain to be elucidated. To shed light on this issue we have explored the effect of fenofibric acid on the barrier function of human retinal pigment epithelium (RPE) cells.

Methods ARPE-19 cells (a human RPE line) were cultured for 18 days under standard conditions and under conditions leading to the disruption of the monolayer (D-glucose, 25 mmol/l, with IL-1 β , 10 ng/ml, added at days 16 and 17). Fenofibric acid, 25 μ mol/l and 100 μ mol/l, was added on the last 3 days of the experiment (one application/day). RPE cell permeability was evaluated by measuring apical-

basolateral movements of FITC-dextran (40 kDa). The production of tight junction proteins and AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation was assessed by western blot. Immunohistochemical studies of tight junction proteins and small interfering RNA transfection to AMPK were also performed in ARPE-19 monolayers.

Results Treatment of ARPE-19 cells with fenofibric acid significantly reduced the increment of permeability and the breakdown of the ARPE-19 cell monolayer induced by D-glucose, 25 mmol/l, and IL-1 β , 10 ng/ml, in a dose-dependent manner. This effect was unrelated to changes in the content of tight junction proteins. Fenofibric acid prevented the activation of AMPK induced by IL-1 β and the hyperpermeability induced by IL-1 β was blocked by silencing AMPK.

Conclusions/interpretation Disruption of RPE induced by IL-1 β is prevented by fenofibric acid through its ability to suppress AMPK activation. This mechanism could be involved in the beneficial effects of fenofibrate on DMO development.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00125-011-2089-5) contains supplementary material, which is available to authorised users.

M. Villarroel · M. Garcia-Ramírez · L. Corraliza · C. Hernández ·
R. Simó (✉)

Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y
Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Spain
e-mail: rsimo@ir.vhebron.net
URL: www.ciberdem.org

M. Villarroel · M. Garcia-Ramírez · L. Corraliza · C. Hernández ·
R. Simó

Diabetes and Metabolism Research Unit,
Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR),
Pg Vall d'Hebron 119–129,
08035 Barcelona, Spain

M. Villarroel · M. Garcia-Ramírez · L. Corraliza · C. Hernández ·
R. Simó

Universitat Autònoma de Barcelona,
Barcelona, Spain

Keywords AMPK · Blood–retinal barrier · Diabetic macular oedema · Diabetic retinopathy · Fenofibric acid · IL-1 β · Permeability · Retinal pigment epithelium

Abbreviations

AICAR	5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside
AMPK	AMP-activated protein kinase
BRB	Blood–retinal barrier
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DMO	Diabetic macular oedema
DMSO	Dimethylsulphoxide
DR	Diabetic retinopathy
LDH	Lactate dehydrogenase
NPDR	Non-proliferative diabetic retinopathy
PDR	Proliferative diabetic retinopathy
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor

RPE Retinal pigment epithelium
ZO-1 Zonula occludens-1

Introduction

Proliferative diabetic retinopathy (PDR) remains the leading cause of blindness and vision loss in adults under 40 years in the developed world [1]. Diabetic macular oedema (DMO), another important event that occurs in diabetic retinopathy (DR), is more frequent in type 2 than in type 1 diabetes, and it is the primary cause of poor visual acuity in type 2 diabetes. Because of the high prevalence of type 2 diabetes, DMO is the main cause of visual impairment for diabetic patients [2]. Vascular leakage caused by the breakdown of the blood–retinal barrier (BRB) is the main event involved in the pathogenesis of DMO [3, 4]. In the Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) study on DR, treatment with fenofibrate (a peroxisome proliferator-activated receptor [PPAR]- α agonist) reduced the need for laser treatment for DMO and PDR by 30% [5]. In addition, the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) Eye Study has recently shown 40% reduction in the odds of having progression of DR in the group of patients receiving fenofibrate plus simvastatin compared with those patients treated with placebo plus simvastatin [6]. However, the mechanisms by which fenofibrate exert its beneficial effects in DR remain to be elucidated [7, 8]. Because of the notable effect of fenofibrate in preventing DMO progression, it could be hypothesised that fenofibrate exerts an important effect in preventing and/or restoring the sealing function of the BRB. In fact, it has been recently reported that PPAR- α WY 14643 reduces inflammation and vascular leakage in a murine model of lung injury [9].

The BRB is composed of two elements: (1) the inner BRB, which is constituted by the blood vessels of the retina and directly controls the flux into the inner retina; and (2) the outer BRB formed by the retinal pigment epithelium (RPE), which controls the flow of solutes and fluid from the choroidal vasculature into the outer retina [10, 11]. The strict control of fluid and solutes that cross the inner and the outer BRB is achieved through well-developed tight junctions, zonula occludens-1 (ZO-1), claudins and occludin being the most studied of these proteins. While extensive work has been carried out to identify the factors involved in the disruption of the tight junctions of the inner BRB, the mechanisms implicated in the regulation of the outer BRB have been poorly explored.

The increase in pro-inflammatory cytokines plays a key role in the pathogenesis of DMO [4, 12, 13]. In fact, treatment of RPE cells with either serum, interferon- γ , tumour necrosis factor- α , hepatocyte growth factor (HGF), IL-1 β or placental

growth factor-1 (PLGF-1) increases permeability and alters the levels or content of tight junction molecules [14–18]. As IL-1 β plays an essential role in the development of DR [19–22], we decided to use this cytokine to provoke the breakdown of the RPE cell monolayer and to test the potential preventive effects of fenofibrate.

On these bases, the aim of the present study was to explore the effect of fenofibric acid (the active metabolite of fenofibrate) on the barrier function and the levels of tight junction proteins (occludin, ZO-1 and claudin-1) in a human RPE cell line cultured under different glucose concentrations with and without IL-1 β . In addition, the role of AMP-activated protein kinase (AMPK; a cellular energy sensor) in mediating the hyperpermeability induced by IL-1 β and the effect of fenofibrate on AMPK activation was also evaluated.

Methods

Human RPE cell cultures ARPE-19, a spontaneously immortalised human RPE cell line, was obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cells were cultured in euglycaemic conditions (D-glucose, 5.5 mmol/l) and hyperglycaemic conditions (D-glucose, 25 mmol/l) for 18 days at 37°C under 5% (vol./vol.) CO₂ in medium (DMEM/F12) supplemented with 10% (vol./vol.) FBS (Hyclone; Thermo Fisher Scientific, UT, USA) and 1% (vol./vol.) penicillin/streptomycin (Hyclone; Thermo Fisher Scientific). ARPE-19 cells from passage 20 were used and the medium was changed every 3–4 days. For permeability studies, ARPE-19 cells were seeded at 400,000 cells/ml (80,000 RPE cells/well) in 0.33 cm² HTS-Transwells (Costar; Corning, NY, USA). For real-time PCR, western blot analysis and immunofluorescence cells were seeded at 20,000 cells/ml.

Four different conditions were tested in cells cultured under either 5 or 25 mmol/l D-glucose: (1) control cells that did not receive any treatment—in order to rule out a potential bias by an osmotic effect in cells cultured under D-glucose, 25 mmol/l, permeability was also measured using mannitol (D-glucose, 5.5 mmol/l, and mannitol, 19.5 mmol/l) as an osmotic control agent; (2) cells treated with IL-1 β (Preprotech; Rock Hill, NJ, USA), 10 ng/ml, for 48 h (days 16 and 17 at one application/day) in order to provoke the disruption of the monolayer; (3) cells treated with two concentrations of fenofibric acid, 25 μ mol/l and 100 μ mol/l, for 72 h (days 15, 16 and 17 at one application/day) to evaluate the potential cytotoxic effects of fenofibric acid; (4) cells treated with two concentrations of fenofibric acid, 25 and 100 μ mol/l, for 72 h (days 15, 16 and 17 at one application/day) and with IL-1 β , 10 ng/ml, for 48 h (days 16 and 17 at one application/day) in order to evaluate the effect of fenofibric acid in preventing the cell damage provoked by IL-1 β .

In addition, some cells were treated with 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR; Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA), 2 mmol/l, for 48 h (days 16 and 17 at one application/day) to induce AMPK activation.

The cells were subjected to serum starvation (1% [vol./vol.] FBS) during the treatments. Fenofibric acid was dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO) but the final concentration of DMSO in the medium did not exceed 0.03% (vol./vol.). DMSO was added to the control culture medium at the same concentration.

Small interfering RNA transfection A small interfering RNA (siRNA) probe targeted to *AMPK α 1* (also known as *PRKAA1*) and *AMPK α 2* (also known as *PRKAA2*) was purchased from Dharmacon (Lafayette, CO, USA). The target sequences for the human-specific *PRKAA1* Accell SMARTpool siRNA mixture are detailed in the electronic supplementary material (ESM). A control Accell siRNA pool of cyclophilin B (*CYPB* [also known as *PP1B*]; D-001970-01) was used in the experiments. ARPE-19 cells were transfected with 1 μ mol/l of Accell siRNAs in Accell delivery media (B-005000) according to the manufacturer's instructions. Cell monolayers were treated with Accell siRNA probes for 72 h and then the medium was replaced by standard conditions and the cells were treated with IL-1 β (10 ng/ml) and fenofibric acid (100 μ mol/l) as described above.

Permeability assay The permeability of RPE cells was determined at 18 days by measuring the apical-to-basolateral movements of FITC-dextran (40 kDa) (Sigma, St Louis, MI, USA) following a procedure previously reported by this group [23].

Real-time PCR RNA was extracted with the RNeasy Micro kit (Qiagen Sciences, Germantown, MD, USA). RT-PCR specific primers were used (Thermo Scientific Solaris qPCR Gene Expression Assays; Thermo Fisher Scientific): *PRKAA1* (AX-005027-00-0100) and *PRKAA2* (AX-005361-00-0100). Thermo Scientific Solaris qPCR Gene Expression ROX Master Mix was used. Automatic relative quantification data was obtained with ABI Prism 7000 SDS software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using *RPS18* as endogenous control gene (AX-011890-00-0100). The $\Delta\Delta C_t$ method was applied to estimate relative transcript levels. Levels of 18S amplification were used for endogenous reference to normalise each sample threshold cycle value. Units are expressed as relative quantification.

Western blot analysis After treatment, cells were washed with ice-cold PBS and lysed with 200 μ l of lysis buffer (RIPA buffer: PMSF, 1 mmol/l; Na₃VO₄, 2 mmol/l; NaF, 100 mmol/l; and containing 1 \times protease inhibitor cocktail [Sigma]). Protein was extracted and a total of 20 μ g protein was

resolved by 10% (vol./vol.) SDS-PAGE (for claudin-1 and occludin) and 7.5% (vol./vol.) SDS-PAGE (for ZO-1, p-AMPK- α -Thr¹⁷², AMPK) and transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA). The blots were probed with rabbit anti-claudin-1, rabbit anti-occludin and mouse anti-ZO-1, all diluted 1:1000, (Zymed Lab Gibco; Invitrogen, San Diego, CA, USA) and with rabbit anti-p-AMPK- α -Thr172 (1:1,000) and rabbit anti-AMPK (1:1,000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). After washing, goat anti-rabbit or -mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Pierce; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) was applied and proteins were visualised using the chemiluminescent HRP substrate Immobilon Western (Millipore, Billerica, MA, USA). The same blot was stripped and reblotted with a mouse primary antibody specific to β -actin (Calbiochem; Merck, Nottingham, UK) to normalise the protein levels. Densitometric analysis of the autoradiographs was performed with a GS-800 calibrated densitometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and analysed with Quantity One 4.6.2 software (Bio-Rad Laboratories). The measurements were performed at 18 days. Results are presented as densitometry arbitrary units.

Immunohistochemistry Immunohistochemistry was performed in cells grown for 18 days at confluence in 24 well plates containing one circular cover slip of glass (12 mm diameter) (Thermo Scientific, Menzel-Gläser; Braunschweig, Germany) inside each well. The details of the method have been reported elsewhere [23].

Cell counting and cytotoxicity Details of cell counting and the methods used to measure cytotoxicity are specified in the ESM.

Human retinas Eight human postmortem eyes were obtained from diabetic donors with non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR) in ophthalmological examinations performed during the preceding 2 years. Eight eye cups obtained from non-diabetic donors closely matched by age (68 \pm 8 vs 69 \pm 7 years) were selected from our eye bank as the control group. The time elapsed from death to eye enucleation was less than 4 h. After enucleation, eyes were snap frozen at -80°C and stored until assayed. Neuroretina and RPE were harvested under the microscopic dissection of isolated eye cups from donors following the protocol described by Sonoda et al. [24].

All ocular tissues were used in accordance with applicable laws and with the Declaration of Helsinki for research involving human tissue. In addition this study was approved by the ethics committee of our hospital.

Statistical analysis Data obtained were evaluated statistically using one-way ANOVA for the comparisons performed

among more than two groups. Unpaired Student's *t* test was used to determine the significance of the difference between two different groups. Results were expressed as mean \pm SD. Levels of statistical significance were set at $p < 0.05$.

Results

Effect of high glucose and IL-1 β on RPE cell permeability
As previously reported by this group [23] permeability was significantly lower in ARPE-19 cells cultured under 25 mmol/l D-glucose compared with 5.5 mmol/l D-glucose and this could not be attributed to an osmotic effect (Fig. 1a). The increase in permeability after IL-1 β treatment was similar in cells cultured in 5.5 mmol/l D-glucose to that in cells cultured in 25 mmol/l D-glucose (Fig. 1b). Therefore, IL-1 β is the main factor accounting for the breakdown of the ARPE-19 cell monolayer.

Fenofibric acid prevents the hyperpermeability induced by IL-1 β
Treatment of ARPE-19 cells with fenofibric acid significantly reduced the increment of permeability induced

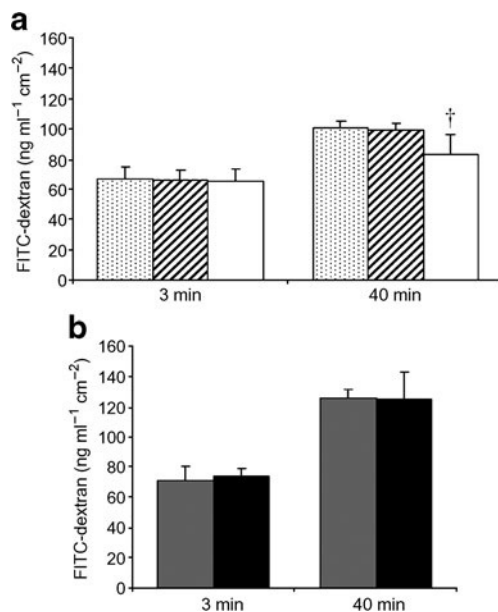


Fig. 1 Results of 40 kDa dextran permeability. The vertical axis is the concentration of dextran and the horizontal axis is the time after the addition of the molecule. **a** ARPE-19 permeability after treatment with: D-glucose, 5.5 mmol/l (dotted bars); D-glucose, 5.5 mmol/l, and mannitol, 19.5 mmol/l (striped bars); and D-glucose, 25 mmol/l (white bars). Results are expressed as the mean \pm SD, $n=6$. $\dagger p=0.04$ compared with the other conditions at 40 min. Dextran permeability was measured at 3 and 40 min. **b** ARPE-19 permeability after treatment with: D-glucose, 5.5 mmol/l, and IL-1 β , 10 ng/ml, for 48 h (dark grey bars); and D-glucose, 25 mmol/l, and IL-1 β , 10 ng/ml, for 48 h (black bars). Results are expressed as the mean \pm SD, $n=6$. Dextran permeability was measured at 3 and 40 min

by IL-1 β . This protective effect on monolayer permeability was more evident in cultures treated with fenofibric acid, 100 μ mol/l, ($p=0.02$ at 40 min) than in cultures treated with fenofibric acid, 25 μ mol/l, ($p=0.04$ at 40 min; Fig. 2).

Fenofibric acid prevents the disorganisation of tight junction proteins
Immunofluorescence analysis showed a change in cell shape and tight junction disruption in ARPE-19 cells cultured under D-glucose, 25 mmol/l, and IL-1 β . By contrast, treatment with 25 μ mol/l fenofibric acid prior to IL-1 β supplementation partially preserved monolayer integrity. This protective effect of fenofibric acid was more evident when using a higher concentration (100 μ mol/l), which resulted in monolayer integrity being totally preserved (Fig. 3). Claudin-1 immunostaining in IL-1 β -supplemented cell cultures appeared to be stronger than in the untreated cells, but no significant differences were observed in ZO-1 and occludin staining (Fig. 3).

We did not observe any significant differences for occludin and ZO-1 under different conditions in western blot analyses (data not shown). By contrast, IL-1 β -treated cultures showed higher levels of claudin-1 than the untreated cells. This increase in claudin-1 after IL-1 β supplementation was reduced in a dose-dependent manner when the cells were previously treated with fenofibric acid, 25 or 100 μ mol/l (Fig. 4).

Fenofibric acid prevents the activation of AMPK induced by IL-1 β
AMPK activation was examined in order to study whether this cellular energy sensor participates in the fenofibric-acid-induced effects on epithelial barrier function. We did not find any difference in AMPK activation

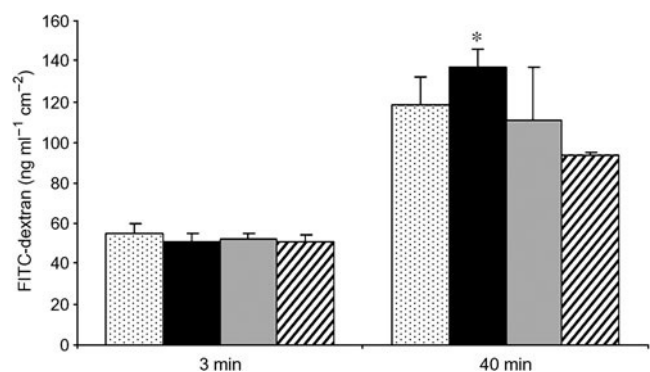


Fig. 2 ARPE-19 permeability after treatment with: D-glucose, 5.5 mmol/l (dotted bars); D-glucose, 25 mmol/l, and IL-1 β , 10 ng/ml, for 48 h (black bars); D-glucose, 25 mmol/l, fenofibric acid, 25 μ mol/l, for 72 h, and IL-1 β , 10 ng/ml, for 48 h (light grey bars); and D-glucose, 25 mmol/l, fenofibric acid, 100 μ mol/l, for 72 h and IL-1 β , 10 ng/ml, for 48 h (striped bars). Results are expressed as the mean \pm SD, $n=4$. ANOVA: $p < 0.001$; Student's *t* test: $*p < 0.05$ compared with the other conditions at 40 min. Dextran permeability was measured at 3 and 40 min

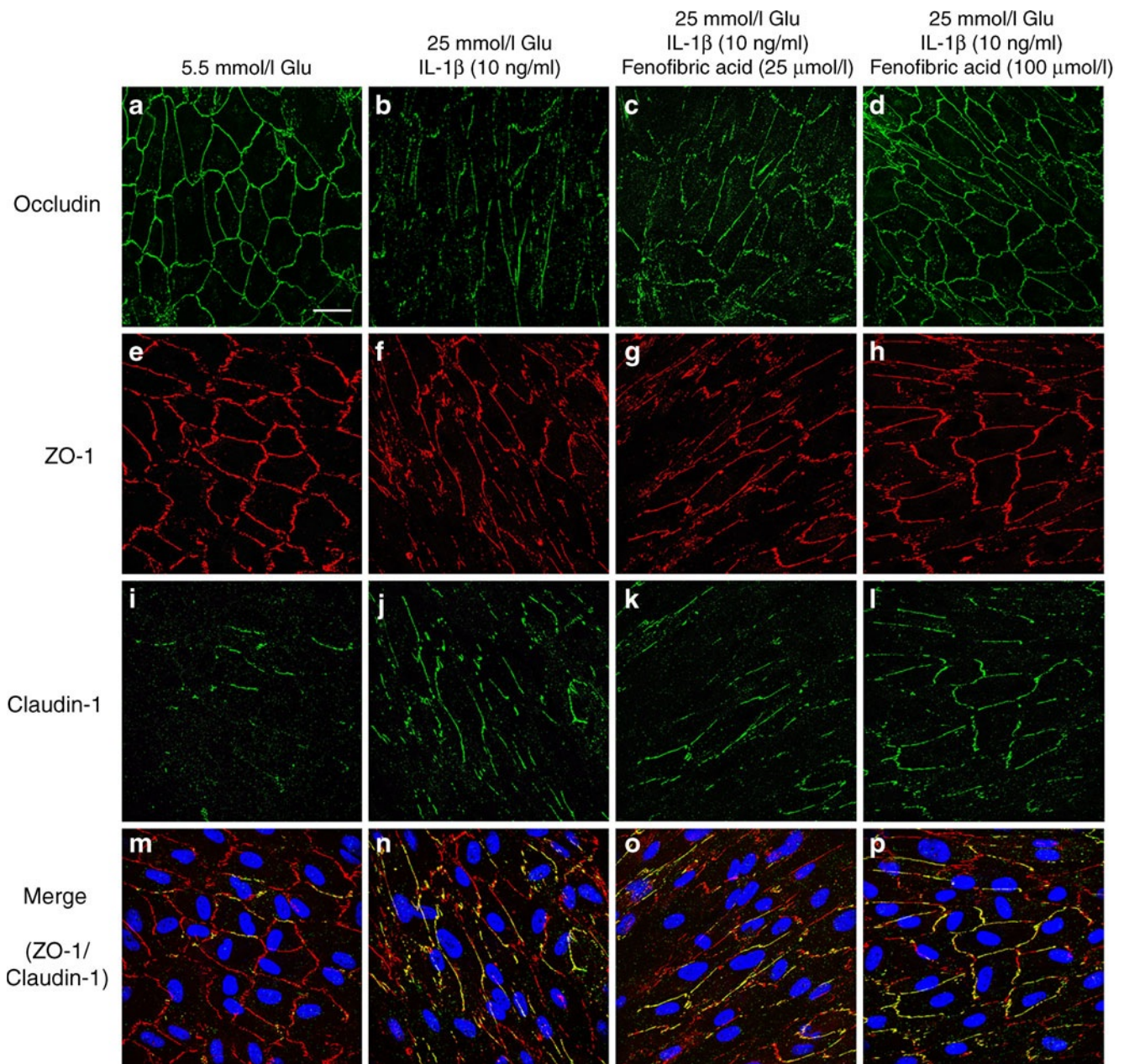


Fig. 3 Immunohistochemistry of ARPE-19 cells showing the disruption of the monolayer induced by IL-1 β and the beneficial effects of fenofibric acid, 25 and 100 μ mol/l, in preventing the disorganisation of tight junction proteins and in maintaining the integrity of the monolayer. (**a–d**) Occludin and (**i–l**) claudin-1 staining appears in

green and (**e–h**) ZO-1 staining appears in red. **m–p** Merged images show colocalisation of claudin-1 and ZO-1 (yellow). The nuclei were stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue). Scale bar, 20 μ m. Glu, glucose; Claud-1, claudin-1

between 5 and 25 mmol/l D-glucose. IL-1 β treatment caused maximal activation of AMPK in ARPE-19 cells as assessed by phosphorylation of Thr172 of the AMPK catalytic α -subunit, which is a well-established marker of AMPK activation. Treatment with 25 μ mol/l of fenofibric acid prior to IL-1 β supplementation partially prevented IL-1 β -induced activation of AMPK. A higher concentration of

fenofibric acid (100 μ mol/l), prior to the addition of IL-1 β , strongly reduced the phosphorylation of AMPK, almost to levels similar to those of the control cells (Fig. 5).

Furthermore, in an additional experiment, cells were treated with 100 μ mol/l fenofibric acid for 1 h before adding IL-1 β , 10 ng/ml. AMPK and AMPK activation were assessed at 0, 0.25, 1, 6, and 24 h after incubation. As

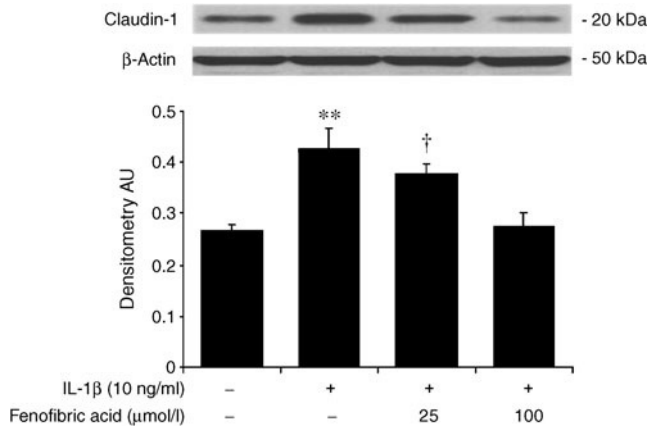


Fig. 4 Western blot showing the increase of claudin-1 after treatment with D-glucose, 25 mmol/l, and IL-1 β , 10 ng/ml, for 48 h and the preventive effect of fenofibric acid, 25 and 100 μ mol/l. Protein levels are expressed in arbitrary units after correction for β -actin. Bars represent the mean \pm SD, $n=4$. ** $p<0.01$ vs control (IL-1 β -, fenofibric acid-); † $p=0.04$ vs control. AU, arbitrary unit

shown in Fig. 6, the protective effect of fenofibric acid in preventing AMPK phosphorylation induced by IL-1 β was lost after 24 h incubation.

AMPK activation mediates the hyperpermeability induced by IL-1 β and it is prevented by fenofibric acid To evaluate the role of AMPK activation in epithelial permeability and tight junction disruption, cells were treated with AICAR, a precursor of AMP that enters cells and causes activation of AMPK. Treatment of ARPE-19 cells with AICAR, 2 mmol/l, caused significant AMPK activation, as assessed by phos-

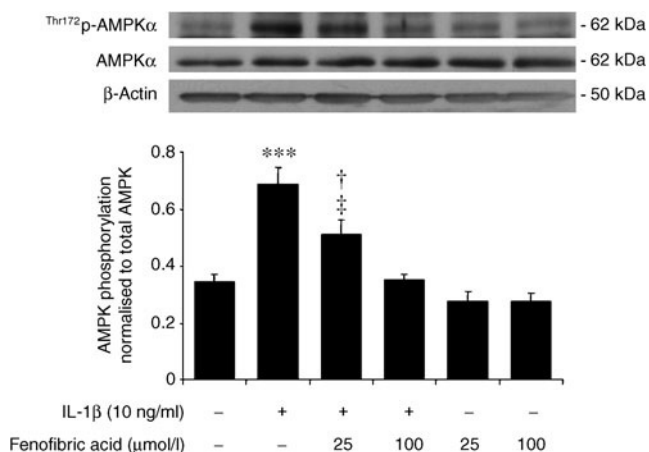


Fig. 5 Western blot showing the increase of AMPK phosphorylation after treatment with D-glucose, 25 mmol/l, and IL-1 β , 10 ng/ml, and the preventive effect of fenofibric acid, 25 and 100 μ mol/l. AMPK activity is expressed as the ratio of the phosphorylated form of the protein to total protein. Protein levels are expressed in arbitrary units after correction for β -actin. Bars represent the mean \pm SD, $n=4$. *** $p<0.001$ vs control (IL-1 β -, fenofibric acid-); † $p=0.007$ vs control; ‡ $p=0.003$ vs IL-1 β +, fenofibric acid-

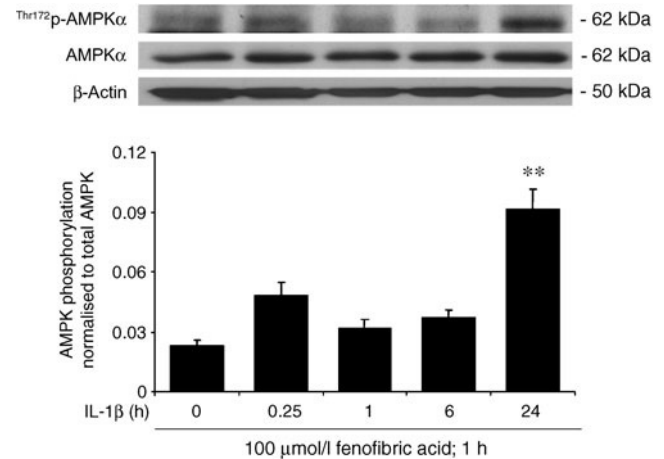


Fig. 6 Western blot of phosphorylated and total AMPK α after treatment with fenofibric acid, 100 μ mol/l, for 1 h prior to the addition of IL-1 β , 10 ng/ml. AMPK activity is expressed as the ratio of the phosphorylated form of the protein to total protein. Protein levels are expressed in arbitrary units after correction for β -actin. Bars represent the mean \pm SD, $n=4$. ** $p<0.01$ compared with the other conditions

phorylation of Thr172 of the AMPK catalytic α -subunit ($p=0.04$). Treatment with 100 μ mol/l fenofibric acid prior to AICAR supplementation prevented AICAR-induced activation of AMPK (Fig. 7a). To determine whether AMPK activation mediates IL-1 β -induced alterations in RPE permeability we measured FITC-dextran flux in cells treated with IL-1 β and in cells treated with AICAR. Under both conditions a significant increase in epithelial permeability was observed compared with cells cultured with 25 mmol/l D-glucose ($p=0.01$ and $p=0.02$, respectively; Fig. 7b). Notably, the increase in permeability detected under both conditions was very similar. In addition, treatment with fenofibric acid, 100 μ mol/l, prior to the addition of AICAR, was able to prevent the increment of permeability induced by AICAR supplementation ($p=0.04$; Fig. 7b). According to these results, immunofluorescence images showed that exposure to fenofibric acid treatment prior to the addition of IL-1 β or AICAR prevented the disruption of tight junction proteins and preserved monolayer integrity (Fig. 7c).

In order to confirm whether AMPK α was relevant in accounting for the hyperpermeability induced by IL-1 β , ARPE-19 cells were transfected with siRNA oligonucleotides targeting *AMPK α 1* and *AMPK α 2* isoforms. siRNA to *AMPK α* was able to significantly reduce mRNA levels of both *AMPK α 1* and *AMPK α 2* (by 91.2% [$p=0.03$; Fig. 8a] and 60% [$p=0.004$; Fig. 8b], respectively). AMPK α protein content was measured by western blot and a 56% of reduction was observed in cells treated with siRNA to *AMPK α 1* and *AMPK α 2* ($p=0.04$; Fig. 8c). To examine the functional effects of these findings we measured the flux of FITC-dextran (40 kDa) across ARPE-19 monolayers. As shown before in

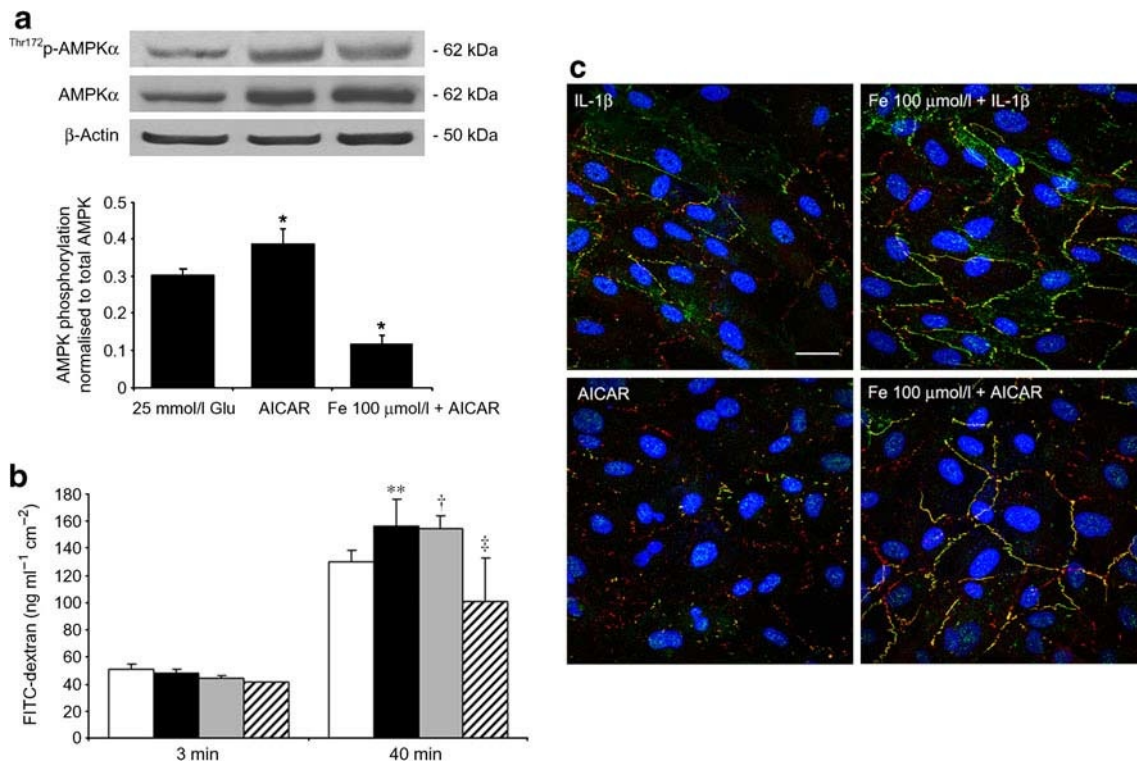


Fig. 7 Results of pharmacological activation of AMPK by AICAR and its effect on human RPE cell permeability. **a** Western blot of phosphorylated and total AMPK α showing the increase of AMPK phosphorylation induced by AICAR, 2 mmol/l, for 48 h, and the preventive effects of fenofibric acid, 100 μ mol/l, for 72 h. AMPK activity is expressed as the ratio of the phosphorylated form of the protein to total protein. Protein levels are expressed in arbitrary units after correction for β -actin. Bars represent the mean \pm SD, $n=4$. * $p < 0.05$ compared with the other conditions. **b** Results of 40 kDa dextran permeability. D-Glucose, 25 mmol/l, white bars; D-glucose, 25 mmol/l, and IL-1 β , 10 ng/ml, for 48 h, black bars; D-glucose, 25 mmol/l, and AICAR, 2 mmol/l, for 48 h, grey bars; D-glucose, 25 mmol/l,

fenofibric acid, 100 μ mol/l, for 72 h and AICAR, 2 mmol/l, for 48 h, striped bars. Results are expressed as the mean \pm SD, $n=4$. ** $p=0.01$, † $p=0.02$ and ‡ $p=0.04$ compared with D-glucose, 25 mmol/l. Dextran permeability was measured at 3 and 40 min. **c** Immunohistochemistry of ARPE-19 monolayers showing either the disruption of tight junction due to AMPK activation induced by IL-1 β , 10 ng/ml, for 48 h or by AICAR, 2 mmol/l, for 48 h, and the beneficial effects of previous treatment with fenofibric acid, 100 μ mol/l, for 72 h on the maintenance of monolayer integrity. Merged images show colocalisation of claudin-1 and ZO-1 (yellow). Scale bar, 20 μ m. Fe, fenofibric acid; Glu, glucose

Fig. 1, IL-1 β produced an increment of permeability that was almost prevented in AMPK α -transfected cells ($p=0.03$; Fig. 8d). Finally, the results of the immunohistochemistry showed that the monolayer integrity in AMPK α -knockdown cells treated with IL-1 β was partially preserved compared with those cells treated with IL-1 β (Fig. 8e).

Cell counting and cytotoxicity Results relating to cell counting and cytotoxicity are shown in the ESM.

AMPK activation in human RPE from diabetic and non-diabetic donors AMPK phosphorylation was significantly higher in RPE from diabetic donors with NPDR than in RPE from non-diabetic donors (Fig. 9). In addition, the levels detected in the RPE from diabetic patients were very similar to those obtained in ARPE-19 cells cultured with D-glucose, 25 mmol/l, and IL-1 β .

Discussion

It has recently been shown that fenofibrate, a PPAR- α agonist indicated for the treatment of hypertriglycerolaemia and mixed dyslipidaemia, reduces the progression of existing DR, thus lessening the need for laser treatment in both DMO and PDR [5]. This beneficial effect is unrelated to quantitative changes in serum lipids but other potential mechanisms, including its potential effect on the BRB, have recently been proposed [8]. In the present study we provide evidence that fenofibrate is able to prevent in a dose-dependent manner the breakdown of the RPE cell monolayer induced by the diabetic milieu, and that this effect is mainly mediated by its ability to lower AMPK activation.

The RPE is a specialised epithelium lying in the interface between the neural retina and the choriocapillaris, where it forms the outer BRB. Tight junctions between neighbouring

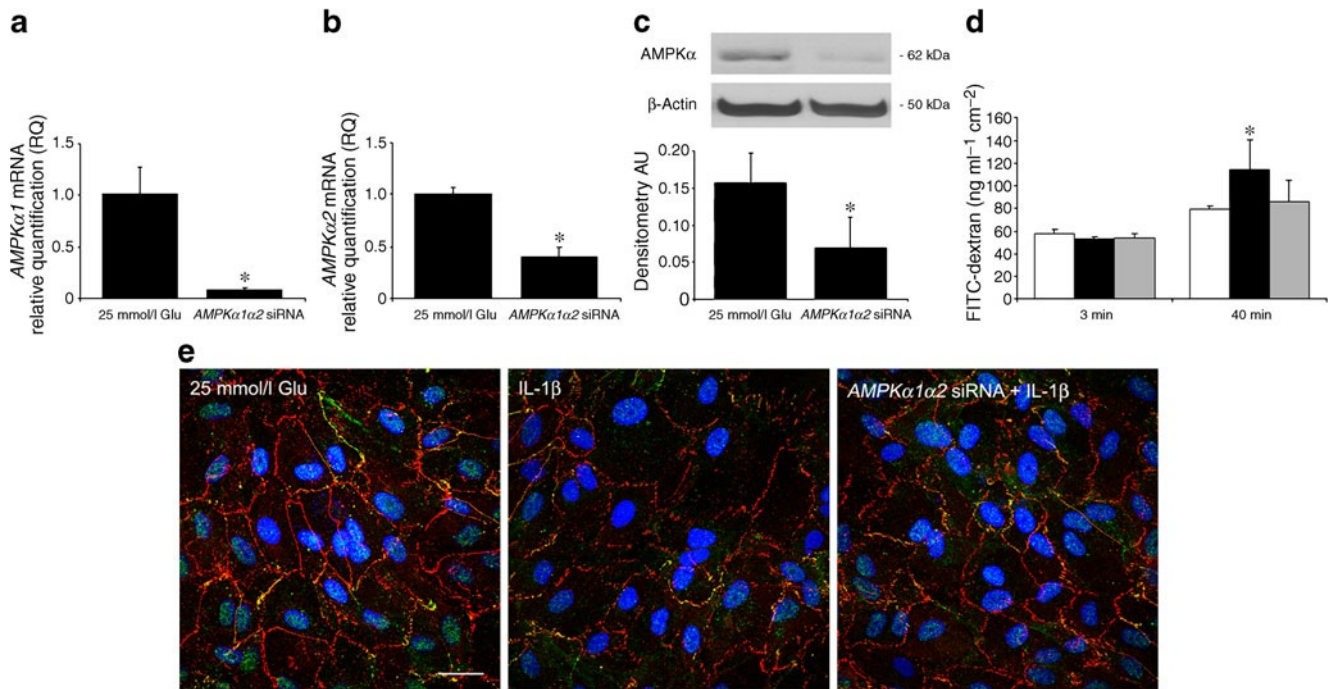


Fig. 8 Results of *AMPKα* knockdown using siRNA oligonucleotides. **a, b** Results of real-time PCR. The vertical axis is the relative expression level of (a) the *AMPKα1* isoform or (b) the relative expression level of the *AMPKα2* isoform. As can be seen both isoforms were significantly silenced by siRNA probes. Gene expression levels were calculated after normalising with *S18*. Bars represent the mean ± SD, *n*=3. **p*<0.05. **c** Results of western blot analysis showing the effectiveness of siRNA oligonucleotides in reducing the content of *AMPKα*. *AMPKα* protein levels are expressed in arbitrary units after correction for β-actin. Bars represent the mean ± SD, *n*=3. **p*=0.04. **d** Results of 40 kDa dextran permeability showing that

AMPK-induced hyperpermeability is prevented by siRNA. D-glucose, 25 mmol/l, white bars; D-glucose, 25 mmol/l, and IL-1β, 10 ng/ml, for 48 h, black bars; D-glucose, 25 mmol/l, and siRNA targeting *AMPKα1* and *AMPKα2* and IL-1β, 10 ng/ml, for 48 h, grey bars. Results are expressed as the mean ± SD, *n*=4. **p*<0.05 compared with the other conditions at 40 min. Dextran permeability was measured at 3 and 40 min. **e** Immunohistochemistry of ARPE-19 cells treated with IL-1β, 10 ng/ml, for 48 h and ARPE-19 cells transfected with siRNA targeting the *AMPKα1* and *AMPKα2* isoforms. Merged images show colocalisation of claudin-1 and ZO-1 (yellow). Scale bar, 20 μm. AU, arbitrary unit; Glu, glucose

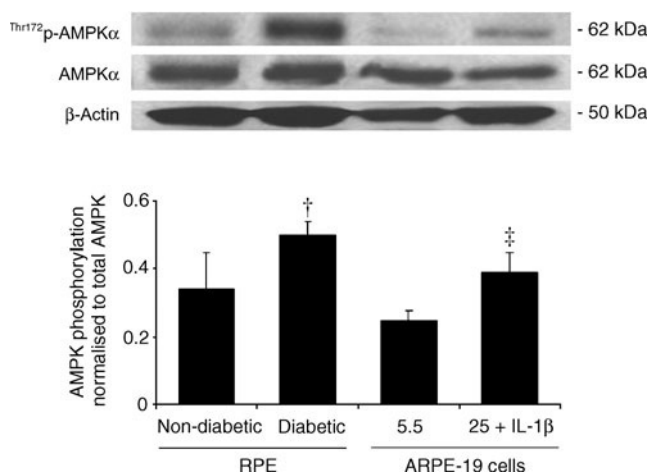


Fig. 9 Western blot showing the increase of *AMPK* phosphorylation in RPE from diabetic patients ($\dagger p=0.04$ vs non-diabetic patients), and in ARPE-19 cells after treatment with D-glucose, 25 mmol/l, and IL-1β, 10 ng/ml, for 48 h ($\ddagger p=0.03$ vs cells treated with D-glucose, 5.5 mmol/l). *AMPK* activity is expressed as the ratio of the phosphorylated form of the protein to total protein. Protein levels are expressed in arbitrary units after correction for β-actin. Bars represent mean ± SD

RPE cells and neighbouring endothelial cells are essential in the strict control of fluids and solutes that cross the BRB, as well as in preventing the entrance of toxic molecules and plasma components into the retina. Apart from this sealing function, RPE cells have other essential functions for the integrity of the retina [25]. Most of the research on the pathophysiology of diabetic retinopathy has been focused on the impairment of the neuroretina and the breakdown of the inner BRB. By contrast, the effects of diabetes on the RPE have received less attention.

Pro-inflammatory cytokines such as IL-1β play a crucial role in the pathogenesis of both PDR and DMO [19–22]. Apart from its intrinsic deleterious effect, IL-1β has been shown to stimulate several pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) [26, 27], which, in turn, have also been involved in both PDR and DMO [28–30]. It is well known that IL-1β participates in the breakdown of the inner BRB, which is constituted by retinal capillaries [31–33]. In addition, it has been also demonstrated that IL-1β induces the disruption of the barrier function of RPE cells, thus

resulting in an increased permeability [17]. Although this effect was associated with the aberrant production of tight junctions (downregulation of occludin and upregulation of claudin-1), the intracellular signalling pathways that mediate these effects remain to be elucidated. In the present study we have confirmed that exposure to IL-1 β is a good method for inducing the breakdown of the RPE cells and that this is associated with an upregulation of claudin-1. However, we have not found any differences in the levels of occludin and ZO-1. The upregulation of claudin-1 induced by IL-1 β was prevented by fenofibric acid in a dose-dependent manner. It could be expected that claudin-1 enhancement should be associated with a decrease rather than an increase in permeability, but this was not the case. In addition, we have recently shown that the upregulation of claudin-1 in ARPE-19 cells cultured under high glucose conditions (D-glucose, 25 mmol/l) was not related to changes in permeability [23]. Taken together, these findings suggest that an ordered distribution, rather than a crude assortment, of tight junction proteins is essential for the efficient functioning of RPE barrier. Fenofibric acid was able to reduce (at 25 μ mol/l) or prevent (at 100 μ mol/l) the disorganisation of tight junction proteins and it was associated with the preservation of the sealing function of RPE cells, which was also dose dependent. It is reasonable to deduce that the effect of fenofibric acid in preventing the breakdown of the RPE monolayer is mediated by its effect in maintaining the structural disposition of tight junction proteins. However, the complexity of the tight junction complex is just beginning to be understood in epithelial model systems and the relative contribution of the various functional proteins to BRB properties and the changes in permeability in disease states will be critical areas for future study. Therefore, apart from preventing the abnormal distribution of the tight junction proteins herein determined, fenofibric acid might also modulate other tight junction proteins, as well as other systems involved in RPE permeability.

AMPK is an evolutionarily conserved energy sensor in eukaryotic cells. It is activated by allosteric binding of AMP and through phosphorylation of its Thr172 residue in the activation loop by upstream kinases [34–36]. AMPK functions as a metabolic switch, thereby coordinating the cellular enzymes involved in carbohydrate and fat metabolism to enable ATP conservation and synthesis. When AMPK is activated by AMPK kinase, and a conformational change is induced by combining with AMP, the AMP/ATP ratio is decreased because ATP-consuming pathways are switched off and ATP-generating pathways are switched on [34–36]. AMPK can be triggered by an increased cellular AMP/ATP ratio under energy stress, such as hypoxia, ischaemia, glucose deprivation and oxidative stress. AMPK can also be activated in response to physiological stimuli such as exercise and contraction in skeletal muscle, and to

the peptide hormones leptin and adiponectin [34–36]. The induction of AMPK activation by IL-1 β detected in the present study, as well as the effect of fenofibric acid in preventing this activation, has not been previously reported. In addition, we have found that AMPK activation induced by AICAR leads to an increase of permeability due to the breakdown of the ARPE-19 cell monolayer similar to that provoked by IL-1 β , and it is also prevented by fenofibric acid. Furthermore, the hyperpermeability induced by IL-1 β can be prevented by silencing AMPK α . These findings strongly suggest: (1) the disruption of RPE cells provoked by IL-1 β is mediated by AMPK activation rather than as a direct effect of IL-1 β on tight junction protein production; and (2) the effect of fenofibric acid in preventing the disruption of human RPE cells is mediated by its ability to lower AMPK activation induced by IL-1 β or, in other words, fenofibric acid is able to anchor tight junction proteins and prevent their disorganisation by downregulating AMPK activation. Notably, we found that AMPK activation in human RPE from diabetic donors was significantly higher than in RPE from non-diabetic donors, and very similar to those obtained in ARPE-19 cells cultured under D-glucose, 25 mmol/l, and IL-1 β . These findings suggest that our results obtained *in vitro* could be transferred to the events that are taking place in the human diabetic retina, and point towards suppression of AMPK activation as a mechanism by which fenofibrate might prevent or arrest DMO.

AMPK activation can exert different effects in maintaining tight junction integrity depending on the cell type. In this regard, whereas AMPK activation has been recently involved in the disruption of the intestinal epithelial barrier induced by interferon- γ [37], it can also facilitate the assembly of tight junctions in certain epithelial cells such as Madin–Darby canine kidney (MDCK; a canine line of kidney epithelial cells) [38, 39]. Therefore, the effects of fenofibric acid in increasing the sealing function of RPE cells by means of lowering AMPK activation cannot be extrapolated to other cell types.

Finally, it should be stressed that we found that IL-1 β rather than high glucose level was the main factor accounting for the breakdown of the ARPE-19 cell monolayer. In addition, we provide evidence that fenofibric acid exerts its dose-dependent protective effects by blocking IL-1 β -induced AMPK activation independently of glucose levels. These findings support the concept that inflammation, and in particular IL-1 β , plays a crucial role in the pathogenesis of DMO. In this regard it is worth noting that Busik et al. [40] have reported that diabetes-related endothelial injury in the retina may be due primarily to glucose-induced cytokine release by neighbouring cells rather than the direct effect of high glucose on endothelial cells. However, we have only explored the effect of

fenofibric acid in RPE cells (outer BRB) and, as a consequence, further studies are needed to elucidate the effect of fenofibric acid on the sealing function of retinal endothelial cells (inner BRB).

In summary, treatment of ARPE-19 cells with fenofibric acid significantly reduced the increment of permeability and the breakdown of the ARPE cell monolayer induced by IL-1 β in a dose-dependent manner. This effect was mainly mediated by its ability to lower AMPK activation induced by IL-1 β . These findings contribute significantly to increasing our knowledge about why fenofibrate has beneficial effects on DMO development.

Acknowledgements This study was supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009-07408) and CIBERDEM. CIBERDEM is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III. We acknowledge the assistance of Abbott Laboratories in providing fenofibric acid.

Duality of interest R. Simó received grant support from Novo Nordisk and Abbott Laboratories, and advisory fees from Novo Nordisk, Elli Lilly, Pfizer and Novartis, as well as travel and accommodation expenses from all these companies. The remaining authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

References

- Congdon N, Friedman DS, Lietman T (2006) Important causes of visual impairment in the world today. *JAMA* 290:2057–2060
- Lightman S, Towler HM (2003) Diabetic retinopathy. *Clin Cornerstone* 5:12–21
- Simó R, Carrasco E, García-Ramírez M, Hernández C (2006) Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Diabet Rev* 2:71–98
- Joussen A, Smyth N, Niessen C (2007) Pathophysiology of diabetic macular edema. *Dev Ophthalmol* 39:1–12
- Keech A, Mitchell P, Summanen P et al (2007) Effect of fenofibrate on the need for laser treatment for diabetic retinopathy (FIELD study): a randomised controlled trial. *Lancet* 370:1687–1697
- The ACCORD Study Group, ACCORD Eye Study Group (2010) Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 363:233–244
- Simó R, Hernández C (2007) Fenofibrate for diabetic retinopathy. *Lancet* 370:1667–1668
- Simó R, Hernández C (2009) Advances in the medical treatment of diabetic retinopathy. *Diab Care* 32:1556–1562
- Schaefer MB, Pose A, Ott J et al (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor- α reduces inflammation and vascular leakage in a murine model of acute lung injury. *Eur Respir J* 32:1344–1353
- Strauss O (2005) The pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85:845–881
- Erickson KK, Sundstrom JM, Antonetti DA (2007) Vascular permeability in ocular disease and the role of tight junctions. *Angiogenesis* 10:103–117
- Kern TS (2007) Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res* 2007:95103
- Gardner TW, Antonetti DA (2008) Novel potential mechanisms for diabetic macular edema: leveraging new investigational approaches. *Curr Diab Rep* 8:263–269
- Chang CW, Ye L, Defoe DM, Caldwell RB (1997) Serum inhibits tight junction formation in cultured pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:1082–1093
- Zech JC, Pouverau I, Cotinet A, Goureau O, Le Varlet B, deKozak Y (1998) Effect of cytokines and nitric oxide on tight junctions in cultured rat retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:1600–1608
- Jin M, Barron E, He S, Ryan SJ, Hinton DR (2002) Regulation of RPE intercellular junction integrity and function by hepatocyte growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:2782–2790
- Abe T, Sugano E, Saigo Y, Tamai M (2003) Interleukin-1 β and barrier function of retinal pigment epithelial cells (ARPE-19): aberrant expression of junctional complex molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4097–4104
- Miyamoto N, de Kozak Y, Jeanny JC et al (2007) Placental growth factor-1 and epithelial haemato-retinal barrier breakdown: potential implications in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 50:461–470
- Kowluru RA, Odenbach S (2004) Role of interleukin-1 β in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 88:1343–1347
- Gerhardinger C, Costa MB, Coulombe MC, Toth I, Hoehn T, Grosu P (2005) Expression of acute-phase response proteins in retinal Müller cells in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:349–357
- Demircan N, Safran BG, Soylu M, Ozcan AA, Sizmaz S (2006) Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye* 20:1366–1369
- Vincent JA, Mohr S (2007) Inhibition of caspase-1/interleukin-1 β signaling prevents degeneration of retinal capillaries in diabetes and galactosemia. *Diabetes* 56:224–230
- Villarroel M, García-Ramírez M, Corraliza L, Hernández C, Simó R (2009) Effects of high glucose concentration on the barrier function and the expression of tight junction proteins in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 89:913–920
- Sonoda S, Spee C, Barron E, Ryan SJ, Kannan R, Hinton DR (2009) A protocol for the culture and differentiation of highly polarized human retinal pigment epithelial cells. *Nat Protoc* 4:662–673
- Simó R, Villarroel M, Corraliza L, Hernández C, García-Ramírez M (2010) The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood–retinal barrier—implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol* 2010:190724
- Holtkamp GM, van Rossem M, de Vos AF, Willekens B, Peek R, Kijlstra A (1998) Polarized secretion of IL-6 and IL-8 by human retinal pigment epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 112:34–43
- Holtkamp GM, de Vos AF, Peek R, Kijlstra A (1999) Analysis of the secretion pattern of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2) by human retinal pigment epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 118:35–40
- Funatsu H, Noma H, Mimura T, Eguchi S, Hori S (2009) Association of vitreous inflammatory factors with diabetic macular edema. *Ophthalmology* 116:73–79
- Yoshimura T, Sonoda KH, Sugahara M et al (2009) Comprehensive analysis of inflammatory immune mediators in vitreoretinal diseases. *PLoS ONE* 4:e8158
- Hernández C, Segura RM, Fonollosa A, Carrasco E, Francisco G, Simó R (2005) Interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and IL-10 in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabet Med* 22:719–722

31. Martiney JA, Lieak M, Berman JW, Arezzo JC, Brosnan CF (1990) Pathophysiologic effect of interleukin-1 β in the rabbit retina. *Am J Pathol* 137:1411–1423
32. Luna JD, Chan CC, Derevjaniak NL et al (1997) Blood-retinal barrier (BRB) breakdown in experimental autoimmune uveoretinitis: comparison with vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1beta-mediated breakdown. *J Neurosci Res* 49:268–280
33. Bamforth SD, Lightman SL, Greenwood J (1997) Interleukin-1 beta-induced disruption of the retinal vascular barrier of the central nervous system is mediated through leukocyte recruitment and histamine. *Am J Pathol* 150:329–340
34. Luo Z, Saha AK, Xiang X, Ruderman NB (2005) AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 26:69–76
35. Carling D (2004) The AMP-activated protein kinase cascade—a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 29:18–24
36. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1:15–25
37. Scharl M, Paul G, Barrett KE, McCole DF (2009) AMP-activated protein kinase mediates the interferon-gamma-induced decrease in intestinal epithelial barrier function. *J Biol Chem* 284:27952–27963
38. Zhang L, Li J, Young LH, Caplan MJ (2006) AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17272–17277
39. Zheng B, Cantley LC (2007) Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:819–822
40. Busik JV, Mohr S, Grant MB (2008) Hyperglycemia-induced reactive oxygen species toxicity to endothelial cells is dependent on paracrine mediators. *Diabetes* 57:1952–1965

DISCUSIÓN

DISEÑO DE UN MODELO QUE SIMULA *IN VITRO* LA DISRUPCIÓN DE LA BARRERA HEMATORRETINIANA EXTERNA INDUCIDA POR LA DIABETES

En la presente tesis se ha puesto a punto un modelo experimental de lesión de la BHR externa que simula la producida por la diabetes. Esta metodología se ha publicado en la revista *Methods in Molecular Biology* (ver PDF en anexo)¹⁸⁷.

Se utilizaron células ARPE-19 que son una línea comercial de RPE de retina humana que se caracteriza por conservar las propiedades de barrera y se considera un buen modelo para el estudio de las TJ *in vitro*³²⁷. Las células ARPE-19 se cultivaron sobre plástico de acuerdo con los resultados publicados por Tian *et al.* en los cuales se valoró el fenotipo de mRNA del RPE cultivado sobre diferentes tipos de matrices. En sus experimentos demostró que el RPE crecido directamente sobre plástico es el que presenta un perfil de expresión más parecido al RPE nativo, debido a que este material estimula al RPE a producir *in vitro* una matriz mucho más similar a la membrana basal que las matrices individuales comerciales. El RPE cultivado sobre colágeno IV, laminina o fibronectina presenta un fenotipo similar cuando se utilizan cualquiera de estas tres matrices pero difiere del RPE cultivado sobre colágeno I. Esto se debe a que el colágeno IV, la laminina y la fibronectina son los componentes mayoritarios de la membrana basal, sin embargo el colágeno I no es un componente normal de la membrana basal sino que se produce en condiciones patológicas¹⁸⁶.

Las células ARPE-19 se mantuvieron en cultivo durante 3 semanas en condiciones de normoglicemia (5.5 mM de D-Glucosa) e hiperglicemia (25 mM de D-Glucosa) para simular las condiciones de hiperglicemia crónica de los pacientes diabéticos. Con la finalidad de valorar la funcionalidad de las TJ de la monocapa de células ARPE-19 se realizaron medidas de la resistencia eléctrica transepitelial (TER) y de permeabilidad. Al contrario de lo esperado, observamos que la hiperglicemia provocaba un aumento del TER y una disminución de la permeabilidad en los cultivos de células ARPE-19. Respecto a la expresión de las proteínas de TJ, no se observaron diferencias significativas en el caso de la ocludina y la ZO-1 pero sí un aumento significativo del contenido de claudina-1 en condiciones de hiperglicemia. Realizamos estudios de citotoxicidad, proliferación e inmunohistoquímica

para descartar otras posibles causas que pudieran provocar una disminución de la permeabilidad, como el daño celular o el crecimiento de las células en multicapas en lugar de formar monocapas. Una vez descartados estos factores, se realizaron experimentos de transfección con RNA de interferencia para determinar si el aumento de expresión de la claudina-1 estaba relacionado con la disminución de la permeabilidad observada en condiciones de hiperglicemia. Después de bloquear la expresión de la claudina-1, no observamos cambios significativos en las medidas del TER ni de la permeabilidad. De los resultados obtenidos en nuestro primer experimento pudimos concluir que ninguna de las 3 proteínas de TJ estudiadas (occludina, ZO-1 y claudina-1) es la responsable directa de la disminución de permeabilidad observada en el RPE en condiciones de hiperglicemia ni de la mejora de la función de sellado de las TJ observada.

Este primer estudio nos demuestra la importancia del diseño y de la interpretación de los resultados al realizar estudios *in vitro* con células ARPE-19 como modelo de BHR externa. Los resultados obtenidos no son fácilmente transferibles a la práctica clínica debido a que la hiperglicemia no es el único factor presente en pacientes diabéticos. Además de concentraciones elevadas de glucosa, el medio diabético está compuesto por otros elementos como citoquinas, factores de crecimiento, especies reactivas de oxígeno y productos avanzados de la glicación que habría que tener en cuenta en el diseño de los experimentos. Según los resultados expuestos en el capítulo I, la hiperglicemia por sí sola no es un factor importante para explicar la rotura de la BHR externa observada en pacientes con DR. Es la combinación de los diferentes factores presentes en el medio diabético junto con la hiperglicemia lo que produce una alteración de la funcionalidad de la BHR externa y la disrupción de las TJ. El aumento de las citoquinas proinflamatorias observado en pacientes diabéticos juega un papel destacado en la patogénesis de la DR³²⁸⁻³³¹. En este sentido, nuestro grupo demostró una gran elevación de la concentración de varias citoquinas proinflamatorias en el humor vítreo de los pacientes con PDR, en el mismo rango que la detectada en los derrames pleurales metaneumónicos³³². Citoquinas como el TNF- α , IL-1 β e IFN- γ influyen en el comportamiento celular provocando respuestas inmunes e inflamatorias importantes. Cuando el RPE es estimulado por la IL-1 β y el TNF- α secreta IL-6 e IL-8, dos

potentes mediadores de inflamación³³³. Los pacientes diabéticos con PDR presentan niveles significativamente superiores de IL-1 β y de TNF- α en comparación con los pacientes control tanto en el vítreo (IL-1 β : 34,18 vs. 5,58 pg/mL // TNF- α : 160,77 vs. 12,38 pg/mL) como en el suero (IL-1 β : 12,87 vs. 0,42 pg/mL // TNF- α : 103,87 vs. 5,97 pg/mL). En los dos grupos, los niveles de estas dos citoquinas proinflamatorias son mayores en el vítreo que en el suero, indicando una posible secreción intraocular o un aumento de la concentración debido a la rotura de la BHR³³⁴. Existen estudios en la bibliografía realizados en cultivos de células de RPE, las cuales se han tratado con diferentes tipos de citoquinas como IFN- γ , TNF- α , HGF, IL-1 β , factor de crecimiento placentario-1 (PLGF-1) y con suero, con el fin de desvelar el efecto de estas moléculas sobre la funcionalidad del RPE. En todos ellos, los diferentes tratamientos producen una alteración del RPE, observándose una disminución de la resistencia transepitelial, un incremento de permeabilidad y una disrupción de las proteínas de las uniones celulares estrechas (TJ)^{198,335-338}.

Tal y como se ha comentado anteriormente, la hiperglicemia y la inflamación son dos factores importantes presentes en los pacientes con DR y DME que pueden tener graves consecuencias para el correcto funcionamiento de la BHR. Una de las dificultades de los estudios que se describen en el capítulo II fue encontrar las condiciones que mejor simularan el medio diabético *in vitro*. La limitación que presentan los cultivos celulares es que no son un modelo exacto del tejido del cual derivan, debido a que necesitan interactuar con su entorno para mantener su fenotipo original.

Con la finalidad de encontrar las condiciones de cultivo que mejor reprodujeran la alteración del RPE observado en pacientes con DME y PDR se probaron diferentes combinaciones de citoquinas proinflamatorias en células ARPE-19. Tal y como se explica en el capítulo II, la combinación de hiperglicemia (25 mM de D-Glucosa) con IL-1 β (10 ng/mL) durante 48 horas fue la que produjo un aumento de permeabilidad mayor y una alteración de las TJ que provocó la disrupción de la monocapa celular. Se ha demostrado en cultivos primarios de RPE humano y en células ARPE-19 que el tratamiento con IL-1 β estimula la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-6, IL-8 y la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), las cuales también se han relacionado con el desarrollo de PDR y

DME^{332,339,340}. La IL-1 β participa en la rotura de la BHR interna, actuando sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos de la retina³⁴¹. Según los experimentos realizados por Abe *et al.* en cultivos de células ARPE-19, el tratamiento con IL-1 β (10 ng/mL) produjo también un aumento significativo de la permeabilidad y una reducción de la resistencia transepitelial de la monocapa. Asimismo el tratamiento con esta citoquina alteró la expresión de las proteínas de TJ, hecho que se tradujo en una disminución de la expresión de ocludina y un aumento de claudina-1³³⁷. Nuestros resultados están de acuerdo con los experimentos de Abe *et al.* y confirman que el tratamiento de las células ARPE-19 con IL-1 β es un buen método para inducir la disrupción de las uniones celulares *in vitro*. Mientras que observamos un aumento en la expresión de claudina-1 en células cultivadas en condiciones de hiperglicemia (25 mM de D-Glucosa) y tratadas con IL-1 β , en el caso de la ocludina y de la ZO-1 no se observaron diferencias significativas. Según Abe *et al.* los cambios en la expresión de la ocludina y claudina-1 inducidos por el tratamiento con IL-1 β pueden alterar las interacciones homofílicas y herofílicas que se establecen entre las proteínas de TJ de las células adyacentes. Dichas interacciones son necesarias para la correcta organización de estas uniones celulares y para garantizar la selectiva permeabilidad paracelular de cada una de ellas³³⁷. Sin embargo, según nuestros resultados expuestos en el capítulo I, después de bloquear la expresión de la claudina-1 no se observan cambios significativos en las medidas del TER ni de permeabilidad. Estas observaciones nos indican que para garantizar una buena funcionalidad de las uniones celulares es más importante la correcta distribución y organización de las proteínas de TJ que los cambios en el contenido neto de éstas.

Toda la metodología utilizada en los experimentos que hemos realizado se recoge en una revisión que se adjunta como anexo al final de esta tesis (García-Ramírez *et al.*¹⁸⁷). En ella se describe el protocolo para inducir en cultivos de células de RPE una lesión similar a la que se produce en la retina durante la DR. Además, se detallan diferentes métodos para evaluar la funcionalidad de la monocapa de células de RPE y para el estudio de las uniones celulares estrechas (TJ).

EFFECTO DEL FENOFIBRATO SOBRE LA DISRRUPCIÓN DE LA BARRERA HEMATORRETINIANA EXTERNA INDUCIDA POR LA DIABETES

Una vez establecidas las condiciones de cultivo que mejor simulaban la lesión observada en pacientes diabéticos quisimos evaluar el efecto protector del ácido fenofíbrico, el metabolito activo del fenofibrato, sobre la disrupción del RPE. El fenofibrato es un agonista de los PPAR- α , indicado habitualmente para el tratamiento de dislipemias, en especial cuando existe hipertrigliceridemia. Además de estas clásicas indicaciones, dos importantes ensayos clínicos han demostrado el efecto del fármaco en la prevención de la progresión del DME y la DR^{31,32}. En el estudio FIELD, publicado en el año 2007, el tratamiento con fenofibrato redujo en un 30% la necesidad de tratamiento con láser en casos de DME y PDR^{31,320}. Posteriormente se publicó el estudio ACCORD, cuyos resultados fueron consistentes con el estudio FIELD, y en el cual se observó una reducción del 40% en la probabilidad de progresión de la DR en el grupo de pacientes tratados con fenofibrato combinado con simvastatina en comparación con los tratados con placebo y simvastatina^{32,325}.

No se conocen los mecanismos exactos a través de los cuales el fenofibrato reduce la progresión del DME y la DR pero sí se ha demostrado, según los resultados de los estudios FIELD y ACCORD, que son independientes de su efecto hipolipemiante. Según nuestra hipótesis, el fenofibrato podría ejercer un importante efecto protector sobre la retina, fortaleciendo las uniones celulares estrechas y evitando la disrupción de la BHR. Realizamos una serie de experimentos en células de RPE en condiciones que simularan el medio diabético, combinando hiperglicemia (25 mM de D-Glucosa) e IL-1 β (10 ng/mL), para provocar la disrupción de la monocapa y poder evaluar el efecto protector del ácido fenofíbrico (el metabolito activo del fenofibrato) sobre las TJ. Los resultados de estos experimentos se recogen en el capítulo II de esta tesis. Los estudios de permeabilidad revelaron que el tratamiento con IL-1 β , y no la hiperglicemia por sí sola, es el principal causante de la disrupción de la monocapa de células ARPE-19. Se utilizaron dos concentraciones de ácido fenofíbrico, 25 μ M y 100 μ M, para evaluar los efectos protectores

de este fármaco y determinar si eran dosis-dependientes. Efectivamente, tanto los experimentos de permeabilidad como los de inmunohistoquímica demostraron que la dosis menor de ácido fenofibríco (25 μM) reducía significativamente el incremento de permeabilidad y la desorganización de las TJ provocada por la IL-1 β mientras que dosis más altas (100 μM) provocaban una mayor disminución de permeabilidad y favorecían el mantenimiento de la estructura de las monocapa y la correcta distribución de las TJ. Como hemos mencionado anteriormente, no encontramos cambios en la expresión de las proteínas de TJ ocludina y ZO-1 en células tratadas con IL-1 β pero sí observamos un incremento de claudina-1, el cual se redujo de manera dosis-dependiente cuando las células fueron tratadas con ácido fenofibríco. Podríamos pensar que el incremento de claudina-1 está relacionado con una disminución de la permeabilidad más que con aumento de ésta, pero tal y como hemos demostrado en el capítulo I los cambios en el contenido de esta proteína de TJ no se relacionan con la función de sellado de la monocapa de RPE. Estas observaciones nos indican que para el correcto funcionamiento de la BHR externa es más importante una adecuada distribución y estructura de las TJ que un aumento en el contenido neto de éstas. Nuestros experimentos nos demuestran como, de acuerdo con esta idea, el ácido fenofibríco ejerce sus efectos beneficiosos sobre el RPE favoreciendo el mantenimiento de la estructura de la monocapa de células y la correcta organización de las uniones celulares estrechas. El efecto protector del ácido fenofibríco es dosis-dependiente, concentraciones bajas de ácido fenofibríco (25 μM) disminuyen parcialmente la desorganización de las TJ mientras que concentraciones más elevadas (100 μM) preservan totalmente la integridad y la estructura del RPE. Es importante mencionar que en esta tesis hemos estudiado las tres proteínas de TJ más importantes pero existen más de 40 proteínas que forman parte del complejo de las uniones celulares estrechas. Por tanto, no podemos descartar que el ácido fenofibríco module otras proteínas de TJ u otros sistemas implicados en la permeabilidad del RPE. La contribución relativa de otras proteínas sobre la funcionalidad de la BHR, así como los efectos del ácido fenofibríco sobre ellas deberían ser motivo de futuros experimentos para desvelar la importancia de este fármaco en la prevención del DME y de la DR.

MECANISMOS DE ACCIÓN DEL FENOFIBRATO EN EL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA

Las vías de señalización a través de las cuales el fenofibrato ejerce sus efectos beneficiosos sobre la retina se conocen parcialmente. Según los estudios de Murakami *et al.* realizados en células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical (HUVEC), el tratamiento con fenofibrato estimula eNOS y aumenta la producción de NO, ejerciendo un efecto protector sobre la microvasculatura³⁰⁴. Otros experimentos realizados en células endoteliales humanas de retina (HREC) y en células HUVEC han demostrado que el tratamiento con fenofibrato reduce la apoptosis y aumenta la supervivencia de estos tipos celulares^{305,307}. En células endoteliales humanas de la microvasculatura glomerular (HGMEC) también se ha observado que el tratamiento con fenofibrato produce una activación de eNOS así como una inhibición de la vía de NF-κB y de la apoptosis³⁰⁶. Estos efectos protectores del fenofibrato sobre la microvasculatura, aumentando la supervivencia celular y reduciendo la inflamación, son mediados a través de la activación de la vía de señalización de la AMPK. Estas observaciones nos indican que además de ser un agonista de los PPAR-α, el fenofibrato puede actuar a través de otros mecanismos independientes de dichos receptores nucleares.

Centrando nuestro trabajo en la BHR externa realizamos varios experimentos, descritos en el capítulo II, para determinar si la vía de señalización de la AMPK también podía estar implicada en los efectos protectores del ácido fenofibrato sobre el RPE que estábamos observando. La AMPK es un sensor de energía, cuya función es coordinar enzimas celulares implicadas en el metabolismo de carbohidratos y grasas con el fin de mantener las reservas de ATP y promover su síntesis en casos de demanda energética. Esta enzima se activa cuando aumenta la ratio AMP/ATP debido a un estrés energético producido por diferentes causas como hipoxia, isquemia, deprivación de glucosa y estrés oxidativo. También puede activarse por otros estímulos fisiológicos como el ejercicio, la contracción del músculo esquelético y hormonas como la leptina y adiponectina. En nuestros experimentos hemos demostrado por primera vez que los efectos beneficiosos del tratamiento con ácido fenofibrato en el RPE se deben a su capacidad para prevenir la

activación de la AMPK inducida por la IL-1 β . Las condiciones de cultivo que simulan el medio diabético (hiperglicemia + IL-1 β) producen una activación de la AMPK en las células ARPE-19 que provocan un aumento de permeabilidad y la disrupción de las TJ. Para evaluar la activación de la AMPK utilizamos la fosforilación del residuo Thr¹⁷² de la subunidad catalítica de la AMPK α como marcador de activación. El medio diabético (hiperglicemia + IL-1 β) produjo una activación máxima de la AMPK en células ARPE-19, que fue prevenida parcialmente por el tratamiento con 25 μ M de ácido fenofíbrico. Concentraciones mayores de este fármaco (100 μ M) redujeron significativamente la fosforilación de la AMPK α , prácticamente a niveles similares al control, hecho que se tradujo en una disminución de la hiperpermeabilidad y una conservación de la integridad y estructura de la monocapa de células ARPE-19. Los experimentos con AICAR, un activador de la AMPK, confirmaron como la fosforilación de esta enzima inducida por dicho compuesto, producía un incremento de la permeabilidad debido a la disrupción de las TJ similar al provocado por la IL-1 β y como el tratamiento con ácido fenofíbrico era capaz de prevenirlo. De manera complementaria, se transfectaron las células con RNA de interferencia para silenciar las dos isoformas de la AMPK α (AMPK α 1 y AMPK α 2) y corroborar que la IL-1 β estaba actuando a través de esta vía de señalización. Efectivamente tras el silenciamiento de las dos isoformas de la AMPK α no se observó ningún aumento de permeabilidad ni alteración significativa de la estructura de la monocapa de células ARPE-19. Para determinar si los resultados obtenidos *in vitro* eran transferibles *in vivo*, comparamos los niveles de fosforilación de la AMPK entre RPE de pacientes donantes control y RPE de pacientes donantes diabéticos con NPDR, observándose un aumento significativo de la activación de la AMPK en este último grupo. Este incremento de la fosforilación en pacientes diabéticos fue similar al observado *in vitro* en células ARPE-19 cultivadas bajo condiciones que simulaban el medio diabético. Todo ello nos indica que nuestros resultados pueden transferirse a la práctica clínica y presentan la supresión de la activación de la AMPK como un posible mecanismo de actuación del fenofibrato en la prevención de la progresión del DME. Como resultado de los experimentos expuestos durante el capítulo II de esta tesis podemos concluir que el ácido fenofíbrico ejerce un efecto protector dosis-dependiente a través del bloqueo de la activación de la AMPK inducida por la IL-1 β . El incremento de permeabilidad observado en cultivos de células

ARPE-19 en presencia de IL-1 β es independiente de la concentración de glucosa en el medio, hecho que nos indica que esta citoquina es el principal factor responsable de la disrupción de la monocapa celular. Estas observaciones apoyan el concepto de que la inflamación, y en particular la IL-1 β , tiene una importante contribución en la patogénesis del DME.

Cabe destacar que los efectos de la activación de la AMPK pueden ser diferentes según el tipo celular. Como hemos mencionado anteriormente, en algunos tipos celulares la activación de la AMPK produce efectos beneficiosos aumentando la supervivencia mediante una disminución de la apoptosis y la inflamación³⁰⁴⁻³⁰⁷. Sin embargo, en otros tipos celulares, como ocurre en las células ARPE-19, la activación de la AMPK tiene efectos opuestos produciendo un aumento de la inflamación a través de la activación de las vías como NF- κ B y p38/MAPK^{268,342,343}. Según el estudio de Riboulet-Chavey *et al.* el tratamiento de células- β pancreáticas con una combinación de citoquinas (TNF- α , IL-1 β y IFN- γ) produjo un aumento de la activación de la AMPK a las 48 horas y un aumento de la apoptosis³⁴⁴. Los efectos de la activación de la AMPK sobre la integridad y organización de las TJ también dependen del tipo celular. Mientras que en células MDCK se ha demostrado que la fosforilación de esta enzima favorece la polarización celular y el ensamblaje de las TJ, en células epiteliales de colón humano T₈₄ la activación de la AMPK produce el efecto contrario, reduciendo la expresión de las TJ^{266,267}. Scharl *et al.* demostraron en células T₈₄ que el tratamiento con IFN- γ (100 ng/mL) induce la activación de la AMPK a las 48 horas, independientemente de la concentración de ATP intracelular. Esta activación provoca una disminución de la resistencia transepitelial y un aumento de la permeabilidad, así como una disrupción de las TJ de la barrera epitelial intestinal²⁶⁸. Nuestros resultados, junto con los del experimento de Scharl *et al.*, sugieren un nuevo papel para la AMPK, no sólo como sensor de energía celular sino como transductor de señales de citoquinas proinflamatorias.

Como hemos mencionado anteriormente, la AMPK puede activarse por varias vías, siendo LKB1 y CaMKK β las más conocidas. LKB1 lleva a cabo la fosforilación de la AMPK cuando aumenta la ratio AMP/ATP debido a una disminución en los niveles de energía y la CaMKK β actúa en respuesta a un incremento en la concentración de calcio en el citosol.

Momcilovic *et al.*²⁵⁹ demostraron que existe una tercera vía de activación de la AMPK través de la quinasa TAK1. En sus experimentos con *Saccharomyces cerevisiae* observaron como TAK1 fosforilaba Snf1 (el ortólogo de la AMPK en levaduras) mientras que en células HeLa cultivadas *in vitro* la quinasa TAK1 estimulaba la fosforilación de la AMPK²⁵⁹. Inicialmente TAK1 fue identificada como mediadora de la señalización de TGF- β en células de mamífero³⁴⁵. Posteriormente se ha descubierto que TAK1 también puede ser activada por citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β y por el lipopolisacárido bacteriano, regulando las vías de señalización de NF- κ B y de las MAPK JNK y p38^{343,346-348}. Herrero-Martín *et al.*³⁴⁹ demostraron en células MCF10A procedentes de epitelio de mama humano que el tratamiento con IL-1 β (10 ng/mL) inducía la activación de la AMPK a través de la fosforilación de TAK1. En este mismo estudio se realizaron experimentos en células hTERT-RPE-1 de epitelio pigmentario de la retina en las cuales también se observó una activación de la AMPK por parte de TAK1 independientemente de LKB1³⁴⁹. Todos estos trabajos nos presentan a TAK1 y a AMPK como dos componentes importantes en las vías de señalización intracelular activadas durante procesos inflamatorios. Según los resultados obtenidos en nuestro estudio, la combinación de hiperglicemia + IL-1 β (10 ng/mL) también estimula la activación de la AMPK en células ARPE-19 produciendo un aumento de permeabilidad y una alteración de las uniones celulares estrechas. Asimismo hemos demostrado como el ácido fenofibrico ejerce un efecto protector sobre el RPE, bloqueando la vía de señalización de la AMPK, mediante la inhibición de la fosforilación de la AMPK. En un estudio que realizamos en colaboración con el grupo de la Dra. A. M. Valverde (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols-CSIC) se demostró que el tratamiento con ácido fenofibrico previene la activación de JNK y de p38 MAPK inducida por la combinación de hiperglicemia e hipoxia 1% en células ARPE-19³⁰⁸. Debido a que la hipoxia y el estrés oxidativo son un estímulo fisiológico de la AMPK, es posible que los efectos observados se deban a la inhibición de la activación de esta enzima por parte del ácido fenofibrico. Analizando los resultados de estos experimentos, y dada la importancia de TAK1 como proteína activadora de la AMPK en procesos inflamatorios, es probable que el ácido fenofibrico esté actuando sobre esta quinasa para bloquear la fosforilación de la AMPK en células ARPE-19. Será

necesaria la realización de nuevos experimentos para determinar el papel de TAK1 en la regulación de la AMPK en el RPE y evaluar su posible modulación por el fenofibrato .

EFFECTO DEL FENOFIBRATO SOBRE LA SÍNTESIS DE COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

Otra de las lesiones características de la DR es el exceso de síntesis de componentes de la matriz extracelular de la retina y el consiguiente engrosamiento de la membrana basal. Este tipo de alteraciones ocurren en las primeras etapas de la diabetes y son detectables antes de que se observen lesiones morfológicas propias de la DR. La membrana basal es un componente muy importante de la BHR ya que participa en la regulación de la permeabilidad de la microvasculatura (BHR interna) y del RPE (BHR externa). Por este motivo, cualquier desequilibrio del balance entre la síntesis y la degradación de componentes de la matriz extracelular puede traducirse en una alteración de la permeabilidad. Se sabe que los cambios en la composición de la membrana basal, el depósito de lípidos, la formación de AGEs o el estrés oxidativo, afectan al fenotipo celular del RPE¹⁸⁶. Existen estudios previos realizados en células endoteliales de retina de rata, en los que se demuestra que la hiperglicemia induce la sobreexpresión de componentes de la membrana basal provocando un aumento de la permeabilidad vascular²⁷². Cuando se normaliza la expresión de dichos componentes se observa una disminución de la permeabilidad de los vasos sanguíneos de la retina y una reducción de la pérdida de pericitos, evitando así la formación de capilares acelulares³⁵⁰⁻³⁵². El engrosamiento de la membrana basal, debido a la sobreexpresión de sus componentes, se ha relacionado con un aumento de permeabilidad y con la rotura de la BHR interna en pacientes diabéticos, pero no existen estudios de este tipo realizados en la BHR externa. Únicamente se ha demostrado en estudios previos que la fibronectina y el colágeno IV se localizan en la membrana basal del RPE y que dicha membrana puede aumentar su grosor debido al envejecimiento y a la formación de productos avanzados de la glicación³⁵³⁻³⁵⁵.

También hemos realizado estudios en colaboración con el grupo del Prof. Sayon Roy (Departamento de Medicina. Universidad de Boston) para examinar el efecto del medio diabético sobre la síntesis de estos dos componentes de la membrana basal, fibronectina y colágeno IV, y sus consecuencias sobre la permeabilidad del RPE. Los resultados de estos experimentos se detallan en el anexo de esta tesis. Para llevar a cabo estos experimentos utilizamos las mismas condiciones de cultivo y la misma composición del medio diabético que en los experimentos anteriores expuestos en el capítulo II. Del mismo modo que ocurre en la BHR interna, tanto la hiperglicemia por sí sola como la combinación de hiperglicemia más IL-1 β produjo una sobreexpresión de fibronectina y colágeno IV en los cultivos de células ARPE-19. También evaluamos el efecto del tratamiento con ácido fenofibríco sobre el incremento de la síntesis de fibronectina y colágeno IV, para determinar si los efectos beneficiosos de este fármaco en la prevención del DME también podían estar relacionados con una prevención del engrosamiento de la membrana basal y una reducción de la sobreexpresión de sus componentes. El tratamiento de las células ARPE-19 con 100 μ M de ácido fenofibríco redujo significativamente la sobreexpresión de fibronectina y colágeno IV inducida por la hiperglicemia y por la combinación de ésta con IL-1 β . Además el tratamiento con ácido fenofibríco redujo significativamente y de manera dosis-dependiente el aumento de permeabilidad inducido por el medio diabético. Los estudios de inmunohistoquímica demostraron que la hiperglicemia combinada con la IL-1 β producía una disrupción de la monocapa de células ARPE-19 y un aumento de la producción de fibronectina y colágeno IV por parte de estas células. Sin embargo, después del tratamiento con ácido fenofibríco se observó una reducción de la síntesis de estos componentes de la matriz extracelular y un mantenimiento de la distribución y estructura de las TJ sin verse afectado el contenido de las mismas. Estos experimentos confirman los resultados expuestos en el capítulo II de esta tesis, en los que se demostró que el principal factor implicado en la regulación de la permeabilidad del RPE era la correcta distribución de las TJ y no el contenido neto de éstas. Nuestro estudio nos demuestra que el ácido fenofibríco ejerce un importante efecto en la regulación de la sobreexpresión de fibronectina y colágeno IV, normalizando la síntesis de los componentes de la matriz extracelular. Este mecanismo, junto a su capacidad para evitar la disrupción de las proteínas de TJ y su contribución al mantenimiento de la estructura y funcionalidad de la monocapa del RPE,

podrían explicar la eficacia de este fármaco en la prevención de la progresión del DME y la DR observada en los estudios FIELD y ACCORD.

Existen estudios previos en otros tipos celulares en los que se ha observado que las citoquinas proinflamatorias estimulan la síntesis de componentes de la membrana basal. En el caso de las células humanas de la musculatura lisa vascular y en células mesoteliales del peritoneo se ha observado como el tratamiento con IL-1 β produce un aumento en la expresión de fibronectina y colágeno^{356,357}. En el caso de la DR, la elevada concentración de citoquinas proinflamatorias estimulan la sobreexpresión de los componentes de la membrana basal y su engrosamiento, produciendo un aumento de la permeabilidad y favoreciendo la rotura de la BHR. Se ha demostrado experimentalmente que la regulación de la síntesis de los componentes de la matriz extracelular y la disminución de su grosor son dos factores importantes en la prevención de la apoptosis y el incremento de permeabilidad asociado con la DR^{350,358}. La reducción de la síntesis de fibronectina y colágeno IV tras el tratamiento con ácido fenofibrato observada en nuestro estudio, coincide con los resultados obtenidos en investigaciones previas en otros tejidos. Así, en experimentos realizados con ratas a las que se les indujo la diabetes con una inyección de estreptozotocina, se observó una disminución de la acumulación de componentes de la matriz extracelular en el córtex renal después del tratamiento con fenofibrato³⁵⁹. Los mismos resultados se obtuvieron en riñones de ratas hipertensas tras el tratamiento con dicho fármaco³⁶⁰. Los mecanismos exactos a través de los cuales el ácido fenofibrato regula la expresión de los componentes de la matriz extracelular no se conocen. En ratones se ha demostrado que el ácido fenofibrato, mediante la activación de los factores de transcripción PPAR- α , regula la remodelación de la matriz extracelular a través de la inhibición de las MMPs³⁶¹. Existen otros estudios en los que se ha observado que el tratamiento con fenofibrato inhibe el estrés oxidativo y la vía de señalización de las MAPK, disminuyendo los niveles de TGF- β y evitando la acumulación de componentes de la matriz extracelular³⁶⁰. La regulación de la síntesis de estos componentes y la reducción de su engrosamiento son factores muy importantes para el mantenimiento de la integridad estructural de la membrana basal de la microvasculatura y del RPE.

A lo largo de esta tesis doctoral hemos profundizado en los mecanismos patogénicos implicados en el DME y la DR para contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Los tratamientos actuales para la DR y el DME, como la fotocoagulación con láser, la inyección de corticosteroides intravítreos y de antagonistas del VEGF y la vitrectomía, sólo están indicados en etapas avanzadas de la enfermedad y presentan numerosos efectos adversos. Además, su efectividad es limitada y tienen un elevado coste económico. Por este motivo es necesario el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas que se puedan aplicar en las etapas iniciales de la enfermedad, para prevenir su evolución y reducir la carga socio-económica de esta complicación de la diabetes. Los resultados obtenidos en los estudios clínicos FIELD y ACCORD-Eye, realizados en un total de 11,388 pacientes con DM tipo 2, demuestran como el tratamiento con fenofibrato reduce el riesgo de desarrollo y progresión de la DR. Según estos datos el tratamiento con fenofibrato podría ser una buena opción terapéutica en pacientes diabéticos en las primeras etapas de la DR para retrasar su evolución y en pacientes sin DR para prevenir su desarrollo. La falta de conocimiento de los mecanismos de acción específicos del fenofibrato en el contexto de la DR y el DME es una limitación para la indicación de este fármaco para la DR en la práctica clínica. En esta tesis hemos contribuido a ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de acción del fenofibrato en la BHR externa para poder explicar sus efectos beneficiosos observados en los estudios clínicos en pacientes con DR y DME. Hemos descrito por primera vez en células de RPE humano que el tratamiento con ácido fenofíbrico ejerce un efecto protector dosis-dependiente, previniendo el aumento de permeabilidad y la disrupción de las TJ inducida por el medio diabético. Los efectos protectores del ácido fenofíbrico sobre el RPE son mediados a través de la inhibición de la fosforilación de la AMPK, que se encuentra activa en pacientes diabéticos por causa de la hiperglicemia y la inflamación. Además de estos efectos, el ácido fenofíbrico previene la sobreexpresión de fibronectina y colágeno IV, dos componentes importantes de la membrana basal del RPE, evitando su engrosamiento y por tanto, su contribución al aumento de permeabilidad de la BHR externa. En la bibliografía se han descrito otros mecanismos potenciales de acción para el fenofibrato en la DR, como antioxidante, antiinflamatorio, antiapoptótico, antiangiogénico y neuroprotector. La amplia acción terapéutica de este fármaco supone una ventaja debido a que actúa sobre diferentes vías implicadas en la patogénesis de la DR. Es necesario continuar

profundizando en el estudio de los mecanismos de acción específicos del fenofibrato, para poder determinar cuando utilizar este fármaco en la prevención de la aparición y la progresión de la DR.

CONCLUSIONES

1. La hiperglicemia por sí sola no es el factor responsable de la alteración de la BHR externa en la DR. Es la combinación de los diferentes factores presentes en el medio diabético quien aumenta la permeabilidad del RPE y altera su estructura y organización.
2. La combinación de hiperglicemia e IL-1 β produce en los cultivos de células ARPE-19 una lesión similar a la observada en el RPE de los pacientes diabéticos.
3. El tratamiento con IL-1 β estimula la activación de la AMPK en las células ARPE-19 provocando un aumento de permeabilidad y la disrupción de las TJ.
4. El aumento de permeabilidad observado en el RPE se debe a la alteración en la distribución de las proteínas de TJ y no a cambios en el contenido neto de éstas.
5. El ácido fenofíbrico, el metabolito activo del fenofibrato, ejerce un importante efecto protector sobre el RPE evitando el aumento de permeabilidad inducido por el medio diabético.
6. El ácido fenofíbrico previene la disrupción de las TJ provocada por el medio diabético, favoreciendo el mantenimiento de la estructura y organización de las uniones celulares.
7. Los efectos del tratamiento con ácido fenofíbrico sobre el RPE son dosis-dependientes.
8. Los efectos beneficiosos del ácido fenofíbrico sobre el RPE se deben a su capacidad para bloquear la activación de la AMPK inducida por la IL-1 β .
9. Los efectos beneficiosos del tratamiento con ácido fenofíbrico sobre el mantenimiento de la estructura y la funcionalidad del RPE, corroboran la importancia de este fármaco en la prevención de la progresión del DME y la DR observada en los estudios FIELD y ACCORD.

CONCLUSIONES

10. El tratamiento con fenofibrato promete ser una buena opción terapéutica para prevenir la aparición de DR y para retasar su evolución en pacientes diabéticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia*. 2012;55(1):88-93.
2. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol*. 1984;102(4):520-526.
3. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XV. The long-term incidence of macular edema. *Ophthalmology*. 1995;102(1):7-16.
4. Aliseda Pérez de Madrid D, Berástegui I. Diabetic retinopathy. *An Sist Sanit Navar*. 2008;31 Suppl 3:23-34.
5. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-820.
6. Hernández C, Simó R. Strategies for blocking angiogenesis in diabetic retinopathy: from basic science to clinical practice. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007;16(8):1209-1226.
7. Villarroel M, Ciudin A, Hernández C, Simó R. Neurodegeneration: An early event of diabetic retinopathy. *World J Diabetes*. 2010;1(2):57-64.
8. Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest*. 1998;102(4):783-791.
9. Simó R, Hernández C, (EUROCONDOR) ECftEToDR. Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(1):23-33.
10. Barber AJ. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27(2):283-290.
11. Simó R, Hernández C, (EUROCONDOR) ECftEToDR. Neurodegeneration is an early event in diabetic retinopathy: therapeutic implications. *Br J Ophthalmol*. 2012;96(10):1285-1290.
12. Giardino I, Brownlee M. The biochemical basis of microvascular disease. In: Pickup J, Williams G, eds. *Textbook of Diabetes*. Oxford, UK: Blackwell Science; 1997:42.41-42.16.
13. Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C. Clinical Phenotypes of Diabetic Retinopathy. In: Tombran-Tink J, Barnstable C, Gardner T, eds. *Visual Dysfunction in Diabetes*. London: Humana Press; 2012:53-68.
14. Forrester JV, Knott RM. The pathogenesis of diabetic retinopathy and cataract. In: Pickup J, Williams G, eds. *Textbook of diabetes*. Vol 2. Oxford: Blackwell Science; 1997:45.41-45.19.
15. Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA. An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(12):4544-4548.
16. Arjamaa O, Nikinmaa M. Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors. *Exp Eye Res*. 2006;83(3):473-483.
17. Simó R, Carrasco E, García-Ramírez M, Hernández C. Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev*. 2006;2(1):71-98.

18. Spranger J, Osterhoff M, Reimann M, et al. Loss of the antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease. *Diabetes*. 2001;50(12):2641-2645.
19. Ogata N, Tombran-Tink J, Nishikawa M, et al. Pigment epithelium-derived factor in the vitreous is low in diabetic retinopathy and high in rhegmatogenous retinal detachment. *Am J Ophthalmol*. 2001;132(3):378-382.
20. Bhagat N, Grigorian RA, Tutela A, Zarbin MA. Diabetic macular edema: pathogenesis and treatment. *Surv Ophthalmol*. 2009;54(1):1-32.
21. Ascaso FJ, Huerva V, Grzybowski A. The role of inflammation in the pathogenesis of macular edema secondary to retinal vascular diseases. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:432685.
22. Ciulla TA, Amador AG, Zinman B. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema: pathophysiology, screening, and novel therapies. *Diabetes Care*. 2003;26(9):2653-2664.
23. Ehrlich R, Harris A, Ciulla TA, Kheradiya N, Winston DM, Wirostko B. Diabetic macular oedema: physical, physiological and molecular factors contribute to this pathological process. *Acta Ophthalmol*. 2010;88(3):279-291.
24. Andonegui J, Jiménez Lasanta L. Diabetic macular edema. *An Sist Sanit Navar*. 2008;31(Suppl 3):35-44.
25. Soliman W, Sander B, Jørgensen TM. Enhanced optical coherence patterns of diabetic macular oedema and their correlation with the pathophysiology. *Acta Ophthalmol Scand*. 2007;85(6):613-617.
26. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993;329(14):977-986.
27. UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*. 1998;352(9131):837-853.
28. Chew EY, Klein ML, Ferris FL, et al. Association of elevated serum lipid levels with retinal hard exudate in diabetic retinopathy. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) Report 22. *Arch Ophthalmol*. 1996;114(9):1079-1084.
29. van Leiden HA, Dekker JM, Moll AC, et al. Blood pressure, lipids, and obesity are associated with retinopathy: the hoorn study. *Diabetes Care*. 2002;25(8):1320-1325.
30. Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2004;364(9435):685-696.
31. Keech AC, Mitchell P, Summanen PA, et al. Effect of fenofibrate on the need for laser treatment for diabetic retinopathy (FIELD study): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;370(9600):1687-1697.
32. Chew EY, Ambrosius WT, Davis MD, et al. Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2010;363(3):233-244.

33. Early Treatment for Diabetic Retinopathy Study Research Group. Photocoagulation for diabetic macular edema. ETDRS report nº1. *Arch Ophthalmol.* 1985;103:1796-1806.
34. Early Treatment for Diabetic Retinopathy Study Research Group. Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report nº9. *Ophthalmology.* 1991;98(Suppl 5):766-785.
35. Diabetic Retinopathy Study (DRS) Research Group. Preliminary report on the effects of photocoagulation therapy. DRS report nº1. *Am J Ophthalmol.* 1976;81:383-396.
36. Diabetic Retinopathy Study (DRS) Research Group. Indications for photocoagulation treatment of diabetic retinopathy. DRS report nº14. *Int Ophthalmol Clin.* 1987;27(4):239-253.
37. Cunningham ET, Adamis AP, Altaweel M, et al. A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2005;112(10):1747-1757.
38. Adamis AP, Altaweel M, Bressler NM, et al. Changes in retinal neovascularization after pegaptanib (Macugen) therapy in diabetic individuals. *Ophthalmology.* 2006;113(1):23-28.
39. Sultan MB, Zhou D, Loftus J, Dombi T, Ice KS, Group MS. A phase 2/3, multicenter, randomized, double-masked, 2-year trial of pegaptanib sodium for the treatment of diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2011;118(6):1107-1118.
40. Massin P, Bandello F, Garweg JG, et al. Safety and efficacy of ranibizumab in diabetic macular edema (RESOLVE Study): a 12-month, randomized, controlled, double-masked, multicenter phase II study. *Diabetes Care.* 2010;33(11):2399-2405.
41. Nguyen QD, Shah SM, Khwaja AA, et al. Two-year outcomes of the ranibizumab for edema of the macula in diabetes (READ-2) study. *Ophthalmology.* 2010;117(11):2146-2151.
42. Mitchell P, Bandello F, Schmidt-Erfurth U, et al. The RESTORE study: ranibizumab monotherapy or combined with laser versus laser monotherapy for diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2011;118(4):615-625.
43. Nguyen QD, Brown DM, Marcus DM, et al. Ranibizumab for diabetic macular edema: results from 2 phase III randomized trials: RISE and RIDE. *Ophthalmology.* 2012;119(4):789-801.
44. Mason JO, Nixon PA, White MF. Intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) as adjunctive treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 2006;142(4):685-688.
45. Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology.* 2006;113(10):1695.e1691-1615.
46. Arevalo JF, Sanchez JG, Wu L, et al. Primary intravitreal bevacizumab for diffuse diabetic macular edema: the Pan-American Collaborative Retina Study Group at 24 months. *Ophthalmology.* 2009;116(8):1488-1497, 1497.e1481.
47. Haritoglou C, Kook D, Neubauer A, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) therapy for persistent diffuse diabetic macular edema. *Retina.* 2006;26(9):999-1005.

48. Kook D, Wolf A, Kreutzer T, et al. Long-term effect of intravitreal bevacizumab (avastin) in patients with chronic diffuse diabetic macular edema. *Retina*. 2008;28(8):1053-1060.
49. Soheilian M, Ramezani A, Obudi A, et al. Randomized trial of intravitreal bevacizumab alone or combined with triamcinolone versus macular photocoagulation in diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2009;116(6):1142-1150.
50. Rajendram R, Fraser-Bell S, Kaines A, et al. A 2-year prospective randomized controlled trial of intravitreal bevacizumab or laser therapy (BOLT) in the management of diabetic macular edema: 24-month data: report 3. *Arch Ophthalmol*. 2012;130(8):972-979.
51. Simó R, Hernández C. Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: hopes and fears for a new therapeutic strategy. *Diabetologia*. 2008;51(9):1574-1580.
52. Steinbrook R. The price of sight--ranibizumab, bevacizumab, and the treatment of macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006;355(14):1409-1412.
53. Stewart MW. Aflibercept (VEGF Trap-eye): the newest anti-VEGF drug. *Br J Ophthalmol*. 2012;96(9):1157-1158.
54. Do DV, Nguyen QD, Boyer D, et al. One-year outcomes of the da Vinci Study of VEGF Trap-Eye in eyes with diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2012;119(8):1658-1665.
55. Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. A randomized trial comparing intravitreal triamcinolone acetonide and focal/grid photocoagulation for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2008;115(9):1447-1459.
56. Brooks HL, Caballero S, Newell CK, et al. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1 in patients with diabetic retinopathy and cystoid macular edema before and after intraocular injection of triamcinolone. *Arch Ophthalmol*. 2004;122(12):1801-1807.
57. Amsterdam A, Tajima K, Sasson R. Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(5-6):843-850.
58. Itakura H, Akiyama H, Hagimura N, et al. Triamcinolone acetonide suppresses interleukin-1 beta-mediated increase in vascular endothelial growth factor expression in cultured rat Müller cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2006;244(2):226-231.
59. Sutter FK, Simpson JM, Gillies MC. Intravitreal triamcinolone for diabetic macular edema that persists after laser treatment: three-month efficacy and safety results of a prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical trial. *Ophthalmology*. 2004;111(11):2044-2049.
60. Pearson PA, Comstock TL, Ip M, et al. Fluocinolone acetonide intravitreal implant for diabetic macular edema: a 3-year multicenter, randomized, controlled clinical trial. *Ophthalmology*. 2011;118(8):1580-1587.
61. Campochiaro PA, Hafiz G, Shah SM, et al. Sustained ocular delivery of fluocinolone acetonide by an intravitreal insert. *Ophthalmology*. 2010;117(7):1393-1399.e1393.
62. Campochiaro PA, Brown DM, Pearson A, et al. Long-term benefit of sustained-delivery fluocinolone acetonide vitreous inserts for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2011;118(4):626-635.e622.

63. Haller JA, Kuppermann BD, Blumenkranz MS, et al. Randomized controlled trial of an intravitreal dexamethasone drug delivery system in patients with diabetic macular edema. *Arch Ophthalmol*. 2010;128(3):289-296.
64. Boyer DS, Faber D, Gupta S, et al. Dexamethasone intravitreal implant for treatment of diabetic macular edema in vitrectomized patients. *Retina*. 2011;31(5):915-923.
65. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998;47(6):859-866.
66. Xia P, Aiello LP, Ishii H, et al. Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *J Clin Invest*. 1996;98(9):2018-2026.
67. Young TA, Wang H, Munk S, et al. Vascular endothelial growth factor expression and secretion by retinal pigment epithelial cells in high glucose and hypoxia is protein kinase C-dependent. *Exp Eye Res*. 2005;80(5):651-662.
68. Harhaj NS, Felinski EA, Wolpert EB, Sundstrom JM, Gardner TW, Antonetti DA. VEGF activation of protein kinase C stimulates occludin phosphorylation and contributes to endothelial permeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(11):5106-5115.
69. Aiello LP, Bursell SE, Clermont A, et al. Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor. *Diabetes*. 1997;46(9):1473-1480.
70. Aiello LP, Vignati L, Sheetz MJ, et al. Oral Protein Kinase C β inhibition using ruboxistaurin: efficacy, safety, and causes of vision loss among 813 patients (1,392 eyes) with diabetic retinopathy in the Protein Kinase C β Inhibitor-Diabetic Retinopathy Study and the Protein Kinase C β Inhibitor-Diabetic Retinopathy Study 2. *Retina*. 2011;31(10):2084-2094.
71. Simó R, Lecube A, Sararols L, et al. Deficit of somatostatin-like immunoreactivity in the vitreous fluid of diabetic patients: possible role in the development of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2002;25(12):2282-2286.
72. Simó R, Carrasco E, Fonollosa A, García-Arumí J, Casamitjana R, Hernández C. Deficit of somatostatin in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema. *Diabetes Care*. 2007;30(3):725-727.
73. Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C, et al. The efficacy of octreotide in the therapy of severe nonproliferative and early proliferative diabetic retinopathy: a randomized controlled study. *Diabetes Care*. 2000;23(4):504-509.
74. Boehm BO, Lang GK, Jehle PM, Feldman B, Lang GE. Octreotide reduces vitreous hemorrhage and loss of visual acuity risk in patients with high-risk proliferative diabetic retinopathy. *Horm Metab Res*. 2001;33(5):300-306.
75. Hernández C, García-Ramírez M, Corraliza L, et al. Topical administration of somatostatin prevents retinal neurodegeneration in experimental diabetes. *Diabetes*. 2013;62(7):2569-2578.
76. Hernández C, Simó R, (EUROCONDOR) ECftEToDR. Somatostatin replacement: a new strategy for treating diabetic retinopathy. *Curr Med Chem*. 2013;20(26):3251-3257.

77. Mannermaa E, Vellonen KS, Urtti A. Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(11):1136-1163.
78. Frey T, Antonetti DA. Alterations to the blood-retinal barrier in diabetes: cytokines and reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(5):1271-1284.
79. Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK, et al. Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes.* 2006;55(9):2401-2411.
80. Simó R, Villarroel M, Corraliza L, Hernández C, Garcia-Ramírez M. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:190724.
81. Stone J, Dreher Z. Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol.* 1987;255(1):35-49.
82. Gardner TW, Antonetti DA, Barber AJ, LaNoue KF, Nakamura M. New insights into the pathophysiology of diabetic retinopathy: potential cell-specific therapeutic targets. *Diabetes Technol Ther.* 2000;2(4):601-608.
83. Henkind P, Hansen R, Szalay J. Ocular circulation. In: Records R, ed. *Physiology of the human eye and visual system.* New York: Harper & Row; 1979:98-155.
84. Goldmann EE. Vitalbarfung am Zentralnervensystem. *Abhandl. Konigl. Preuss Akad. Wiss.* . 1913;1:1-60.
85. Bailliard P. *Affections vasculaires de la rétine.* Paris: G Doin; 1953.
86. Ashton N, Cunha-Vaz JG. Effect of histamine on the permeability of the ocular vessels. *Arch Ophthalmol.* 1965;73:211-223.
87. Cunha-Vaz JG. Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. 3. Breakdown of the blood-retinal barrier by circulatory disturbances. *Br J Ophthalmol.* 1966;50(9):505-516.
88. Cunha-Vaz JG, Shakib M, Ashton N. Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. I. On the existence, development, and site of a blood-retinal barrier. *Br J Ophthalmol.* 1966;50(8):441-453.
89. Cunha-Vaz JG, Maurice DM. The active transport of fluorescein by the retinal vessels and the retina. *J Physiol.* 1967;191(3):467-486.
90. Hosoya K, Tomi M, Tachikawa M. Strategies for therapy of retinal diseases using systemic drug delivery: relevance of transporters at the blood-retinal barrier. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011;8(12):1571-1587.
91. Cunha-Vaz JG. The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):715-721.
92. Erickson KK, Sundstrom JM, Antonetti DA. Vascular permeability in ocular disease and the role of tight junctions. *Angiogenesis.* 2007;10(2):103-117.
93. 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.
94. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell.* 2011;21(2):193-215.
95. Fletcher EL, Downie LE, Ly A, et al. A review of the role of glial cells in understanding retinal disease. *Clin Exp Optom.* 2008;91(1):67-77.

96. Wisniewska-Kruk J, Hoeben KA, Vogels IM, et al. A novel co-culture model of the blood-retinal barrier based on primary retinal endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Exp Eye Res.* 2012;96(1):181-190.
97. Tomi M, Hosoya K. The role of blood-ocular barrier transporters in retinal drug disposition: an overview. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010;6(9):1111-1124.
98. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 2005;85(3):845-881.
99. Steinberg RH. Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Doc Ophthalmol.* 1985;60(4):327-346.
100. Hamann S. Molecular mechanisms of water transport in the eye. *Int Rev Cytol.* 2002;215:395-431.
101. Marmorstein AD. The polarity of the retinal pigment epithelium. *Traffic.* 2001;2(12):867-872.
102. Rizzolo LJ. Polarization of the Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase in epithelia derived from the neuroepithelium. *Int Rev Cytol.* 1999;185:195-235.
103. Miller SS, Steinberg RH. Active transport of ions across frog retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res.* 1977;25(3):235-248.
104. Miller SS, Steinberg RH. Passive ionic properties of frog retinal pigment epithelium. *J Membr Biol.* 1977;36(4):337-372.
105. Hamann S, Zeuthen T, La Cour M, et al. Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1-5 in human and rat eye. *Am J Physiol.* 1998;274(5 Pt 1):C1332-1345.
106. Stamer WD, Bok D, Hu J, Jaffe GJ, McKay BS. Aquaporin-1 channels in human retinal pigment epithelium: role in transepithelial water movement. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(6):2803-2808.
107. Verkman AS, Ruiz-Ederra J, Levin MH. Functions of aquaporins in the eye. *Prog Retin Eye Res.* 2008;27(4):420-433.
108. Ban Y, Rizzolo LJ. Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000;121(1):89-95.
109. Bergersen L, Jóhannsson E, Veruki ML, et al. Cellular and subcellular expression of monocarboxylate transporters in the pigment epithelium and retina of the rat. *Neuroscience.* 1999;90(1):319-331.
110. Senanayake P, Calabro A, Hu JG, et al. Glucose utilization by the retinal pigment epithelium: evidence for rapid uptake and storage in glycogen, followed by glycogen utilization. *Exp Eye Res.* 2006;83(2):235-246.
111. Baehr W, Wu SM, Bird AC, Palczewski K. The retinoid cycle and retina disease. *Vision Res.* 2003;43(28):2957-2958.
112. Bazan NG, Gordon WC, Rodriguez de Turco EB. Docosahexaenoic acid uptake and metabolism in photoreceptors: retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process. *Adv Exp Med Biol.* 1992;318:295-306.
113. Mukherjee PK, Marcheselli VL, Serhan CN, Bazan NG. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(22):8491-8496.
114. Girotti AW, Kriska T. Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2004;6(2):301-310.

115. Beatty S, Boulton M, Henson D, Koh HH, Murray IJ. Macular pigment and age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 1999;83(7):867-877.
116. Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. 2000;45(2):115-134.
117. Frank RN, Amin RH, Puklin JE. Antioxidant enzymes in the macular retinal pigment epithelium of eyes with neovascular age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 1999;127(6):694-709.
118. Tate DJ, Miceli MV, Newsome DA. Phagocytosis and H₂O₂ induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36(7):1271-1279.
119. Wright AF, Chakarova CF, Abd El-Aziz MM, Bhattacharya SS. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat Rev Genet*. 2010;11(4):273-284.
120. Wu Q, Blakeley LR, Cornwall MC, Crouch RK, Wiggert BN, Koutalos Y. Interphotoreceptor retinoid-binding protein is the physiologically relevant carrier that removes retinol from rod photoreceptor outer segments. *Biochemistry*. 2007;46(29):8669-8679.
121. Gonzalez-Fernandez F, Ghosh D. Focus on Molecules: interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP). *Exp Eye Res*. 2008;86(2):169-170.
122. Pepperberg DR, Okajima TL, Wiggert B, Ripps H, Crouch RK, Chader GJ. Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP). Molecular biology and physiological role in the visual cycle of rhodopsin. *Mol Neurobiol*. 1993;7(1):61-85.
123. Bosch E, Horwitz J, Bok D. Phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium: phagosome-lysosome interaction. *J Histochem Cytochem*. 1993;41(2):253-263.
124. Nguyen-Legros J, Hicks D. Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *Int Rev Cytol*. 2000;196:245-313.
125. Bok D. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci Suppl*. 1993;17:189-195.
126. Bibb C, Young RW. Renewal of fatty acids in the membranes of visual cell outer segments. *J Cell Biol*. 1974;61(2):327-343.
127. Tanihara H, Inatani M, Honda Y. Growth factors and their receptors in the retina and pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res*. 1997;16(2):271-301.
128. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*. 1999;285(5425):245-248.
129. King GL, Suzuma K. Pigment-epithelium-derived factor--a key coordinator of retinal neuronal and vascular functions. *N Engl J Med*. 2000;342(5):349-351.
130. Adamis AP, Shima DT, Yeo KT, et al. Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;193(2):631-638.
131. Lu M, Kuroki M, Amano S, et al. Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J Clin Invest*. 1998;101(6):1219-1224.

132. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22(1):1-29.
133. Wirostko B, Wong TY, Simó R. Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Prog Retin Eye Res.* 2008;27(6):608-621.
134. Sternfeld MD, Robertson JE, Shipley GD, Tsai J, Rosenbaum JT. Cultured human retinal pigment epithelial cells express basic fibroblast growth factor and its receptor. *Curr Eye Res.* 1989;8(10):1029-1037.
135. Bost LM, Aotaki-Keen AE, Hjelmeland LM. Coexpression of FGF-5 and bFGF by the retinal pigment epithelium in vitro. *Exp Eye Res.* 1992;55(5):727-734.
136. Bost LM, Aotaki-Keen AE, Hjelmeland LM. Cellular adhesion regulates bFGF gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res.* 1994;58(5):545-552.
137. Dunn KC, Marmorstein AD, Bonilha VL, Rodriguez-Boulan E, Giordano F, Hjelmeland LM. Use of the ARPE-19 cell line as a model of RPE polarity: basolateral secretion of FGF5. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(13):2744-2749.
138. Kvanta A. Expression and secretion of transforming growth factor-beta in transformed and nontransformed retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmic Res.* 1994;26(6):361-367.
139. Tanihara H, Yoshida M, Matsumoto M, Yoshimura N. Identification of transforming growth factor-beta expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34(2):413-419.
140. Martin DM, Yee D, Feldman EL. Gene expression of the insulin-like growth factors and their receptors in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 1992;12(1-3):181-186.
141. Slomiany MG, Rosenzweig SA. Autocrine effects of IGF-I-induced VEGF and IGFBP-3 secretion in retinal pigment epithelial cell line ARPE-19. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287(3):C746-753.
142. Cao W, Wen R, Li F, Lavail MM, Steinberg RH. Mechanical injury increases bFGF and CNTF mRNA expression in the mouse retina. *Exp Eye Res.* 1997;65(2):241-248.
143. Walsh N, Valter K, Stone J. Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina. *Exp Eye Res.* 2001;72(5):495-501.
144. Campochiaro PA, Hackett SF, Viores SA, et al. Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Sci.* 1994;107 (Pt 9):2459-2469.
145. Campochiaro PA, Sugg R, Grotendorst G, Hjelmeland LM. Retinal pigment epithelial cells produce PDGF-like proteins and secrete them into their media. *Exp Eye Res.* 1989;49(2):217-227.
146. Ahuja P, Caffé AR, Holmqvist I, et al. Lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) delays photoreceptor degeneration in explants of rd/rd mouse retina. *Neuroreport.* 2001;12(13):2951-2955.
147. Holtkamp GM, Kijlstra A, Peek R, de Vos AF. Retinal pigment epithelium-immune system interactions: cytokine production and cytokine-induced changes. *Prog Retin Eye Res.* 2001;20(1):29-48.

148. Wenkel H, Streilein JW. Evidence that retinal pigment epithelium functions as an immune-privileged tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(11):3467-3473.
149. Alexander JP, Bradley JM, Gabourel JD, Acott TS. Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31(12):2520-2528.
150. Padgett LC, Lui GM, Werb Z, LaVail MM. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: vectorial secretion and regulation. *Exp Eye Res.* 1997;64(6):927-938.
151. Eichler W, Friedrichs U, Thies A, Tratz C, Wiedemann P. Modulation of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression by cytokines in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(8):2767-2773.
152. Cao W, Tombran-Tink J, Chen W, Mrazek D, Elias R, McGinnis JF. Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurosci Res.* 1999;57(6):789-800.
153. Cao W, Tombran-Tink J, Elias R, Sezate S, Mrazek D, McGinnis JF. In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(7):1646-1652.
154. Ogata N, Wang L, Jo N, et al. Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. *Curr Eye Res.* 2001;22(4):245-252.
155. Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci.* 1995;108 (Pt 6):2369-2379.
156. Becerra SP, Fariss RN, Wu YQ, Montuenga LM, Wong P, Pfeffer BA. Pigment epithelium-derived factor in the monkey retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: apical secretion and distribution. *Exp Eye Res.* 2004;78(2):223-234.
157. Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, et al. Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol.* 1999;155(2):421-428.
158. Burgos R, Mateo C, Cantón A, Hernández C, Mesa J, Simó R. Vitreous levels of IGF-I, IGF binding protein 1, and IGF binding protein 3 in proliferative diabetic retinopathy: a case-control study. *Diabetes Care.* 2000;23(1):80-83.
159. Hernández C, Burgos R, Cantón A, García-Arumí J, Segura RM, Simó R. Vitreous levels of vascular cell adhesion molecule and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy: a case-control study. *Diabetes Care.* 2001;24(3):516-521.
160. Carrasco E, Hernández C, Miralles A, Huguet P, Farrés J, Simó R. Lower somatostatin expression is an early event in diabetic retinopathy and is associated with retinal neurodegeneration. *Diabetes Care.* 2007;30(11):2902-2908.
161. Johnson J, Rickman DW, Brecha NC. Somatostatin and somatostatin subtype 2A expression in the mammalian retina. *Microsc Res Tech.* 2000;50(2):103-111.

162. Helboe L, Møller M. Immunohistochemical localization of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2 in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40(10):2376-2382.
163. Klisovic DD, O'Dorisio MS, Katz SE, et al. Somatostatin receptor gene expression in human ocular tissues: RT-PCR and immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(10):2193-2201.
164. Cervia D, Casini G, Bagnoli P. Physiology and pathology of somatostatin in the mammalian retina: a current view. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;286(1-2):112-122.
165. Davis MI, Wilson SH, Grant MB. The therapeutic problem of proliferative diabetic retinopathy: targeting somatostatin receptors. *Horm Metab Res.* 2001;33(5):295-299.
166. Dal Monte M, Cammalleri M, Martini D, Casini G, Bagnoli P. Antiangiogenic role of somatostatin receptor 2 in a model of hypoxia-induced neovascularization in the retina: results from transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(8):3480-3489.
167. Wilson SH, Davis MI, Caballero S, Grant MB. Modulation of retinal endothelial cell behaviour by insulin-like growth factor I and somatostatin analogues: implications for diabetic retinopathy. *Growth Horm IGF Res.* 2001;11 Suppl A:S53-59.
168. van Hagen PM, Baarsma GS, Mooy CM, et al. Somatostatin and somatostatin receptors in retinal diseases. *Eur J Endocrinol.* 2000;143 Suppl 1:S43-51.
169. Johnson J, Caravelli ML, Brecha NC. Somatostatin inhibits calcium influx into rat rod bipolar cell axonal terminals. *Vis Neurosci.* 2001;18(1):101-108.
170. Vasilaki A, Gardette R, Epelbaum J, Thermos K. NADPH-diaphorase colocalization with somatostatin receptor subtypes sst2A and sst2B in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(7):1600-1609.
171. Akopian A, Johnson J, Gabriel R, Brecha N, Witkovsky P. Somatostatin modulates voltage-gated K(+) and Ca(2+) currents in rod and cone photoreceptors of the salamander retina. *J Neurosci.* 2000;20(3):929-936.
172. Hernández C, Simó-Servat O, Simó R. Somatostatin and diabetic retinopathy: current concepts and new therapeutic perspectives. *Endocrine.* 2014.
173. Hernández C, Fonollosa A, García-Ramírez M, et al. Erythropoietin is expressed in the human retina and it is highly elevated in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema. *Diabetes Care.* 2006;29(9):2028-2033.
174. García-Ramírez M, Hernández C, Simó R. Expression of erythropoietin and its receptor in the human retina: a comparative study of diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care.* 2008;31(6):1189-1194.
175. Becerra SP, Amaral J. Erythropoietin--an endogenous retinal survival factor. *N Engl J Med.* 2002;347(24):1968-1970.
176. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood.* 2003;102(4):1340-1346.
177. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res.* 2002;64(2):326-333.
178. Zhang J, Wu Y, Jin Y, et al. Intravitreal injection of erythropoietin protects both retinal vascular and neuronal cells in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(2):732-742.

179. Watanabe D, Suzuma K, Matsui S, et al. Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med.* 2005;353(8):782-792.
180. Tserentsoodol N, Gordiyenko NV, Pascual I, Lee JW, Fliesler SJ, Rodriguez IR. Intraretinal lipid transport is dependent on high density lipoprotein-like particles and class B scavenger receptors. *Mol Vis.* 2006;12:1319-1333.
181. Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis.* 1995;115(2):243-253.
182. Robbesyn F, Augé N, Vindis C, et al. High-density lipoproteins prevent the oxidized low-density lipoprotein-induced epidermal [corrected] growth factor receptor activation and subsequent matrix metalloproteinase-2 upregulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(6):1206-1212.
183. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res.* 1996;62(2):155-169.
184. Rizzolo LJ, Li ZQ. Diffusible, retinal factors stimulate the barrier properties of junctional complexes in the retinal pigment epithelium. *J Cell Sci.* 1993;106 (Pt 3):859-867.
185. Chang CW, Roque RS, Defoe DM, Caldwell RB. An improved method for isolation and culture of pigment epithelial cells from rat retina. *Curr Eye Res.* 1991;10(11):1081-1086.
186. Tian J, Ishibashi K, Handa JT. The expression of native and cultured RPE grown on different matrices. *Physiol Genomics.* 2004;17(2):170-182.
187. Garcia-Ramírez M, Villarroel M, Corraliza L, Hernández C, Simó R. Measuring permeability in human retinal epithelial cells (ARPE-19): implications for the study of diabetic retinopathy. *Methods Mol Biol.* 2011;763:179-194.
188. Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(3):225-236.
189. Matter K, Balda MS. Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 9):1505-1511.
190. Anderson JM, Van Itallie CM, Fanning AS. Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(2):140-145.
191. Dragsten PR, Blumenthal R, Handler JS. Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? *Nature.* 1981;294(5843):718-722.
192. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 1963;17:375-412.
193. Young B, Heath JW. *Wheater's Functional Histology.* 4th ed. London: Churchill Livingstone; 2000.
194. Balda MS, Matter K. Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.* 2003;13(6):310-318.
195. Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol.* 2007;127(11):2525-2532.
196. Harhaj NS, Antonetti DA. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(7):1206-1237.
197. Ablonczy Z, Crosson CE. VEGF modulation of retinal pigment epithelium resistance. *Exp Eye Res.* 2007;85(6):762-771.

198. Jin M, Barron E, He S, Ryan SJ, Hinton DR. Regulation of RPE intercellular junction integrity and function by hepatocyte growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(8):2782-2790.
199. Matter K, Balda MS. Functional analysis of tight junctions. *Methods.* 2003;30(3):228-234.
200. Claude P. Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol.* 1978;39(2-3):219-232.
201. Rizzolo LJ, Peng S, Luo Y, Xiao W. Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res.* 2011;30(5):296-323.
202. González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 2003;81(1):1-44.
203. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 1993;123(6 Pt 2):1777-1788.
204. Ando-Akatsuka Y, Saitou M, Hirase T, et al. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J Cell Biol.* 1996;133(1):43-47.
205. Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol.* 2008;130(1):55-70.
206. Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol.* 1994;127(6 Pt 1):1617-1626.
207. Huber D, Balda MS, Matter K. Occludin modulates transepithelial migration of neutrophils. *J Biol Chem.* 2000;275(8):5773-5778.
208. Andreeva AY, Krause E, Müller EC, Blasig IE, Utepbergenov DI. Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin. *J Biol Chem.* 2001;276(42):38480-38486.
209. Dörfel MJ, Westphal JK, Huber O. Differential phosphorylation of occludin and tricellulin by CK2 and CK1. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1165:69-73.
210. Cordenonsi M, Mazzon E, De Rigo L, Baraldo S, Meggio F, Citi S. Occludin dephosphorylation in early development of *Xenopus laevis*. *J Cell Sci.* 1997;110 (Pt 24):3131-3139.
211. Chen YH, Lu Q, Goodenough DA, Jeanson B. Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(4):1227-1237.
212. Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol.* 1997;137(6):1393-1401.
213. Blasig IE, Bellmann C, Cording J, et al. Occludin protein family: oxidative stress and reducing conditions. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(5):1195-1219.
214. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol.* 1998;143(2):391-401.
215. Phillips BE, Cancel L, Tarbell JM, Antonetti DA. Occludin independently regulates permeability under hydrostatic pressure and cell division in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(6):2568-2576.

216. Antonetti DA, Barber AJ, Khin S, Lieth E, Tarbell JM, Gardner TW. Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occludin content: vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells. Penn State Retina Research Group. *Diabetes*. 1998;47(12):1953-1959.
217. Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*. 1998;141(7):1539-1550.
218. Wen H, Watry DD, Marcondes MC, Fox HS. Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol Cell Biol*. 2004;24(19):8408-8417.
219. Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 12):2435-2447.
220. Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol*. 1999;147(6):1351-1363.
221. Overgaard CE, Daugherty BL, Mitchell LA, Koval M. Claudins: control of barrier function and regulation in response to oxidant stress. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(5):1179-1193.
222. Furuse M, Hata M, Furuse K, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*. 2002;156(6):1099-1111.
223. Günzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*. 2013;93(2):525-569.
224. Amasheh M, Fromm A, Krug SM, et al. TNFalpha-induced and berberine-antagonized tight junction barrier impairment via tyrosine kinase, Akt and NFkappaB signaling. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 23):4145-4155.
225. Aslam M, Ahmad N, Srivastava R, Hemmer B. TNF-alpha induced NFkB signaling and p65 (RelA) overexpression repress Cldn5 promoter in mouse brain endothelial cells. *Cytokine*. 2012;57(2):269-275.
226. Ota T, Fujii M, Sugizaki T, et al. Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol*. 2002;193(3):299-318.
227. Halder SK, Rachakonda G, Deane NG, Datta PK. Smad7 induces hepatic metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2008;99(6):957-965.
228. Martínez-Estrada OM, Cullerés A, Soriano FX, et al. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem J*. 2006;394(Pt 2):449-457.
229. French AD, Fiori JL, Camilli TC, et al. PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci*. 2009;6(2):93-101.
230. Fujibe M, Chiba H, Kojima T, et al. Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions. *Exp Cell Res*. 2004;295(1):36-47.
231. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*. 1986;103(3):755-766.

232. Willott E, Balda MS, Fanning AS, Jameson B, Van Itallie C, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 is homologous to the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(16):7834-7838.
233. Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(8):3460-3464.
234. Balda MS, Gonzalez-Mariscal L, Matter K, Cereijido M, Anderson JM. Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol. *J Cell Biol*. 1993;123(2):293-302.
235. Itoh M, Morita K, Tsukita S. Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem*. 1999;274(9):5981-5986.
236. Schmidt A, Utepbergenov DI, Mueller SL, et al. Occludin binds to the SH3-hinge-GuK unit of zonula occludens protein 1: potential mechanism of tight junction regulation. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(11):1354-1365.
237. Yamamoto T, Harada N, Kano K, et al. The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Biol*. 1997;139(3):785-795.
238. Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol*. 1997;138(1):181-192.
239. Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*. 1998;273(45):29745-29753.
240. Willott E, Balda MS, Heintzelman M, Jameson B, Anderson JM. Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1. *Am J Physiol*. 1992;262(5 Pt 1):C1119-1124.
241. Balda MS, Anderson JM. Two classes of tight junctions are revealed by ZO-1 isoforms. *Am J Physiol*. 1993;264(4 Pt 1):C918-924.
242. González-Mariscal L, Quirós M, Díaz-Coránguez M. ZO proteins and redox-dependent processes. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(5):1235-1253.
243. Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA, Wolpert EB, Gardner TW. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem*. 1999;274(33):23463-23467.
244. Stevenson BR, Anderson JM, Braun ID, Mooseker MS. Phosphorylation of the tight-junction protein ZO-1 in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. *Biochem J*. 1989;263(2):597-599.
245. Avila-Flores A, Rendón-Huerta E, Moreno J, et al. Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosphorylation by protein kinase C. *Biochem J*. 2001;360(Pt 2):295-304.
246. Balda MS, Anderson JM, Matter K. The SH3 domain of the tight junction protein ZO-1 binds to a serine protein kinase that phosphorylates a region C-terminal to this domain. *FEBS Lett*. 1996;399(3):326-332.

247. Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, et al. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell*. 2006;126(4):741-754.
248. Giebel SJ, Menicucci G, McGuire PG, Das A. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Lab Invest*. 2005;85(5):597-607.
249. Behzadian MA, Wang XL, Windsor LJ, Ghaly N, Caldwell RB. TGF-beta increases retinal endothelial cell permeability by increasing MMP-9: possible role of glial cells in endothelial barrier function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(3):853-859.
250. Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):774-785.
251. Hawley SA, Davison M, Woods A, et al. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1996;271(44):27879-27887.
252. McBride A, Ghilagaber S, Nikolaev A, Hardie DG. The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Metab*. 2009;9(1):23-34.
253. Scott JW, Hawley SA, Green KA, et al. CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest*. 2004;113(2):274-284.
254. Hardie DG. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev*. 2011;25(18):1895-1908.
255. Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, et al. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol*. 2003;2(4):28.
256. Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, et al. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab*. 2005;2(1):9-19.
257. Hurley RL, Anderson KA, Franzone JM, Kemp BE, Means AR, Witters LA. The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem*. 2005;280(32):29060-29066.
258. Woods A, Dickerson K, Heath R, et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab*. 2005;2(1):21-33.
259. Momcilovic M, Hong SP, Carlson M. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem*. 2006;281(35):25336-25343.
260. Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem*. 1995;229(2):558-565.
261. Brunmair B, Staniek K, Gras F, et al. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes*. 2004;53(4):1052-1059.
262. Fogarty S, Hardie DG. Development of protein kinase activators: AMPK as a target in metabolic disorders and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804(3):581-591.

263. Martin SG, St Johnston D. A role for *Drosophila* LKB1 in anterior-posterior axis formation and epithelial polarity. *Nature*. 2003;421(6921):379-384.
264. Baas AF, Kuipers J, van der Wel NN, et al. Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell*. 2004;116(3):457-466.
265. Lee JH, Koh H, Kim M, et al. Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature*. 2007;447(7147):1017-1020.
266. Zhang L, Li J, Young LH, Caplan MJ. AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(46):17272-17277.
267. Zheng B, Cantley LC. Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(3):819-822.
268. Scharl M, Paul G, Barrett KE, McCole DF. AMP-activated protein kinase mediates the interferon-gamma-induced decrease in intestinal epithelial barrier function. *J Biol Chem*. 2009;284(41):27952-27963.
269. Hogan MJ. Ultrastructure of the choroid. Its role in the pathogenesis of chorioretinal disease. *Trans Pac Coast Otoophthalmol Soc Annu Meet*. 1961;42:61-87.
270. Booi J, Baas DC, Beisekeeva J, Gorgels TG, Bergen AA. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog Retin Eye Res*. 2010;29(1):1-18.
271. Ashton N. Vascular changes in diabetes with particular reference to the retinal vessels; preliminary report. *Br J Ophthalmol*. 1949;33(7):407-420.
272. Chronopoulos A, Trudeau K, Roy S, Huang H, Vinos SA. High glucose-induced altered basement membrane composition and structure increases trans-endothelial permeability: implications for diabetic retinopathy. *Curr Eye Res*. 2011;36(8):747-753.
273. Hiscott P, Sheridan C, Magee RM, Grierson I. Matrix and the retinal pigment epithelium in proliferative retinal disease. *Prog Retin Eye Res*. 1999;18(2):167-190.
274. Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H, Kühn K. A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem*. 1981;120(2):203-211.
275. Roy S, Maiello M, Lorenzi M. Increased expression of basement membrane collagen in human diabetic retinopathy. *J Clin Invest*. 1994;93(1):438-442.
276. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(11):793-805.
277. Roy S, Cagliero E, Lorenzi M. Fibronectin overexpression in retinal microvessels of patients with diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(2):258-266.
278. Roy S, Ha J, Trudeau K, Beglova E. Vascular basement membrane thickening in diabetic retinopathy. *Curr Eye Res*. 2010;35(12):1045-1056.
279. Del Priore LV, Geng L, Tezel TH, Kaplan HJ. Extracellular matrix ligands promote RPE attachment to inner Bruch's membrane. *Curr Eye Res*. 2002;25(2):79-89.
280. Gong J, Sagiv O, Cai H, Tsang SH, Del Priore LV. Effects of extracellular matrix and neighboring cells on induction of human embryonic stem cells into retinal or retinal pigment epithelial progenitors. *Exp Eye Res*. 2008;86(6):957-965.

281. Crane IJ, Liversidge J. Mechanisms of leukocyte migration across the blood-retina barrier. *Semin Immunopathol.* 2008;30(2):165-177.
282. Studer RK, Craven PA, DeRubertis FR. Role for protein kinase C in the mediation of increased fibronectin accumulation by mesangial cells grown in high-glucose medium. *Diabetes.* 1993;42(1):118-126.
283. Kalfa TA, Gerritsen ME, Carlson EC, Binstock AJ, Tsilibary EC. Altered proliferation of retinal microvascular cells on glycated matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36(12):2358-2367.
284. Gardiner TA, Anderson HR, Stitt AW. Inhibition of advanced glycation end-products protects against retinal capillary basement membrane expansion during long-term diabetes. *J Pathol.* 2003;201(2):328-333.
285. Kuiper EJ, Hughes JM, Van Geest RJ, et al. Effect of VEGF-A on expression of profibrotic growth factor and extracellular matrix genes in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(9):4267-4276.
286. Kuiper EJ, van Zijderveld R, Roestenberg P, et al. Connective tissue growth factor is necessary for retinal capillary basal lamina thickening in diabetic mice. *J Histochem Cytochem.* 2008;56(8):785-792.
287. Evans T, Deng DX, Chen S, Chakrabarti S. Endothelin receptor blockade prevents augmented extracellular matrix component mRNA expression and capillary basement membrane thickening in the retina of diabetic and galactose-fed rats. *Diabetes.* 2000;49(4):662-666.
288. Gardiner TA, Anderson HR, Degenhardt T, et al. Prevention of retinal capillary basement membrane thickening in diabetic dogs by a non-steroidal anti-inflammatory drug. *Diabetologia.* 2003;46(9):1269-1275.
289. Robison WG, Kador PF, Kinoshita JH. Retinal capillaries: basement membrane thickening by galactosemia prevented with aldose reductase inhibitor. *Science.* 1983;221(4616):1177-1179.
290. Thorp JM, Waring WS. Modification of metabolism and distribution of lipids by ethyl chlorophenoxyisobutyrate. *Nature.* 1962;194:948-949.
291. Noonan JE, Jenkins AJ, Ma JX, Keech AC, Wang JJ, Lamoureux EL. An update on the molecular actions of fenofibrate and its clinical effects on diabetic retinopathy and other microvascular end points in patients with diabetes. *Diabetes.* 2013;62(12):3968-3975.
292. Keating GM. Fenofibrate: a review of its lipid-modifying effects in dyslipidemia and its vascular effects in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2011;11(4):227-247.
293. Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res.* 2005;51(2):85-94.
294. Treacy MP, Hurst TP. The case for intraocular delivery of PPAR agonists in the treatment of diabetic retinopathy. *BMC Ophthalmol.* 2012;12:46.
295. Ciudin A, Hernández C, Simó R. Molecular Implications of the PPARs in the Diabetic Eye. *PPAR Res.* 2013;2013:686525.
296. Filippatos T, Milionis HJ. Treatment of hyperlipidaemia with fenofibrate and related fibrates. *Expert Opin Investig Drugs.* 2008;17(10):1599-1614.
297. Simó R, García-Ramírez M, Higuera M, Hernández C. Apolipoprotein A1 is overexpressed in the retina of diabetic patients. *Am J Ophthalmol.* 2009;147(2):319-325.e311.

298. García-Ramírez M, Canals F, Hernández C, et al. Proteomic analysis of human vitreous fluid by fluorescence-based difference gel electrophoresis (DIGE): a new strategy for identifying potential candidates in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 2007;50(6):1294-1303.
299. Simó R, Roy S, Behar-Cohen F, Keech A, Mitchell P, Wong TY. Fenofibrate: a new treatment for diabetic retinopathy. Molecular mechanisms and future perspectives. *Curr Med Chem*. 2013;20(26):3258-3266.
300. Bordet R, Ouk T, Petrault O, et al. PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 6):1341-1346.
301. Bogdanov P, Corraliza L, A Villena J, et al. The db/db mouse: a useful model for the study of diabetic retinal neurodegeneration. *PLoS One*. 2014;9(5):e97302.
302. Bogdanov P, Hernández C, Corraliza L, Carvalho AR, Simó R. Effect of fenofibrate on retinal neurodegeneration in an experimental model of type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2014.
303. Arai K, Ikegaya Y, Nakatani Y, Kudo I, Nishiyama N, Matsuki N. Phospholipase A2 mediates ischemic injury in the hippocampus: a regional difference of neuronal vulnerability. *Eur J Neurosci*. 2001;13(12):2319-2323.
304. Murakami H, Murakami R, Kambe F, et al. Fenofibrate activates AMPK and increases eNOS phosphorylation in HUVEC. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341(4):973-978.
305. Zanetti M, Stocca A, Dapas B, et al. Inhibitory effects of fenofibrate on apoptosis and cell proliferation in human endothelial cells in high glucose. *J Mol Med (Berl)*. 2008;86(2):185-195.
306. Tomizawa A, Hattori Y, Inoue T, Hattori S, Kasai K. Fenofibrate suppresses microvascular inflammation and apoptosis through adenosine monophosphate-activated protein kinase activation. *Metabolism*. 2011;60(4):513-522.
307. Kim J, Ahn JH, Kim JH, et al. Fenofibrate regulates retinal endothelial cell survival through the AMPK signal transduction pathway. *Exp Eye Res*. 2007;84(5):886-893.
308. Miranda S, González-Rodríguez Á, García-Ramírez M, et al. Beneficial effects of fenofibrate in retinal pigment epithelium by the modulation of stress and survival signaling under diabetic conditions. *J Cell Physiol*. 2012;227(6):2352-2362.
309. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, et al. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem*. 1998;273(40):25573-25580.
310. Israelian-Konaraki Z, Reaven PD. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and atherosclerosis: from basic mechanisms to clinical implications. *Cardiol Rev*. 2005;13(5):240-246.
311. Koh KK, Quon MJ, Lim S, et al. Effects of fenofibrate therapy on circulating adipocytokines in patients with primary hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*. 2011;214(1):144-147.
312. Higuchi A, Ohashi K, Kihara S, Walsh K, Ouchi N. Adiponectin suppresses pathological microvessel formation in retina through modulation of tumor necrosis factor-alpha expression. *Circ Res*. 2009;104(9):1058-1065.

313. Garcia-Ramírez M, Hernández C, Palomer X, Vázquez-Carrera M, Simó R. Fenofibrate prevents the disruption of the outer blood retinal barrier through downregulation of NF- κ B activity. *Acta Diabetol.* 2015.
314. Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem.* 1999;274(45):32048-32054.
315. Staels B, Koenig W, Habib A, et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature.* 1998;393(6687):790-793.
316. Chen Y, Hu Y, Zhou T, et al. Activation of the Wnt pathway plays a pathogenic role in diabetic retinopathy in humans and animal models. *Am J Pathol.* 2009;175(6):2676-2685.
317. Meissner M, Stein M, Urbich C, et al. PPARalpha activators inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 expression by repressing Sp1-dependent DNA binding and transactivation. *Circ Res.* 2004;94(3):324-332.
318. Varet J, Vincent L, Mirshahi P, et al. Fenofibrate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(4):810-819.
319. Chen Y, Hu Y, Lin M, et al. Therapeutic effects of PPAR α agonists on diabetic retinopathy in type 1 diabetes models. *Diabetes.* 2013;62(1):261-272.
320. Keech A, Simes RJ, Barter P, et al. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet.* 2005;366(9500):1849-1861.
321. Simó R, Hernández C. Prevention and treatment of diabetic retinopathy: evidence from large, randomized trials. The emerging role of fenofibrate. *Rev Recent Clin Trials.* 2012;7(1):71-80.
322. Ansquer JC, Foucher C, Aubonnet P, Le Malicot K. Fibrates and microvascular complications in diabetes--insight from the FIELD study. *Curr Pharm Des.* 2009;15(5):537-552.
323. Simó R, Hernández C. Fenofibrate for diabetic retinopathy. *Lancet.* 2007;370(9600):1667-1668.
324. Morgan CL, Owens DR, Aubonnet P, et al. Primary prevention of diabetic retinopathy with fibrates: a retrospective, matched cohort study. *BMJ Open.* 2013;3(12):e004025.
325. Ginsberg HN, Elam MB, Lovato LC, et al. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2010;362(17):1563-1574.
326. Wong TY, Simó R, Mitchell P. Fenofibrate - a potential systemic treatment for diabetic retinopathy? *Am J Ophthalmol.* 2012;154(1):6-12.
327. Luo Y, Zhuo Y, Fukuhara M, Rizzolo LJ. Effects of culture conditions on heterogeneity and the apical junctional complex of the ARPE-19 cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(8):3644-3655.
328. Koskela UE, Kuusisto SM, Nissinen AE, Savolainen MJ, Liinamaa MJ. High vitreous concentration of IL-6 and IL-8, but not of adhesion molecules in relation to plasma concentrations in proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res.* 2013;49(2):108-114.
329. Zhou J, Wang S, Xia X. Role of intravitreal inflammatory cytokines and angiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res.* 2012;37(5):416-420.

330. Funatsu H, Noma H, Mimura T, Eguchi S, Hori S. Association of vitreous inflammatory factors with diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2009;116(1):73-79.
331. Tang J, Kern TS. Inflammation in diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*. 2011;30(5):343-358.
332. Hernández C, Segura RM, Fonollosa A, Carrasco E, Francisco G, Simó R. Interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and IL-10 in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabet Med*. 2005;22(6):719-722.
333. Elner SG, Elner VM, Jaffe GJ, Stuart A, Kunkel SL, Strieter RM. Cytokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *Curr Eye Res*. 1995;14(11):1045-1053.
334. Demircan N, Safran BG, Soylu M, Ozcan AA, Sizmaz S. Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye (Lond)*. 2006;20(12):1366-1369.
335. Chang CW, Ye L, Defoe DM, Caldwell RB. Serum inhibits tight junction formation in cultured pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(6):1082-1093.
336. Zech JC, Pouvreau I, Cotinet A, Goureau O, Le Varlet B, de Kozak Y. Effect of cytokines and nitric oxide on tight junctions in cultured rat retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(9):1600-1608.
337. Abe T, Sugano E, Saigo Y, Tamai M. Interleukin-1beta and barrier function of retinal pigment epithelial cells (ARPE-19): aberrant expression of junctional complex molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(9):4097-4104.
338. Miyamoto N, de Kozak Y, Jeanny JC, et al. Placental growth factor-1 and epithelial haemato-retinal barrier breakdown: potential implication in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 2007;50(2):461-470.
339. Holtkamp GM, Van Rossem M, de Vos AF, Willekens B, Peek R, Kijlstra A. Polarized secretion of IL-6 and IL-8 by human retinal pigment epithelial cells. *Clin Exp Immunol*. 1998;112(1):34-43.
340. Holtkamp GM, De Vos AF, Peek R, Kijlsta A. Analysis of the secretion pattern of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and transforming growth factor-beta 2 (TGF-beta2) by human retinal pigment epithelial cells. *Clin Exp Immunol*. 1999;118(1):35-40.
341. Luna JD, Chan CC, Derevjaniuk NL, et al. Blood-retinal barrier (BRB) breakdown in experimental autoimmune uveoretinitis: comparison with vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1beta-mediated breakdown. *J Neurosci Res*. 1997;49(3):268-280.
342. Chang MY, Ho FM, Wang JS, et al. AICAR induces cyclooxygenase-2 expression through AMP-activated protein kinase-transforming growth factor-beta-activated kinase 1-p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Biochem Pharmacol*. 2010;80(8):1210-1220.
343. Kim SY, Jeong S, Jung E, et al. AMP-activated protein kinase- α 1 as an activating kinase of TGF- β -activated kinase 1 has a key role in inflammatory signals. *Cell Death Dis*. 2012;3:e357.

344. Riboulet-Chavey A, Diraison F, Siew LK, Wong FS, Rutter GA. Inhibition of AMP-activated protein kinase protects pancreatic beta-cells from cytokine-mediated apoptosis and CD8+ T-cell-induced cytotoxicity. *Diabetes*. 2008;57(2):415-423.
345. Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, et al. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science*. 1995;270(5244):2008-2011.
346. Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*. 1999;398(6724):252-256.
347. Lee J, Mira-Arbibe L, Ulevitch RJ. TAK1 regulates multiple protein kinase cascades activated by bacterial lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol*. 2000;68(6):909-915.
348. Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, et al. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell*. 2000;5(4):649-658.
349. Herrero-Martín G, Høyer-Hansen M, García-García C, et al. TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. *EMBO J*. 2009;28(6):677-685.
350. Oshitari T, Polewski P, Chadda M, Li AF, Sato T, Roy S. Effect of combined antisense oligonucleotides against high-glucose- and diabetes-induced overexpression of extracellular matrix components and increased vascular permeability. *Diabetes*. 2006;55(1):86-92.
351. Roy S, Lorenzi M. Early biosynthetic changes in the diabetic-like retinopathy of galactose-fed rats. *Diabetologia*. 1996;39(6):735-738.
352. Cherian S, Roy S, Pinheiro A. Tight glycemic control regulates fibronectin expression and basement membrane thickening in retinal and glomerular capillaries of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(2):943-949.
353. Ishibashi T, Kohno T, Sorgente N, Patterson R, Ryan SJ. Fibronectin of the chorioretinal interface in the monkey: immunohistochemical and immunoelectron microscopic studies. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1985;223(3):158-163.
354. Karwatowski WS, Jeffries TE, Duance VC, Albon J, Bailey AJ, Easty DL. Preparation of Bruch's membrane and analysis of the age-related changes in the structural collagens. *Br J Ophthalmol*. 1995;79(10):944-952.
355. Ida H, Ishibashi K, Reiser K, Hjelmeland LM, Handa JT. Ultrastructural aging of the RPE-Bruch's membrane-choriocapillaris complex in the D-galactose-treated mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(7):2348-2354.
356. Forsyth EA, Aly HM, Neville RF, Sidawy AN. Proliferation and extracellular matrix production by human infragenicular smooth muscle cells in response to interleukin-1 beta. *J Vasc Surg*. 1997;26(6):1002-1007; discussion 1007-1008.
357. Yang WS, Kim BS, Lee SK, Park JS, Kim SB. Interleukin-1beta stimulates the production of extracellular matrix in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int*. 1999;19(3):211-220.
358. Roy S, Sato T, Paryani G, Kao R. Downregulation of fibronectin overexpression reduces basement membrane thickening and vascular lesions in retinas of galactose-fed rats. *Diabetes*. 2003;52(5):1229-1234.

359. Chen LL, Zhang JY, Wang BP. Renoprotective effects of fenofibrate in diabetic rats are achieved by suppressing kidney plasminogen activator inhibitor-1. *Vascul Pharmacol.* 2006;44(5):309-315.
360. Hou X, Shen YH, Li C, et al. PPARalpha agonist fenofibrate protects the kidney from hypertensive injury in spontaneously hypertensive rats via inhibition of oxidative stress and MAPK activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394(3):653-659.
361. Duhaney TA, Cui L, Rude MK, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent actions of fenofibrate exacerbates left ventricular dilation and fibrosis in chronic pressure overload. *Hypertension.* 2007;49(5):1084-1094.

ANEXO

Fenofibric Acid Reduces Fibronectin and Collagen Type IV Overexpression in Human Retinal Pigment Epithelial Cells Grown in Conditions Mimicking the Diabetic Milieu: Functional Implications in Retinal Permeability

Kyle Trudeau,^{1,2,3} Sumon Roy,^{1,2,3} Wen Guo,^{1,2} Cristina Hernández,^{4,5} Marta Villarroel,^{4,5} Rafael Simó,^{4,5} and Sayon Roy^{1,2}

PURPOSE. To determine whether fenofibric acid (FA) reduces high glucose (HG)-induced basement membrane component overexpression and hyperpermeability in human retinal pigment epithelial (RPE) cells.

METHODS. Retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) were cultured for 18 days in normal glucose (5 mM) or HG (25 mM) medium and studied for the effects of FA on fibronectin (FN) and collagen IV (Coll IV) expression. During last 3 days of the experiment, 100 μ M FA was added to cells grown in HG medium or in HG medium plus IL-1 β (HG + IL-1 β) to mimic, at least in part, the inflammatory aspect of the diabetic milieu. Real-time RT-PCR was performed to determine FN and Coll IV mRNA levels, whereas protein levels were assessed by Western blot analyses. Cell monolayer morphology and barrier function were analyzed by confocal microscopy using specific antibodies against tight junction proteins, ZO-1, and claudin-1 and by measuring apical-basolateral movements of FITC-dextran, respectively.

RESULTS. FN and Coll IV expression were significantly increased in RPE cells grown in HG or HG + IL-1 β medium compared with cells grown in normal medium. When cells grown in HG or HG + IL-1 β medium were treated with FA, significant reductions in FN and Coll IV expression were observed. In addition, exposure to FA decreased excess permeability in a dose-dependent manner in cells grown in HG + IL-1 β medium. This effect was unrelated to changes in tight junction protein content.

CONCLUSIONS. Findings from this study suggest that the down-regulation of basement membrane components by FA may

have a protective effect against outer blood-retinal barrier leakage associated with diabetic retinopathy. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:6348–6354) DOI:10.1167/iovs.11-7282

The Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) trial has shown beneficial effects of fenofibrate in reducing the risk for cardiovascular disease events and microvascular complications in diabetes.^{1,2} In particular, fenofibrate reduced total cardiovascular disease events and macular edema by 31% and proliferative diabetic retinopathy (DR) by 30% in patients with diabetes. In addition, recent data from the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial indicated that ocular complications had 40% odds of progression to DR in the group of patients receiving fenofibrate plus simvastatin compared with the group of patients treated with placebo plus simvastatin.³ However, it is unknown how fenofibrate, a hypolipemiant drug, improves retinal vascular permeability associated with DR.⁴ Fenofibrate reduces cholesterol by lowering low-density lipoprotein, very low-density lipoprotein, and triglyceride levels while increasing high-density lipoprotein levels.⁵ In addition, its beneficial effect on insulin resistance has been reported.^{6,7} Although the lipid-modifying effects of fenofibrate have been well documented,⁸ its mechanistic role in reducing diabetic microvascular complications, specifically diabetic macular edema formation, is unknown.

DR is a leading cause of blindness and vision loss in the working age population.⁹ Basement membrane thickening and increased vascular permeability are two major retinal vascular changes associated with the pathogenesis of this disease.^{10–12} Studies have reported that HG or hyperglycemia induces the overexpression of basement membrane components, which, in turn, contributes to excess retinal vascular permeability.^{11,12} We have shown that normalization of basement membrane component overexpression could lead to beneficial effects in preventing excess retinal vascular permeability and to the development of acellular capillaries and pericyte loss in animal models of DR.^{11–14}

Diabetic macular edema (DME) is a prominent clinical manifestation that frequently leads to severe loss of central vision in patients with diabetes.¹⁵ Studies indicate that tight junctions play an important role in maintenance of the inner blood-retinal barrier (BRB) and that compromised tight junctions promote the formation of DME.^{16,17} Similarly, the outer BRB, which is formed by RPE cells attached to one another by tight junctions, also plays an essential role in preventing the accumulation of extracellular fluid in the subretinal space of the retina.¹⁸ Compromised tight junctions in the RPE cell monolayer are known to contribute to the disruption of the outer BRB and to the impairment of neural retinal function. Studies

From the Departments of ¹Medicine and ²Ophthalmology, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts; ⁴Diabetes and Metabolism Research Unit, Institut de Recerca, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; and ⁵CIBER for Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain.

³These authors contributed equally to the work presented here and should therefore be regarded as equivalent authors.

Supported by National Institutes of Health/National Eye Institute Grants EY014702 and EY018218; a Massachusetts Lions Organization departmental grant; Ministerio de Ciencia y Tecnología Grant SAF2009-07408; and CIBERDEM.

Submitted for publication January 25, 2011; revised April 25 and June 9, 2011; accepted June 13, 2011.

Disclosure: **K. Trudeau**, None; **S. Roy**, None; **W. Guo**, None; **C. Hernández**, None; **M. Villarroel**, None; **R. Simó**, None; **S. Roy**, None

Corresponding author: Sayon Roy, Departments of Medicine and Ophthalmology, Boston University School of Medicine, 650 Albany Street, Boston, MA 02118; sayon@bu.edu.

have shown that fibronectin (FN) and collagen IV (Coll IV) are located in the basement membrane of the RPE^{19,20} and that significant thickening develops in the RPE basement membrane with aging and the formation of advanced glycation end products,²¹ two phenomena known to contribute to diabetic vascular basement membrane thickening. Because overexpression of basement membrane components and subsequent retinal capillary basement membrane thickening have been implicated in the breakdown of the inner BRB in diabetes, we examined in this study whether the overexpression of FN and Coll IV, two basement membrane components synthesized by RPE cells, may contribute to the outer BRB hyperpermeability seen in DR and whether such hyperpermeability could be prevented by FA.

In the present study we demonstrated that FA, the active metabolite of fenofibrate, prevents the breakdown of the RPE barrier under conditions that mimic the diabetic milieu. This effect is related to the protective role of FA in reducing FN and Coll IV overexpression produced by RPE cells. Results from this study suggest that FA may impart beneficial effects in preventing or arresting the development of DME in diabetic patients by ameliorating abnormal basement membrane component synthesis in the outer BRB.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

ARPE-19 cells representing a spontaneously immortalized human RPE cell line were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA). Cells from passage 18 were cultured for 18 days at 37°C under 5% (vol/vol) CO₂ in medium (DMEM/F12) supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum (HyClone; Thermo Fisher Scientific, Logan, UT) and 1% (vol/vol) penicillin/streptomycin (HyClone; Thermo Fisher Scientific) in N condition (5.5 mM D-glucose) and HG conditions (25 mM D-glucose). To study the potential protective effect of FA on the barrier function of RPE cells, FA (100 μM) was added to the standard culture medium daily for the last 3 days of the experiment (days 15–17). For studies examining the effect of different doses, cells were exposed to 25 or 100 μM FA after the conditions described for 100 μM FA. Cells were also treated with IL-1β (10 ng/mL) for the last 2 days of the experiment (days 16, 17) and were subjected to serum starvation (1% FBS) during the treatments. To rule out a potential bias by an osmotic effect, the experiment was also performed using mannitol (5.5 mM D-glucose + 19.5 mM mannitol vs. 25 mM D-glucose) as an osmotic control agent.

In Vitro Permeability

For permeability studies, ARPE-19 cells were seeded at 400,000 cells/mL (80,000 RPE cells/well) in 0.33 cm² polyester filters (HTS-Transwells; Costar, Corning, NY). For real-time PCR and Western blot analyses, cells were seeded directly on plastic at 20,000 cells/mL. For immunofluorescence and polarization studies, cells were seeded on glass coverslips at 20,000 cells/mL. The permeability of RPE cells was determined at 18 days in culture by measuring the apical-to-basolateral movements of fluorescein isothiocyanate (FITC) dextran (40 kDa) (Sigma, St. Louis, MO). The test molecule was added to the apical compartment of the cells in a concentration of 100 μg/mL. Samples (200 μL) were collected from the basolateral side at baseline and 75

minutes after the addition of the molecules. The medium in the basolateral compartment was replaced by fresh medium after the collection of every sample. A minimum of four wells were used for each time measurement. Absorbance was measured at 485 nm of excitation and 528 nm of emission with a microplate reader (Spectra-Max Gemini; Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Real-Time RT-PCR

To study the mRNA level of FN and Coll IV, first-strand cDNA was synthesized using a cDNA synthesis kit (Superscript; Invitrogen, Carlsbad, CA). Primer sets for performing real-time quantitative qPCR for Col4a1 (accession no. NM_001135009) and FN (accession no. X15906) and housekeeping gene hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1 (HPRT; accession no. NM_012583) were designed using a Web-based primer design program (www.roche.com). All real-time qPCR measurements were performed on a PCR system (7500; Applied Biosystems, Foster City, CA) using the standard temperature cycling protocol for the relative quantification assay. Each measurement was run in triplicate for each sample. Selected samples were run after sequential dilution to confirm that the detected signals were within the linear amplification range. Results were first normalized to the expression level of the endogenous housekeeping gene HPRT. Selected samples were tested against two additional housekeeping genes, 18S and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and the results were no different from the results obtained using HPRT. Further information is presented in Table 1.

Western Blot Analysis

Western Blot analysis was performed to determine the relative levels of ZO-1, claudin-1, FN, and Coll IV protein in the RPE cells from each group. RPE cells were homogenized, and protein was isolated as previously described.¹¹ Bicinchoninic acid assay (Pierce Chemical, Rockford, IL) was used to determine total protein concentrations. Western blot analysis were performed with 25 μg protein/lane; after electrophoresis, the gels were transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA) using a semidry apparatus according to Towbin's procedure.²² The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk for 2 hours and then exposed to rabbit FN (Millipore, Billerica, MA; 1:1000) and rabbit Coll IV (Fitzgerald Industries, Acton, MA; 1:2500) antibody solution overnight at 4°C. Blots were washed with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 and then incubated with goat anti-rabbit IgG secondary antibody (Cell Signaling, Billerica, MA) solution (1:3000) for 1 hour and goat anti-rabbit (1:20,000) or goat anti-mouse (1:10,000) for 1 hour (Pierce; Thermo Scientific). The membranes were again washed as described and then were exposed to a chemiluminescent protein detection system (Immun-Star; Bio-Rad) to detect the protein signals on x-ray film (Fujifilm, Tokyo, Japan). Protein loading in the gels was confirmed by Ponceau-S staining and tubulin antibody (Cell Signaling; 1:1000), and the densitometric values were used for adjustment of any differences in loading. Densitometric analysis of the Western blot signals was performed at nonsaturating exposures and analyzed using the ImageJ software (developed by Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD; available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry and polarization studies, cells were grown for 18 days at confluence in 24-well plates containing one circle

TABLE 1. PCR Primer Sequences Used for Performing Real-Time Quantitative qPCR to Assess FN and Coll IV mRNA Levels

Name	Forward	Reverse	Amplicon Size
FN	cagccccctgattggagtc	tgggtgacacctgagtgaaac	72
Coll IV	gcccatggctcaggacttg	aagggcattggctgctgaact	61

coverslip of glass (12-mm diameter) (Thermo Scientific, Menzel-Gläser; Braunschweig, GE) inside each well. Cells were washed with PBS and fixed with methanol (ZO-1 and claudin-1) or paraformaldehyde (FN and Coll IV) for 10 minutes, washed again with PBS twice, and blocked with 2% BSA and 0.05% Tween in PBS overnight at 4°C. Mouse anti-ZO-1, rabbit anti-claudin-1 (Zymed Laboratory Gibco, Invitrogen, San Diego, CA), rabbit anti-FN, rabbit anti-Coll IV (Abcam, Cambridge, MA), and mouse anti-N+/K+ ATPase (Millipore), all diluted to 1:200, were incubated for 1 hour at room temperature (RT). After washing with PBS, cells were further incubated with Alexa 488 goat anti-rabbit and Alexa 594 donkey anti-mouse secondary antibodies (Invitrogen) for 1 hour at RT. After washing with PBS, the slides were mounted with mounting medium containing DAPI for fluorescence (Vectashield; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Images were acquired with a confocal laser scanning microscope (FV1000; Olympus, Hamburg, Germany).

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm SD. The values of the control groups were normalized to 100%, and values from all other groups were expressed as percentages of control; statistical analysis was performed using the normalized values. Comparisons between groups were performed using ANOVA followed by the Student's *t*-test, and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Effect of FA on High Glucose- and IL-1 β -Induced Fibronectin Overexpression in RPE Cells

Western blot analysis showed significantly increased FN protein expression in RPE cells grown in HG or HG + IL-1 β medium compared with those grown in normal medium (179% \pm 14% of normal, $P < 0.05$; 195% \pm 10% of normal, $P < 0.05$, respectively). When RPE cells grown in HG medium were treated with FA, a significant reduction in FN protein level was observed compared with RPE cells grown in HG medium (121% \pm 9% of normal vs. 179% \pm 14% of normal, $P < 0.05$). Similarly, when RPE cells grown in HG medium supplemented with IL-1 β were treated with FA, FN expression was significantly reduced compared with RPE cells grown in HG medium supplemented with IL-1 β (87% \pm 10% of normal vs. 194% \pm 14% of normal, $P < 0.05$) (Figs. 1A, 1B).

Real-time RT-PCR results showed significantly increased FN mRNA levels in RPE cells grown in HG or HG + IL-1 β medium compared with RPE cells grown in normal medium (349% \pm 41% of normal, $P < 0.05$; 423 \pm 53% of normal, $P < 0.05$, respectively). FA significantly reduced FN mRNA overexpression in RPE cells grown in HG or HG + IL-1 β medium compared with untreated RPE cells grown in HG or HG + IL-1 β medium, respectively (247% \pm 34% of normal vs. 349% \pm 41% of normal, $P < 0.05$; 282% \pm 15% of normal vs. 423% \pm 53% of normal, $P < 0.05$, respectively; Fig. 1C).

Effect of FA on High Glucose- and IL-1 β -Induced Collagen Type IV Overexpression in RPE Cells

Western blot analysis showed significantly increased Coll IV protein expression in RPE cells grown in HG or HG + IL-1 β medium compared with those grown in normal medium (232% \pm 25% of normal, $P < 0.05$; 276% \pm 21% of normal, $P < 0.05$, respectively; Fig. 2). When RPE cells grown in HG medium or HG medium supplemented with IL-1 β were treated with FA, a significant reduction in Coll IV expression compared with RPE cells grown in HG medium or HG medium supplemented with IL-1 β , respectively, was observed (113% \pm 17% of normal vs. 232% \pm 25% of normal, $P < 0.05$; 168% \pm 22% of normal vs. 276% \pm 21% of normal, $P < 0.05$, respectively; Figs. 2A, 2B).

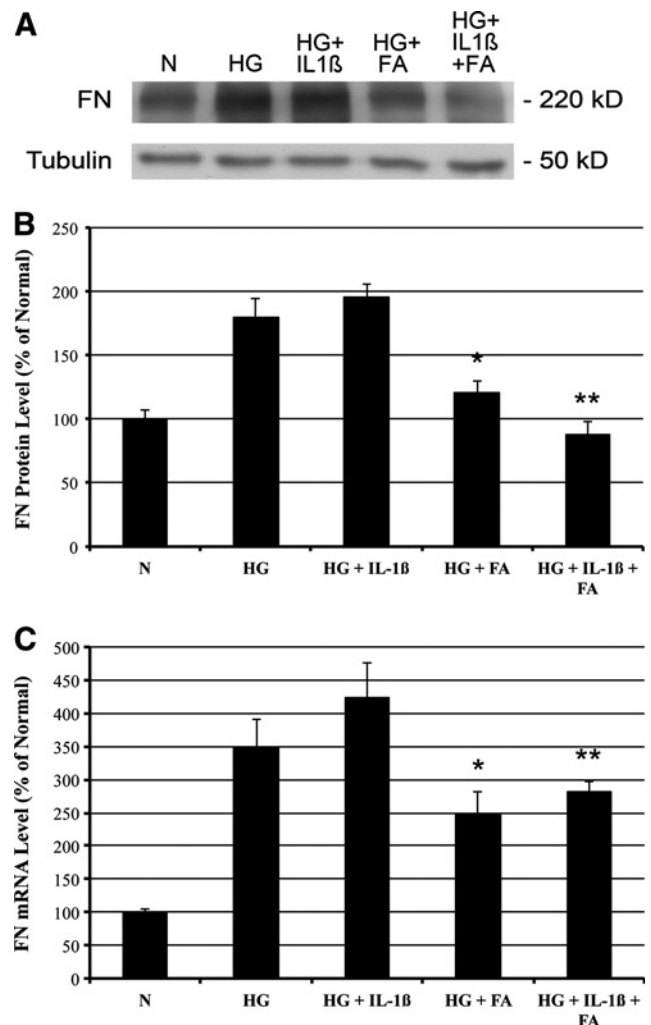


FIGURE 1. Effect of FA on FN protein and mRNA levels in RPE cells. (A) Representative Western blot image shows FA reduces HG- and HG + IL-1 β -induced FN overexpression. (B) Graphical representation of Western blot data. FN protein level is significantly increased in RPE cells grown in HG or HG + IL-1 β medium. When treated with fenofibrate, RPE cells grown in HG medium showed a significant reduction in FN expression compared with untreated HG cells (* $P < 0.05$). Similarly, FA treatment reduced FN overexpression in cells grown in HG + IL-1 β medium compared with untreated cells grown in HG + IL-1 β medium (** $P < 0.05$). (C) Real-time RT-PCR result indicates increased FN mRNA expression in cells grown in HG or HG + IL-1 β medium. FA significantly reduces FN overexpression in both groups (*HG vs. HG + FA, $P < 0.05$; **HG + IL-1 β vs. HG + IL-1 β + FA, $P < 0.05$).

Real-time RT-PCR results showed significantly increased Coll IV mRNA levels in RPE cells grown in HG or HG + IL-1 β medium compared with RPE cells grown in normal medium (221% \pm 28% of normal, $P < 0.05$; 301% \pm 23% of normal, $P < 0.05$, respectively). FA significantly reduced Coll IV mRNA overexpression in RPE cells grown in HG or HG + IL-1 β medium compared with untreated RPE cells grown in HG or HG + IL-1 β medium, respectively (127% \pm 39% of normal vs. 221% \pm 28% of normal, $P < 0.05$; 206% \pm 19% of normal vs. 301% \pm 23% of normal, $P < 0.05$, respectively; Fig. 2C).

Effect of FA on High Glucose- and IL-1 β -Induced Increased Barrier Permeability in RPE Cells

The effect of different conditions tested on the permeability of ARPE-19 monolayers is displayed in Figure 3. HG alone

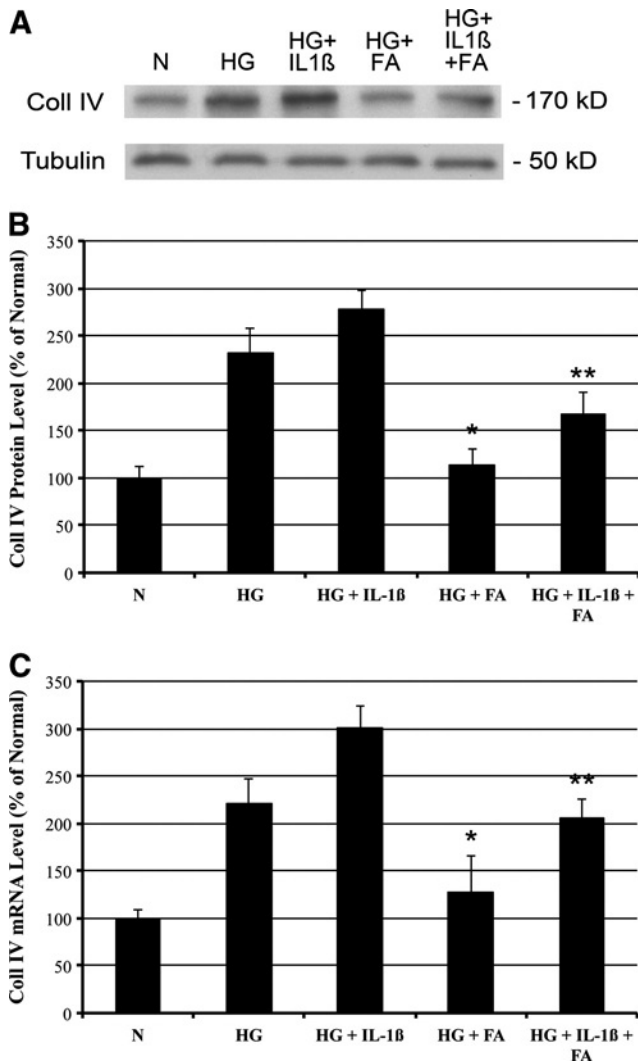


FIGURE 2. Effect of FA on Coll IV protein and mRNA levels in RPE cells. (A) Representative Western blot image shows FA reduces HG- and HG + IL-1 β -induced Coll IV overexpression. (B) Graphical representation of Western blot data. Coll IV protein level is significantly increased in RPE cells grown in HG or HG + IL-1 β . When treated with FA, RPE cells grown in HG medium showed a significant reduction in Coll IV expression compared with untreated HG cells (* $P < 0.05$). Similarly, FA treatment reduced Coll IV overexpression in cells grown in HG + IL-1 β medium compared with untreated cells grown in HG + IL-1 β medium (** $P < 0.05$). (C) Real-time RT-PCR result indicates increased Coll IV mRNA expression in cells grown in HG or HG + IL-1 β medium. FA significantly reduces Coll IV overexpression in both groups (*HG vs. HG + FA, $P < 0.05$; **HG + IL-1 β vs. HG + IL-1 β + FA, $P < 0.05$).

mildly increased excess permeability, whereas IL-1 β alone significantly increased permeability. Interestingly, both (HG + IL-1 β) dramatically increased permeability in what appeared to be a synergistic effect. Data related to osmotic control experiments using mannitol indicated that the excess permeability and the effects of HG + IL-1 β are independent of hyperosmotic effects. When cells grown in HG medium supplemented with IL-1 β were treated with 25 μ M FA, a significant reduction in permeability was observed (164.6 ± 38.3 vs. 224.9 ± 26.4 ; $P = 0.03$). This protective effect on monolayer permeability was more evident in cultures treated with 100 μ M FA (149.9 ± 15.5 vs. 224.9 ± 26.4 ; $P = 0.005$).

Effect of FA on Localization and Distribution of High Glucose- and IL-1 β -Induced Fibronectin, Collagen Type IV, Claudin-1, and ZO-1 in RPE Cells

To demonstrate that the cells formed a monolayer and exhibited polarity, ARPE-19 cells were stained with the tight junction protein occludin and with the apical marker enzyme Na⁺/K⁺ ATPase. As expected, the confocal vertical (X-Z) sections showed a predominant apical Na⁺/K⁺ ATPase localization and apical staining pattern for occludin (Fig. 4).

Immunostaining of tight junction proteins, ZO-1 and claudin-1 showed disruption of the cell monolayer induced by HG + IL-1 β and the beneficial effect of 100 μ M FA in preventing the disorganization of tight junction proteins and maintaining the integrity of the monolayer. Merged images show colocalization of claudin-1 and ZO-1 (Fig. 5A); treatment with 100 μ M FA shows reduced disruption of the tight junctions. Increased FN and Coll IV localization was observed in cells grown in HG + IL-1 β ; treatment with 100 μ M FA showed downregulation effects for both FN and Coll IV expression (Figs. 5B, 5C). Western blot analysis showed no significant difference in ZO-1 protein levels under the different experimental conditions compared with cells grown in normal medium. By contrast, HG + IL-1 β -treated cultures showed higher levels of claudin-1 than did untreated cells. This increase in claudin-1 after IL-1 β supplementation was associated with an increase rather than a decrease in permeability, which was reduced in a dose-dependent manner when the cells were treated with 25 μ M or 100 μ M FA (data not shown). The apparent contradictory effect of HG + IL-1 β upregulating claudin-1 expression but decreasing the sealing function of RPE has been previously observed with respect to the IL-1 β effect; the study indicated that IL-1 β promotes an aberrant and dysfunctional distribution of claudin-1.²³

DISCUSSION

Findings from the present study indicate that FA treatment prevents increased RPE permeability induced by HG + IL-1 β and that this beneficial effect of FA is associated with decreases in HG- and HG + IL-1 β -induced FN and Coll IV overexpression.

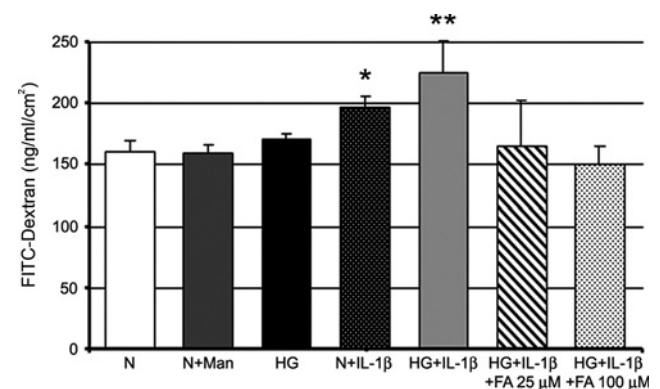


FIGURE 3. Effect of FA on ARPE-19 cell monolayer permeability. Data from permeability assays indicate that FA has a protective effect on HG + IL-1 β -induced increased barrier permeability in a dose-dependent manner. Monolayer permeability of cells grown in 5.5 mM D-glucose medium (white bar), 5.5 mM D-glucose + 19.5 mM mannitol (dark gray bar), 25 mM D-glucose (HG; black bar), N + IL-1 β (dotted black bar), HG + IL-1 β (light gray bar), HG + IL-1 β + FA (25 mM; striped bar), and HG + IL-1 β + FA (100 mM; dotted white bar). Results are expressed as the mean \pm SD ($n = 4$). * $P < 0.05$ compared with N. ** $P < 0.01$ in comparison with N.

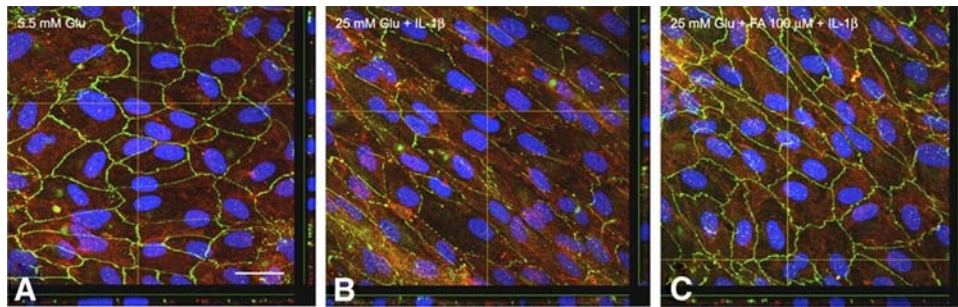


FIGURE 4. Evidence for tight junction and polarity in ARPE-19 monolayer. Confocal image showing the expression of occludin (green) and the apical marker enzyme Na⁺/K⁺ ATPase (red). Nuclei were stained with DAPI (blue). (A) Confocal vertical (X-Z) sections showing predominant apical Na⁺/K⁺ ATPase localization and apical staining pattern for the tight junction protein occludin in cells grown in NG medium. (B) ARPE-19 cells cultured under HG supplemented with IL-1β showing disruption of the cell monolayer and partial loss of polarization, which is prevented after treatment with FA 100 μM (C).

This suggests that FA can prevent the breakdown of BRB permeability at least in part by normalizing ECM protein overproduction. In addition, we confirmed previous reports showing that the altered amount of tight junction proteins was not necessarily the only factor regulating tight junction functionality and that the distribution of the tight junction proteins plays

an important role in barrier permeability.^{23,24} In fact, the protective effect of FA on RPE disruption induced by HG + IL-1β is in part mediated by its ability to prevent the aberrant distribution of tight junction proteins. The capacity of FA in maintaining the tight junction distribution and its suppressive effect on ECM overproduction could be involved in the beneficial

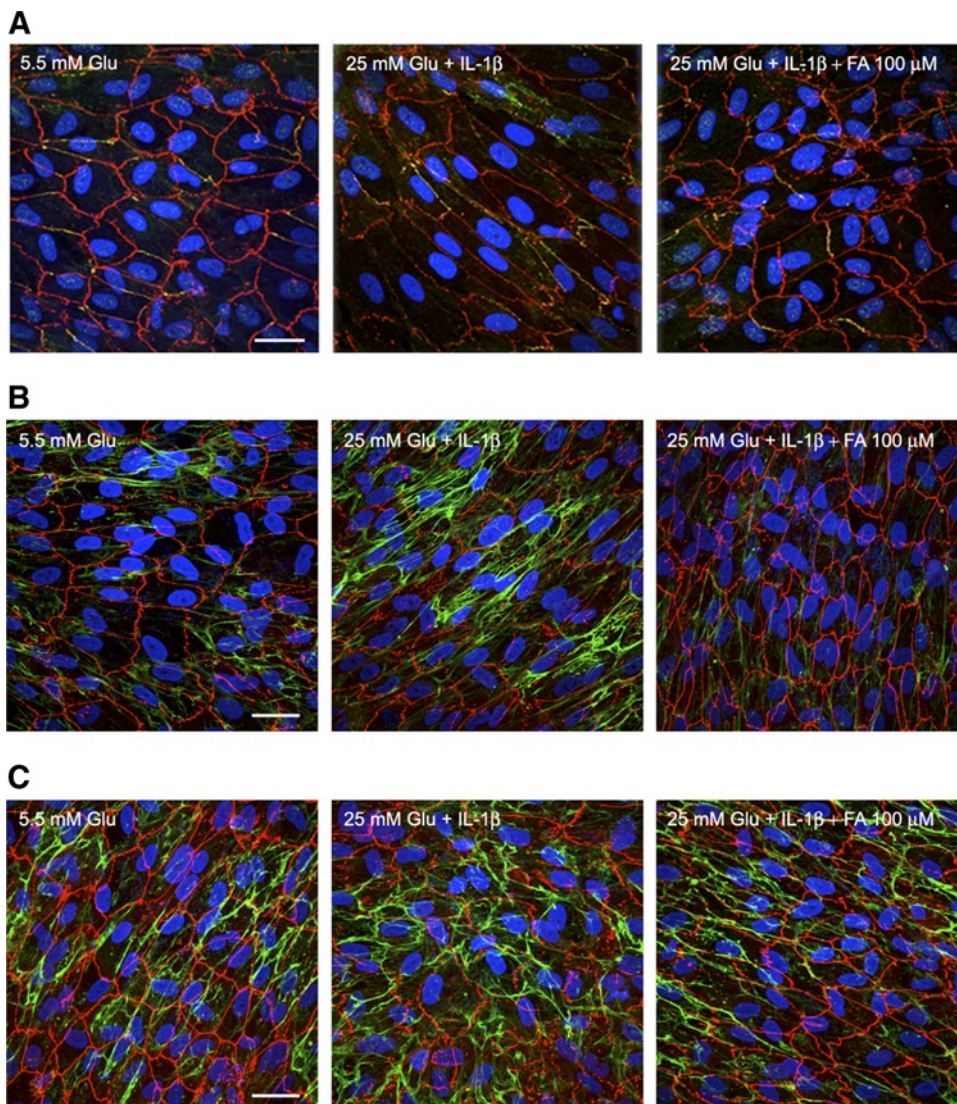


FIGURE 5. Effect of FA on localization and distribution of tight junction and ECM proteins in ARPE-19 cells. (A) Immunohistochemistry of ARPE-19 cells showing disruption of the monolayer induced by HG + IL-1β and the beneficial effects of FA in preventing the disorganization of tight junction proteins in the cell monolayer. Merged images show colocalization of claudin-1 and ZO-1 (yellow). Note that claudin-1 immunostaining appears green and ZO-1 immunostaining appears red. (B) Immunohistochemistry of ARPE-19 showing downregulation effect of 100 μM FA on FN (green). (C) Immunohistochemistry of ARPE-19 showing the downregulation effect of 100 μM FA on Coll IV expression (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar, 20 μm.

effects of fenofibrate on DME. However, further investigation to determine the mechanisms by which FA affects ECM protein expression and tight junction protein distribution are needed.

Importantly, our findings from this study implicate a down-regulation effect of FA on extracellular matrix protein levels, which could play a role in preventing vascular permeability and in underscoring the importance of FN and Coll IV in forming a selective permeable outer BRB. In this regard we have previously shown that reducing basement membrane thickening by downregulating extracellular matrix components including FN and Coll IV is effective in preventing the apoptosis and increased permeability associated with DR.^{11,25} Additionally, studies on RPE monolayers cultured on laminin-coated filters indicated that extracellular matrix components promote RPE morphology and the formation of a selective permeability barrier to various tracers.²⁶

Increased levels of proinflammatory cytokines play a key role in the pathogenesis of DME.^{17,27,28} Treatment of RPE cells with either serum, interferon- γ , tumor necrosis factor- α , hepatocyte growth factor (HGF), interleukin (IL)-1 β or placental growth factor-1 increases permeability and alters the expression or content of tight junction molecules.^{23,29-31} Because IL-1 β plays an important role in the development of DR,³²⁻³⁴ we decided to use the cytokine together with HG conditions to mimic the diabetic milieu. A significant overexpression of FN and Coll IV was observed after treating ARPE-19 cells with IL-1 β in the presence of HG, and this overexpression was associated with an increase in permeability. Overall, these findings indicate that a higher content of basement membrane components may contribute to the impairment of barrier function, leading to excess permeability. In addition, the overexpression of basement membrane components known to be induced by inflammatory cytokines such as IL-1 β ^{35,36} may be involved in hyperpermeability, which occurs in DR.

Microvascular basement membrane is an important component of the blood barrier system, which participates in the regulation of vascular permeability. Thus, any changes to the basement membrane structure or its composition may adversely affect its function. Previous studies demonstrated the ability of fenofibrate to decrease extracellular matrix accumulation in renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats³⁷ and in kidneys of spontaneously hypertensive rats.³⁸ In addition, fenofibrate treatment was shown to affect extracellular matrix changes associated with systolic failure seen in ascending aortic constriction in chronic pressure overload mice.³⁹ Our results from this study parallel these findings and demonstrate fenofibrate treatment's beneficial effects on pathologic changes associated with the overexpression of extracellular matrix proteins.

The exact cellular mechanisms by which FA influences extracellular matrix component levels is unclear. Recent studies have focused on the ability of FA to activate peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α), a transcription factor that regulates the genes involved in cellular lipid catabolism. The activation of PPAR α increases lipolysis and the elimination of triglyceride-rich particles from plasma and also increases the synthesis of apoproteins, which leads to a reduction in very low-density and low-density fractions and an increase in the high-density lipoprotein fraction containing apoprotein. PPAR α may regulate extracellular matrix turnover through consequently inhibiting matrix metalloproteinases^{38,39} or decreasing plasminogen activator inhibitor-1.³⁷ However, the exact pathway involving PPAR α and its downstream effectors has not been completely defined.

Other studies have investigated how fenofibrate may suppress oxidative stress and MAPK activation, thus decreasing TGF- β levels and ultimately affecting extracellular matrix accumulation.³⁸ Finally, one cannot rule out other mechanisms

whereby fenofibrate may affect vascular permeability. One report demonstrated that fenofibrate is able to reduce apoptosis in human retinal endothelial cells, which is associated with DR.⁴⁰ The mechanism by which fenofibrate exerted its anti-apoptotic effect was found to be AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent and PPAR α -independent. Preventing unwanted apoptosis in the retinal vasculature may help maintain vessel integrity and prevent leakage associated with DR. In addition, we have recently shown that RPE disruption induced by IL-1 β is prevented by FA because of its ability to suppress AMPK activation.²⁴ This finding indicates that suppression rather than activation of AMPK is the mechanism by which FA prevents the hyperpermeability induced by HG + IL-1 β . In the same paper, we reported that AMPK activation in human RPE from diabetic donors was significantly higher than from non-diabetic donors and very similar to that obtained in ARPE-19 cells cultured under high (25 mM) glucose + IL-1 β . Taken together, our results suggest that the suppression of AMPK activation is a mechanism by which fenofibrate may prevent or arrest diabetic macular edema.

A limitation of the present study is that it focuses on the effects of FA only on the outer BRB. As such, further studies are needed to investigate the effect of FA on the inner BRB and the contribution of FA on overall BRB breakdown. However, findings from this study documented an important proof of concept that HG-induced excess accumulation of basement membrane components of the outer BRB is involved in increased retinal permeability and that the protective effect of FA against leakage of the outer BRB is at least in part linked to the inhibitory effect of FA on specific basement membrane component expression in the RPE cells. The ability of FA to prevent basement membrane component overexpression may have significance for other diabetic microangiopathies beyond DME.

Acknowledgments

The authors thank Solvay Pharma S.A. for providing fenofibric acid.

References

1. Keech A, Simes RJ, Barter P, et al. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet*. 2005;366:1849-1861.
2. Keech AC, Mitchell P, Summanen PA, et al. Effect of fenofibrate on the need for laser treatment for diabetic retinopathy (FIELD study): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;370:1687-1697.
3. Chew EY, Ambrosius WT, Davis MD, et al. Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2010;363:233-244.
4. Simo R, Hernandez C. Fenofibrate for diabetic retinopathy. *Lancet*. 2007;370:1667-1668.
5. Guerin M, Bruckert E, Dolphin PJ, Turpin G, Chapman MJ. Fenofibrate reduces plasma cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL and normalizes the atherogenic, dense LDL profile in combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:763-772.
6. Koh KK, Han SH, Quon MJ, Yeal Ahn J, Shin EK. Beneficial effects of fenofibrate to improve endothelial dysfunction and raise adiponectin levels in patients with primary hypertriglyceridemia. *Diabetes Care*. 2005;28:1419-1424.
7. Yong QW, Thavintharan S, Cheng A, Chew LS. The effect of fenofibrate on insulin sensitivity and plasma lipid profile in non-diabetic males with low high density lipoprotein/dyslipidaemic syndrome. *Ann Acad Med Singapore*. 1999;28:778-782.
8. Filippatos T, Milionis HJ. Treatment of hyperlipidaemia with fenofibrate and related fibrates. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008;17:1599-1614.
9. Gardner TW, Antonetti DA, Barber AJ, LaNoue KF, Nakamura M. New insights into the pathophysiology of diabetic retinopathy: potential cell-specific therapeutic targets. *Diabetes Technol Ther*. 2000;2:601-608.

10. Cherian S, Roy S, Pinheiro A. Tight glycemic control regulates fibronectin expression and basement membrane thickening in retinal and glomerular capillaries of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:943-949.
11. Oshitari T, Polewski P, Chadda M, Li AF, Sato T, Roy S. Effect of combined antisense oligonucleotides against high-glucose- and diabetes-induced overexpression of extracellular matrix components and increased vascular permeability. *Diabetes.* 2006;55:86-92.
12. Roy S, Lorenzi M. Early biosynthetic changes in the diabetic-like retinopathy of galactose-fed rats. *Diabetologia.* 1996;39:735-738.
13. Evans T, Deng DX, Chen S, Chakrabarti S. Endothelin receptor blockade prevents augmented extracellular matrix component mRNA expression and capillary basement membrane thickening in the retina of diabetic and galactose-fed rats. *Diabetes.* 2000;49:662-666.
14. Robison WG Jr, Jacot JL, Glover JP, Basso MD, Hohman TC. Diabetic-like retinopathy: early and late intervention therapies in galactose-fed rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:1933-1941.
15. Lightman S, Towler HM. Diabetic retinopathy. *Clin Cornerstone.* 2003;5:12-21.
16. Simo R, Carrasco E, Garcia-Ramirez M, Hernandez C. Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev.* 2006;2:71-98.
17. Joussen AM, Smyth N, Niessen C. Pathophysiology of diabetic macular edema. *Dev Ophthalmol.* 2007;39:1-12.
18. Simo R, Villarreal M, Corraliza L, Hernandez C, Garcia-Ramirez M. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier—implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:190724.
19. Ishibashi T, Kohno T, Sorgente N, Patterson R, Ryan SJ. Fibronectin of the chorioretinal interface in the monkey: immunohistochemical and immunoelectron microscopic studies. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1985;23:158-163.
20. Karwatowski WS, Jeffries TE, Duance VC, Albon J, Bailey AJ, Easty DL. Preparation of Bruch's membrane and analysis of the age-related changes in the structural collagens. *Br J Ophthalmol.* 1995;79:944-952.
21. Ida H, Ishibashi K, Reiser K, Hjelmeland LM, Handa JT. Ultrastructural aging of the RPE-Bruch's membrane-choriocapillaris complex in the D-galactose-treated mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:2348-2354.
22. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76:4350-4354.
23. Abe T, Sugano E, Saigo Y, Tamai M. Interleukin-1beta and barrier function of retinal pigment epithelial cells (ARPE-19): aberrant expression of junctional complex molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:4097-4104.
24. Villarreal M, Garcia-Ramirez M, Corraliza L, Hernandez C, Simo R. Fenofibric acid prevents retinal pigment epithelium disruption induced by interleukin-1beta by suppressing AMP-activated protein kinase (AMPK) activation. *Diabetologia.* 2011;54(6):1543-1553.
25. Roy S, Sato T, Paryani G, Kao R. Downregulation of fibronectin overexpression reduces basement membrane thickening and vascular lesions in retinas of galactose-fed rats. *Diabetes.* 2003;52:1229-1234.
26. Heth CA, Yankauckas MA, Adamian M, Edwards RB. Characterization of retinal pigment epithelial cells cultured on microporous filters. *Curr Eye Res.* 1987;6:1007-1019.
27. Kern TS. Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res.* 2007;2007:95-103.
28. Gardner TW, Antonetti DA. Novel potential mechanisms for diabetic macular edema: leveraging new investigational approaches. *Curr Diab Rep.* 2008;8:263-269.
29. Chang CW, Ye L, Defoe DM, Caldwell RB. Serum inhibits tight junction formation in cultured pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38:1082-1093.
30. Jin M, Barron E, He S, Ryan SJ, Hinton DR. Regulation of RPE intercellular junction integrity and function by hepatocyte growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:2782-2790.
31. Miyamoto N, de Kozak Y, Jeanny JC, et al. Placental growth factor-1 and epithelial haemato-retinal barrier breakdown: potential implication in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetologia.* 2007;50:461-470.
32. Gerhardinger C, Costa MB, Coulombe MC, Toth I, Hoehn T, Grosu P. Expression of acute-phase response proteins in retinal Muller cells in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:349-357.
33. Demircan N, Safran BG, Soyulu M, Ozcan AA, Sizmaz S. Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye.* 2006;20:1366-1369.
34. Vincent JA, Mohr S. Inhibition of caspase-1/interleukin-1beta signaling prevents degeneration of retinal capillaries in diabetes and galactosemia. *Diabetes.* 2007;56:224-230.
35. Forsyth EA, Aly HM, Neville RF, Sidawy AN. Proliferation and extracellular matrix production by human intragenerous smooth muscle cells in response to interleukin-1 beta. *J Vasc Surg.* 1997;26:1002-1007; discussion 1007-1008.
36. Yang WS, Kim BS, Lee SK, Park JS, Kim SB. Interleukin-1beta stimulates the production of extracellular matrix in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int.* 1999;19:211-220.
37. Chen LL, Zhang JY, Wang BP. Renoprotective effects of fenofibrate in diabetic rats are achieved by suppressing kidney plasminogen activator inhibitor-1. *Vascul Pharmacol.* 2006;44:309-315.
38. Hou X, Shen YH, Li C, et al. PPAR α agonist fenofibrate protects the kidney from hypertensive injury in spontaneously hypertensive rats via inhibition of oxidative stress and MAPK activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394:653-659.
39. Duhaney TA, Cui L, Rude MK, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent actions of fenofibrate exacerbates left ventricular dilation and fibrosis in chronic pressure overload. *Hypertension.* 2007;49:1084-1094.
40. Kim J, Ahn JH, Kim JH, et al. Fenofibrate regulates retinal endothelial cell survival through the AMPK signal transduction pathway. *Exp Eye Res.* 2007;84:886-893.

Chapter 12

Measuring Permeability in Human Retinal Epithelial Cells (ARPE-19): Implications for the Study of Diabetic Retinopathy

Marta Garcia-Ramírez, Marta Villarroel, Lúdia Corraliza, Cristina Hernández, and Rafael Simó

Abstract

The retinal pigment epithelium (RPE) is a specialized epithelium lying in the interface between the neural retina and the choriocapillaris where it forms the outer blood–retinal barrier (BRB). The tight junctions (TJ)s expressed in the outer BRB control fluids and solutes that enter the retina and this sealing function, which is essential for the retinal homeostasis, is impaired in diabetic retinopathy. In this chapter, we provide the methods to explore the function of the RPE barrier by measuring Transepithelial electrical resistance (TER) and paracellular permeability to dextran in cultures of ARPE-19 cells (an immortalized RPE cell line). A method for inducing a lesion mimicking which occurs in diabetic retinopathy is described. In addition, methods for assessing mRNA expression and protein content of the main TJ proteins (occludin, zonula occludens-1 [ZO-1]) are detailed. Finally, we provide the methods required for confocal immunofluorescence detection of the TJ proteins, as well as for assessing the capacity of ARPE-19 cells to retain their functional properties.

Key words: ARPE-19 cells, Retinal pigment epithelium, Tight junctions, Blood–retinal barrier, Diabetic retinopathy, Transepithelial electrical resistance, Dextran permeability

1. Introduction

The retinal pigment epithelium (RPE) is a monolayer of pigmented cells lying in the interface between the neuroretina and the choroids. The RPE is of neuroectodermal origin and is therefore considered to be part of the retina. The apical membrane of the RPE faces the photoreceptors' outer segments and its basolateral membrane faces Bruch's membrane, which separates the RPE from the fenestrated endothelium of

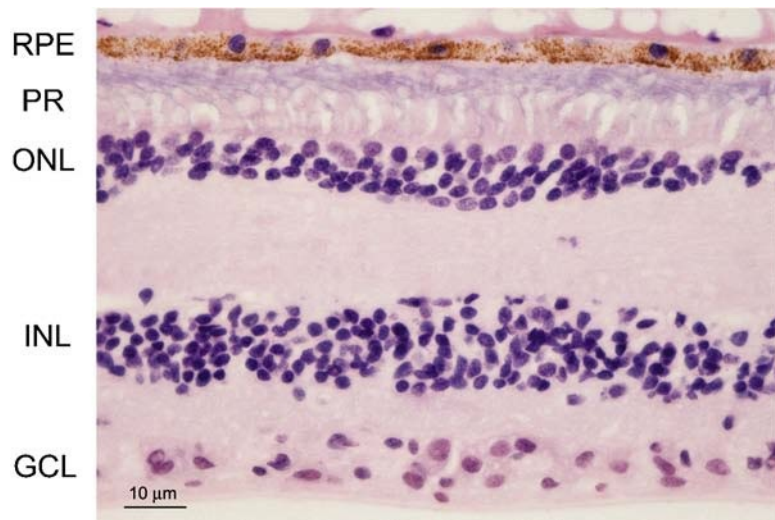


Fig. 1. Retinal section of normal retina stained with hematoxylin–eosin showing the location of the retinal pigment epithelium (RPE). *GCL* ganglion cell layer, *INL* inner nuclear layer, *ONL* outer nuclear layer, *PR* photoreceptors. Scale bar, 10 μm .

the choriocapillaris (Fig. 1). The RPE constitutes the outer blood–retinal barrier (BRB). The inner BRB is mainly constituted by endothelial cells. Tight junctions (TJ)s between neighboring RPE cells and neighboring endothelial cells are essential for the strict control of fluids and solutes that cross the BRB, as well as to prevent the entrance of toxic molecules and plasma components into the retina. Therefore, this sealing function is essential for the integrity of the retina (1). Apart from the barrier function, RPE participates in (1) the absorption of light and protection against photooxidation; (2) the reisomerization of all-*trans*-retinal into 11-*cis*-retinal, which is a key element of the visual cycle; (3) the phagocytosis of shed photoreceptor membranes; (4) the secretion of various factors essential for the structural integrity of the retina; (5) the immunoprivileged status of the eye (1–3). With these different complex functions, the RPE is essential for visual function. A failure of any one of these functions can lead to degeneration of the retina, loss of visual function, and blindness.

Diabetic retinopathy (DR) remains the leading cause of blindness among working-age individuals in developed countries (4). Whereas proliferative diabetic retinopathy (PDR) is the commonest sight-threatening lesion in type 1 diabetes, diabetic macular edema (DME) is the primary cause of poor visual acuity in type 2 diabetes. Because of the high prevalence of type 2 diabetes, DME is the main cause of visual impairment in diabetic patients (5). In addition, DME is almost invariably present when PDR is detected

in type 2 diabetic patients (6). Neovascularization due to severe hypoxia is the hallmark of PDR, whereas vascular leakage due to the breakdown of the BRB is the main event involved in the pathogenesis of DME (7, 8). Most of the research on the pathophysiology of DR has been focused in the impairment of the neuroretina and the breakdown of the inner BRB. By contrast, the effects of diabetes on the RPE have received less attention.

In this chapter, we provide the methods to explore the function of the RPE barrier by measuring transepithelial electrical resistance (TER) and paracellular permeability to dextran in cultures of ARPE-19 cells. This is a spontaneously immortalized cell line that has been commonly used as a model for the outer BRB because it has been demonstrated to have structural and functional properties characteristic of *in vivo* RPE cells (9).

The procedures indicated above have been performed in standard conditions and after inducing a lesion by using high glucose concentrations and IL-1 β , thus mimicking what occurs in the diabetic milieu (10). In addition, methods for assessing mRNA expression and protein content of the main TJ proteins (occludin, zonula occludens-1 [ZO-1], claudin-1) are described. Finally, methods required for confocal immunofluorescence detection of the TJ proteins mentioned above have been detailed. This is useful not only to quantify the expression and spatial distribution of the TJ proteins but also to demonstrate the establishment of a differentiated monolayer and provide evidence that ARPE-19 cells in culture retain the functionally polarized characteristics of the RPE. This latter condition is demonstrated by showing the apical localization of both TJ proteins and Na⁺/K⁺ ATP-ase activity (Fig. 2).

2. Materials

2.1. Human RPE Cell Culture

1. ARPE-19, a spontaneously immortalized human RPE cell line, obtained from the American Type Culture Collection (CRL-2302; ATCC; Manassas, VA, USA).
2. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and Ham's F12 medium with 2.50 mM L-glutamine supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone; Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA) and 1% penicillin/streptomycin (Hyclone; Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA). Commercial medium without glucose, supplemented to final 5.5 mM or 25 mM D-Glucose in order to mimic the euglycemic and hyperglycemic medium, respectively (see Note 1).
3. Dulbecco's PBS (1 \times) without Ca and Mg (PAA Laboratories GMBH; Pasching, Austria).

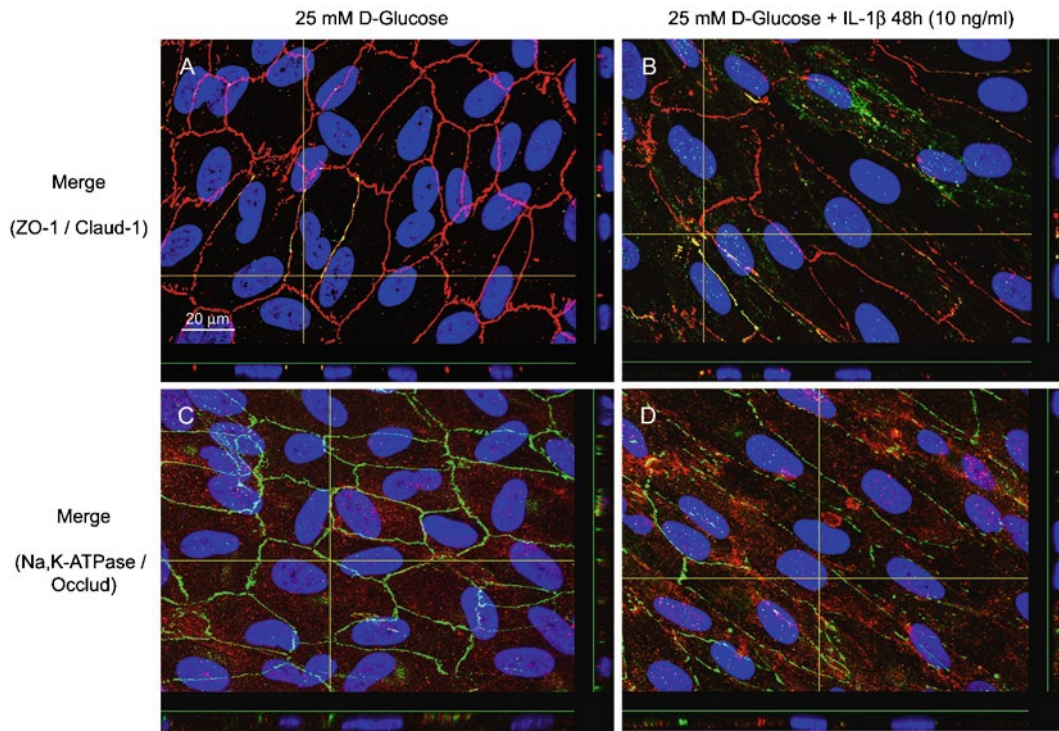


Fig. 2. Immunohistochemical characterization of the ARPE-19 monolayer maintained in 25 mM D-glucose 21 days. Confocal images showing the expression of ZO-1 (red)/Claudin-1 (green) (a, b); Na⁺/K⁺ ATPase (red)/Occludin (green) (c, d), and DAPI (blue). IL-1 β treatment (48 h) induces disruption of TJ organization (b, d). At the bottom of each panel Z-projection, the apical location of TJ proteins or Na⁺/K⁺ ATP-ase is revealed.

4. 0.05% Trypsin, 0.02% EDTA solution (Hyclone; Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA).
5. IL-1 β (Preprotech; Rock Hill, NJ, USA).
6. Tissue culture dishes (75 cm²) (Costar; Corning Inc., NY, USA).
7. Refrigerated centrifuge PR4i (Thermo Electron Corporation, MA, USA).
8. Cell incubator IGO150 with control temperature and CO₂. 37°C, 5% CO₂ level, and humidity >95%, (Thermo Electron Corporation, MA, USA).
9. Sterile Bio-II-A. Class II Cabinet (Telstar, Bristol, PA, USA).

2.2. Measurement of Paracellular Epithelial Electrical Resistance

1. Polyester Membrane Transwell Inserts (HTS, Costar; Corning Inc., NY, USA) with a 0.4- μ M pore size and 0.33 growth surface area (cm²).
2. Epithelial voltmeter (MILLICELL-ERS; Millipore, Billerica, MA, USA) with the STX100C (suitable for transwells of 24-well plates) electrode (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) (see Note 2).

2.3. Measurement of Permeability to Dextran

1. Polyester Membrane Transwells Inserts (HTS, Costar; Corning Inc., NY, USA) with a 0.4- μ M pore size and 0.33 growth surface area (cm²).
2. Fluorescein isothiocyanate (FICT) dextran (40,000, 70,000 Da) (Sigma, St. Louis, MO, USA) (see Note 3).
3. Microplate reader (SpectraMax Gemini; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

2.4. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

1. Resolving buffer (4 \times): 1.5 M Tris, pH 8.54, 0.4% SDS. Store at 4°C.
2. Stacking buffer (4 \times): 0.5 M Tris, pH 6.8, 0.4% SDS. Store at 4°C.
3. Thirty percent acrylamide/bis solution (29:1 with 3.3%C) (Acrylamide/Bis, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and *N,N,N,N'*-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED, Sigma; St. Louis, MO, USA).
4. Ammonium persulfate: prepare 20% solution in water and immediately freeze in single use (200 μ L) aliquots at -20°C.
5. Running buffer (10 \times): 0.25 M Tris, 1.92 M glycine, 1% (w/v) SDS. Store at 4°C. Dilute 100 mL with 900 mL water for use.
6. Prestained molecular weight markers: Kaleidoscope markers (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

2.5. Western Blotting for Tight Junctions

1. Lysis buffer RIPA (Sigma; St. Louis, MO, USA) in 1 mM PMSF, 2 mM Na₃VO₄, 100 mM NaF containing 1 \times Protease Inhibitor Cocktail (Sigma; St. Louis, MO, USA) (see Note 4).
2. Transfer buffer (10 \times): 0.25 M Tris, 1.92 M glycine, 10% (v/v) methanol (add prior to use). Store at 4°C.
3. Nitrocellulose membrane from GE Healthcare (Amersham Hybond™ ECL™) (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Waukesha, WI, USA), sponges from Bio-Rad and Quickdraw™ Blotting Paper from Sigma (St. Louis, MO, USA).
4. Tris-buffered saline (TBS): 100 mM NaCl, 100 mM Tris in water (see Note 5).
5. Tris-buffered saline with Tween (TBS-T): 100 mM NaCl, 100 mM Tris, 0.05% Tween in water (see Note 5).
6. Blocking buffer: 10% (w/v) nonfat dry milk in TBS-T (see Note 6).
7. Primary antibody dilution buffer: 10% (w/v) nonfat dry milk in TBS-T (see Note 7).
8. Primary antibodies: rabbit anti-claudin-1, rabbit anti-occludin, and mouse anti-ZO-1. (Zymed Lab Gibco; Invitrogen, San Diego, CA, USA).

9. Secondary antibodies: goat anti-rabbit or mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Pierce; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).
10. Enhanced chemiluminescence detection system (Supersignal CL-HRP Substrate System; Pierce; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

2.6. Real-Time PCR

1. RNeasy Mini kit with DNAase (Qiagen Distributors, IZASA, Barcelona, Spain).
2. Spectrophotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).
3. TaqMan Reverse Transcription Reagents kit (Applied Biosystems, Madrid, Spain).
4. TaqMan specific gene expression assays (Applied Biosystems, Madrid, Spain): β -actin (Hs999903_m1; Applied Biosystems, Madrid, Spain), ZO-1 (Zona occludens-1, Hs00268480_m1), OCLN (Occludin 1, Hs00170162_m1), and CLN-1 (claudin-1 Hs00221623_m1).
5. Thermo-cycler ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems, Madrid, Spain).

2.7. Confocal Immunofluorescence for Tight Junctions

1. Microscope circle cover-slips of glass (12 mm of diameter) from Thermo scientific, (Menzel-Gläser; Braunschweig, Germany).
2. 24-Well plates (Nunc; Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark).
3. Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) 1× with calcium and magnesium (PAA Laboratories GmbH; Pasching, Austria).
4. Fixing solution: Methanol (cold -20°C).
5. Blocking solution and antibody dilution buffer: PBS BSA 2%, 0.05% Tween.
6. Primary antibodies: Rabbit anti-claudin-1 or occludin, mouse anti-ZO-1 (Zymed Lab Gibco; Invitrogen, San Diego, CA, USA). Mouse anti- Na^+/K^+ ATPase (Millipore; Billerica, MA, USA).
7. Secondary antibody: Alexa 488 goat anti-rabbit and Alexa 594 donkey anti-mouse (Invitrogen; San Diego, CA, USA).
8. Vectashield mounting medium for fluorescence with DAPI (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA).
9. Confocal laser scanning microscope FV1000 (Olympus; Hamburg, Germany).
10. Microscope software: Fluoview 1.7.2.2. (Olympus; Hamburg, Germany).
11. Image processing and analysis: ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

3. Methods

In vitro models of RPE have been established by several groups based on ARPE-19 cell line culture (9–12). To obtain such models, ARPE-19 cells are cultured during 21 days with the objective of obtaining a monolayer that retains the in vivo morphological and physiological characteristics of native RPE. The presence of a polarized monolayer is one of the most important features assuring the functional integrity of ARPE-19 cells (13). The expression and location of markers such as TJ proteins at the apical side of the monolayer, as well as Na^+/K^+ ATPase are commonly used to assess the polarization of the monolayer (14) (Fig. 2).

It is important to note that ARPE-19 cells grown directly in plastic rather than in coating supports (i.e., fibronectin, collagen) better retain the characteristics of native RPE (15).

Given that IL-1 β plays an essential role in the development of DR and contributes to retinal neurodegeneration (16–19), decreases transepithelial electrical resistance (TER), and increases permeability with alteration of tight junction content (10), we use this cytokine together with high glucose concentrations (25 mM) in order to mimic the diabetic milieu (Fig. 2).

3.1. ARPE-19 Culture

1. The ARPE-19 cells are grown until confluence in 75 cm² tissue flasks in 8 mL medium with 10% FBS.
2. For subculturing, the medium is removed and cells rinsed with the same volume of PBS and then trypsinized. Trypsinization is carried out with 2 mL of trypsin solution in the incubator for 3–5 min until cell detachment. Trypsinization is stopped by adding the medium. Cells are transferred to a centrifuge tube and recovered by centrifugation ($240 \times g \times 5$ min) in a refrigerated centrifuge at 4°C. The supernatant is removed and the cell pellet is resuspended in fresh growth media and seeded onto new flasks. Next cell passages are obtained by dilution 1:3.
3. ARPE-19 cells at passage 23 are used to seed cultures suitable for obtaining RNA and protein extracts. At this point, a cell suspension of 20,000 cell/mL is obtained and split in a six-well plate or Petri dishes. Culture is performed in confluent conditions for 18 days in complete medium.
4. Damage to ARPE-19 monolayer mimicking diabetic conditions: The diabetic milieu is mimicked by culturing ARPE-19 cells in media containing 25 mM glucose. In the 19th day of the experiment, serum is starved in the upper compartment and IL-1 β (10 ng/mL) is added for 48 h until the end of the experiment (two doses of IL-1 β , each 24 h).

3.2. Measurement of Permeability to Dextran

The common method of obtaining differentiated ARPE-19 monolayers that resemble the *in vivo* cell state of the RPE consists of attaching a high density cell suspension to a transwell support that allows the development of a monolayer with basal and apical surfaces. In the present method, we use polyester transparent inserts to attach the cells. ARPE-19 cells attached to plastic membranes maintain differentiated characteristics and, in addition, provide good visibility under phase contrast or fluorescent microscopy (Fig. 3).

1. The inserts pack is opened in sterile conditions. Complete medium (0.6 mL) is added to the wells of a 24-well culture cell plate. Then HTS transwells-24 are placed in the wells.
2. ARPE-19 cells (at passage 23) are seeded at 400,000 cells/mL (80,000 cells/well) in the upside of the transwells. The plates are covered and incubated at 37°C (5% CO₂) in a tissue culture incubator. The monolayer is formed in the following 48 h. The medium is replaced each 3 days (see Note 8).
3. The permeability of RPE cells is determined at 18 days by measuring the apical-to-basolateral movements of FICT dextran (40 kDa). The test molecule is added to the apical compartment of the cells in a concentration of 100 µg/mL.
4. The cells grown under 25 mM D-glucose are treated with IL-1β (10 ng/mL, 1 application/day) during the last 48 h of the experiment (days 19 and 20) in order to mimick the tight junction disruption provoked by the diabetic milieu.

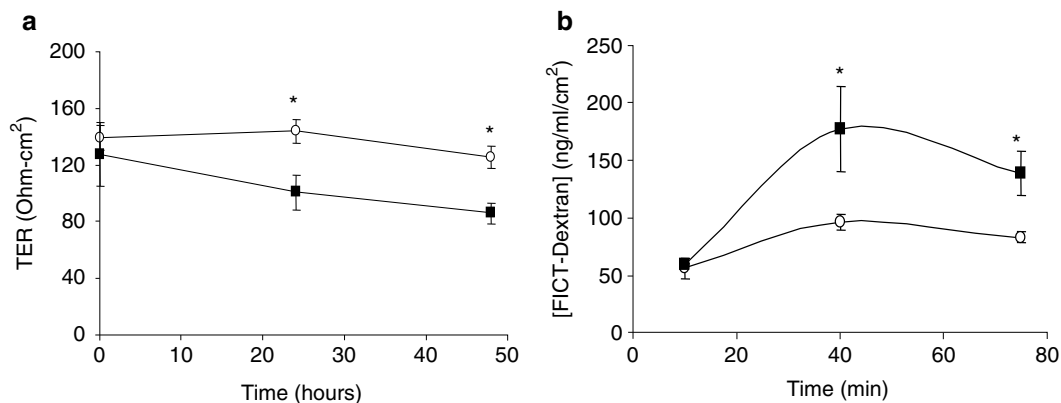


Fig. 3. (a) Results of TER. The vertical axis represents the TER, expressed in Ohm \times cm², and the horizontal axis represents the time after the addition of the treatment (IL-1β). (b) Results of 40 kDa dextran permeability. The vertical axis is the concentration of dextran and the horizontal axis is the time after the addition of the molecule. (—○—) 25 mM D-glucose; (—■—) 25 mM d-glucose + IL-1β (10 ng/mL) 48 h. Dextran permeability is measured at 10, 40, and 75 min. Results are expressed as the mean \pm SD. * p < 0.05.

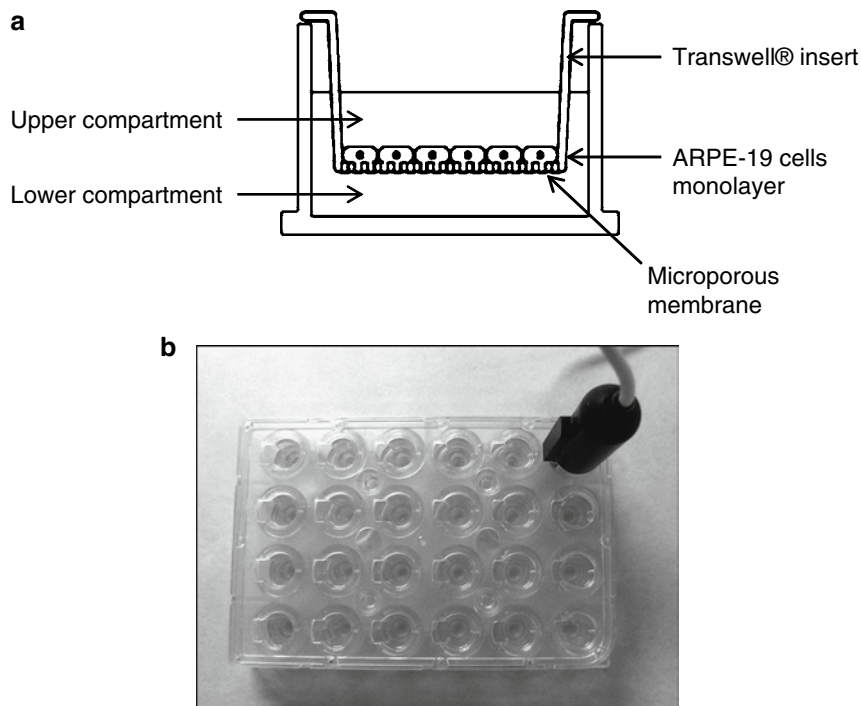


Fig. 4. (a) Section of a transwell insert. ARPE-19 monolayer is established in a porous membrane where the upper side resembles the apical part of RPE and the lower compartment resembles the basal part of the RPE. (b) Image of HTS-24 wells with the epithelial voltmeter used for TER measurement.

- 200 μL samples are collected from the basolateral side at 10, 40, and 75 min after adding the molecules. The medium in the basolateral compartment is replaced by fresh medium after the collection of every sample (see Note 9). A minimum of three wells are used for each time measurement. Absorbance is measured at 485 nm of excitation and 528 nm of emission with a microplate reader (Fig. 4).

3.3. Measurement of Paracellular Epithelial Electrical Resistance

- ARPE-19 three-week monolayer cells are obtained similarly as described above.
- Cells (0.8×10^6 cells/mL) are plated on permeable-membrane inserts in the complete medium (10% FBS) and maintained for 3 weeks in culture. At day 21, the complete medium is replaced by a depleted medium (1% FBS) on the apical side.
- Transepithelial electrical resistance (TER) is measured by using an epithelial voltmeter according to the manufacturer's instructions and following the method described by Dunn et al. (9) (see Notes 10 and 11).

4. Resistance measurements after subtraction of the background (resistance of transwells without cells) are expressed in ohms-cm². A baseline measurement of transepithelial electrical resistance is obtained and TER changes are monitored at the beginning of the treatments and after 24 h and 48 h. Each condition is assayed in quadruplicate and at least two independent experiments are performed (Fig. 4).

3.4. SDS-PAGE

1. These methods assume the use of Mini PROTEAN 3 System (Bio-Rad). It is critical that the glass plates for the gels be cleaned with ethanol 70% after use and rinsed extensively with distilled water.
2. Prepare a 1.5-mm thick, 10% acrylamide/bis solution gel for occludin and claudin by mixing 2.5 mL of 4× resolving buffer, 3.4 mL acrylamide/bis solution, 4.1 mL water, 50 μL ammonium persulfate solution, and 5 μL TEMED. Pour the gel, leaving space for a stacking gel, and overlay with water. The gel should polymerize in about 30 min.
3. Prepare a 1.5-mm thick, 7.5% acrylamide/bis solution gel for ZO-1 by mixing 2.5 mL of 4× resolving buffer, 2.5 mL acrylamide/bis solution, 5 mL water, 50 μL ammonium persulfate solution, and 5 μL TEMED. Pour the gel, leaving space for a stacking gel, and overlay with water. The gel should polymerize in about 30 min.
4. Prepare the stacking gel (the same for the three proteins) by mixing 1.3 mL of 4× stacking buffer with 0.7 mL acrylamide/bis solution, 3.3 mL water, 30 μL ammonium persulfate solution, and 15 μL TEMED. The stacking gel should polymerize within 30 min.
5. Prepare the running buffer by diluting 100 mL of the 10× running buffer with 900 mL of water in a measuring cylinder. Cover with Para-Film and invert to mix.
6. Once the stacking gel has set, carefully remove the comb and wash the wells with running buffer.
7. Add the running buffer to the upper and lower chambers of the gel unit and load each sample into a well. Include one well for prestained molecular weight markers.
8. Complete the assembly of the gel unit and connect to a power supply. The gel should be run firstly at 90 V until the samples reach the resolving part of the gel, and then the voltage can be raised to 150 V. The dye front can be run off the gel for ZO-1 but be careful to stop it before the 37-kDa marker is lost. This permit us to perform the β-actin staining in the same samples. For the other two proteins it is better preserve the front.

**3.5. Western Blotting
for Tight Junctions**

1. After treatment, ARPE-19 cells are washed with ice-cold Dulbecco's PBS (1×) without Ca and Mg. Protein is extracted with Lysis buffer.
2. 20 µg of total protein is resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to supported nitrocellulose membranes electrophoretically.
3. These methods assume the use of a Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). A tray of setup buffer is prepared that is large enough to lay out a transfer cassette with the sponge and the blotting paper submerged on one side. A sheet of nitrocellulose cut just larger than the size of the separating gel is laid on the surface of a separate tray of transfer buffer (1×) to allow the membrane to become wet by capillary action. The membrane is then submerged in the buffer on top of the blotting paper.
4. The gel unit is disconnected from the power supply and disassembled. The stacking gel is removed and discarded. The separating gel is then laid on top of the nitrocellulose membrane.
5. One further sheet of sponge and blotting paper is wetted in the buffer and carefully laid on top of the gel, ensuring that no bubbles are trapped in the resulting sandwich. Then the transfer cassette is closed.
6. The cassette is placed in the transfer tank so that the nitrocellulose membrane is between the gel and the anode. It is vitally important to ensure this orientation or the proteins will be lost from the gel into the buffer rather than transferred to the nitrocellulose.
7. Add the Bio-Ice cooling unit to the tank and a magnetic stir-bar to ensure that the heat generated will be absorbed. Set the tank upon a magnetic agitator.
8. The lid is put on the tank and the power supply activated. Transfers can be accomplished at either 15 V overnight or 0.4 A for 1 h.
9. Once the transfer is complete the cassette is taken out of the tank and carefully disassembled, with the top sponge, sheets of blotting paper and gel removed. The nitrocellulose membranes are laid on a glass plate so that a cut in the corner can be made to ensure the correct orientation. The colored molecular weight markers should be clearly visible on the membrane.
10. The nitrocellulose is then cleaned with 2 min immersion in TBS-T and then incubated in 10 mL blocking buffer for 1 h at room temperature or overnight at 4°C on a rocking platform.

11. The blocking buffer is discarded and 7 mL of a 1:1,000 dilution of the primary antibody have to be added to the membrane in antibody dilution buffer for 1 h at room temperature on a rocking platform.
12. The primary antibody is then removed and the membrane is washed two times with 30 mL of TBS-T and two times more with 30 mL of TBS for 15 min each.
13. 7 mL of the secondary antibody is freshly prepared for each experiment as 1:10,000-fold dilution in blocking buffer for the antimouse and 1:20,000-fold dilution in blocking buffer for the anti-rabbit and added to the membrane for 1 h at room temperature on a rocking platform.
14. The secondary antibody is discarded and the membrane is washed two times with TBS-T and two times with TBS for 15 min each.
15. During the final wash, 750 μ L aliquots of each portion of the ECL reagent were warmed separately to room temperature and mixed just before removing the final wash from the blot. Then the ECL is immediately added to the blot, which is then rotated by hand for 5 min to ensure even coverage.
16. The blot is removed from the ECL reagents, and placed into a saran wrap paper envelope. The remaining steps are done in a dark room under safe light conditions.
17. The membrane is then placed in a X-ray film cassette with film for a suitable exposure time, typically no more than 5 min.

3.6. Real-Time PCR

1. The total RNA is extracted from monolayers with the RNeasy Mini kit with DNAase digestion.
2. Quantification and quality of total mRNA are determined with a spectrophotometer NanoDrop ND-1000.
3. Reverse transcription is carried out with 1 μ g of total RNA. The cDNA (40 ng) is used as a template for Real-Time PCR with the specific TJ assays and master mix (20 μ l of total volume). Real-Time reactions are conducted as follows: 95°C for 10 min and 50 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Each sample is assayed in triplicate. Reactions are performed on ice (see Note 12).
4. Automatic relative quantification data (R.Q.) is obtained in an ABI Prism 7900 (SDS software; Applied Biosystems, Madrid, Spain) using β -actin gene as the endogenous reference gene.

3.7. Confocal Immunofluorescence

Confocal immunofluorescence is essential to demonstrate well-structured TJs and the polarity of the formed monolayer. For this purpose, immunofluorescence for ZO-1, occludin, claudin-1, and Na⁺/K⁺ ATPase is performed.

1. Cover-slips must be sterilized with ethanol 70% and washed with PBS. Once dried place them in a 24-well plate.
2. ARPE-19 cells are seeded at a concentration of 20,000 cells/mL and maintained in 5.5 or 25 mM of D-glucose for 21 days as described above.
3. The cells grown under 25 mM D-glucose are treated with IL-1 β (10 ng/mL) during 48 h (1 application/day) the last 2 days of the experiment (days 19 and 20) in order to mimick the TJ disruption provoked by the diabetic milieu.
4. Culture media is removed and the cells are washed with PBS for 5 min.
5. Cold methanol (-20°C) is added for 10 min at room temperature to fix the cells.
6. The methanol is discarded and the samples are washed twice for 5 min each with PBS.
7. The cells are blocked by incubation in antibody dilution buffer (PBS BSA 2% 0.05% Tween) at 4°C overnight.
8. The blocking solution is removed and primary antibodies rabbit anti-claudin-1, rabbit anti-occludin, mouse anti-ZO-1, and mouse anti-Na⁺/K⁺ ATPase are added, all diluted 1:200 in antibody dilution buffer and incubated for 1 h at room temperature.
9. The primary antibody is removed and the cells are washed three times for 5 min each with PBS.
10. The samples are incubated for 1 h at room temperature and in the dark with secondary antibodies such as Alexa 488 goat anti-rabbit and Alexa 594 donkey anti-mouse diluted 1:200 in antibody dilution buffer (see Note 13).
11. The secondary antibodies are discarded and the cells are washed three times for 5 min each with PBS.
12. To mount the samples each cover-slip must be inverted carefully into a drop of mounting medium for fluorescence with DAPI on a microscope slide (see Note 14). The cover-slip can be sealed with nail varnish (see Note 15). Avoid air bubbles in the mounting medium (see Notes 16 and 17).
13. The slides are viewed under confocal microscopy and the images are acquired by sequential scanning using a $\times 60$ oil objective and the appropriate filter combination. Serial (z) sections are captured with a 0.25- μ m step size through the thickness of the ARPE-19 monolayer until profiles of the immunolabeled tight junctions are no longer detectable. Images are taken at a resolution of 800 \times 800 pixels with the same exposure settings and saved as TIFF files. Fluoview 1.7.2.2 software is used to project the serial sections into one image. ImageJ, a freely available java-based public-domain image processing program can also be used.

4. Notes

1. Pay attention to DMEM/F12 culture mediums. Not all DMEM/F12 mediums have the same composition. Use recommended culture medium for ARPE-19 (ATCC, Hyclone, Gibco (Invitrogen)).
2. Use a suitable epithelial voltmeter (STX100C) for the kind of transwell support that you use. The present protocol assumes the use of HTS transwell-24 Ref: 3379.
3. Store FICT dextran and the samples collected from the lower (basolateral) compartment of the transwells in a place protected from light.
4. The lysis solution for proteins must be freshly prepared. PMSF must be well dissolved. Avoid using precipitated PMSF.
5. It is recommended that both washing solutions for western blot (TBS-T and TBS) are used within 2 weeks.
6. Be careful with the milk used for blocking the membrane. It must be nonfat dry milk without *bifidus*. Check the date of the product because out of date milk can damage the membrane. Use the blocking buffer within 2 days.
7. The primary antibody can be saved for subsequent experiments. Store the primary antibody dilution used at -20°C .
8. The ARPE-19 monolayer should be intact. Be extremely careful when aspirating the medium.
9. In the permeability study, two different methods are possible for sample collection: (a) collect samples (200 μL) from the lower chamber and replace immediately with the same volume of fresh medium to maintain equilibrium. (b) Collect samples (200 μL) from the lower chamber, remove completely the volume of the lower chamber and replace immediately with fresh medium (600 μl) (this is the method we follow in the present protocol).
10. Measurements of TER should be taken after changing the cell culture medium (200 μl in the upper compartment of the transwell and 600 μl in the lower compartment are the recommended volumes). Differences in the total volume can affect the readings. Remember to use a warm culture medium.
11. Try to maintain a fixed temperature when measuring TER. Temperature changes affect the readings.
12. When preparing the samples for PCR, use micropipettes kept for PCR and filter tips. Be careful to maintain the samples and the PCR plate on ice.

13. Protect the samples from light during incubation with Alexa secondary antibodies in order to avoid a reduction of the fluorescence.
14. Avoid using too much volume of mounting medium because cell monolayers could be damaged. 3–8 μl is the recommended volume of mounting medium.
15. Sealing the cover-slip with a bright color of nail varnish is useful to preserve sample integrity in case of long-term storage. Keep the samples at 4°C and protected from light.
16. Be careful with air bubbles when mounting the samples. Slow and careful application of the cover-slip can reduce the number of air bubbles.
17. Let the samples settle for some time (approximately 2 h) before performing microscopic observation.

References

1. Strauss O (2005) The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85:845–881
2. Holtkamp GM, Kijlstra A, Peek R, de Vos AF (2001) Retinal pigment epithelium-immune system interactions: cytokine production and cytokine-induced changes. *Prog Retin Eye Res* 20:29–48
3. Simó R, Villarroel M, Corraliza L, Hernández C, García-Ramírez M (2010) The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier. Implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol* 2010:190724
4. Congdon N, Friedman DS, Lietman T (2006) Important causes of visual impairment in the world today. *JAMA* 290:2057–2060
5. Lightman S, Towler HM (2003) Diabetic retinopathy. *Clin Cornerstone* 5:12–21
6. Tong L, Vernon SA, Kiel W, Sung V, Orr GM (2001) Association of macular involvement with proliferative retinopathy in type 2 diabetes. *Diabet Med* 18:388–394
7. Simó R, Carrasco E, García-Ramírez M, Hernández C (2006) Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Diabet Rev* 2:71–98
8. Jousen A, Smyth N, Niessen C (2007) Pathophysiology of diabetic macular edema. *Dev Ophthalmol* 39:1–12
9. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hielmeland LM (1996) ARPE-19 a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res* 62:155–169
10. Abe, T, Sugano, E, Saigo, Y, Tamai, M (2003) Interleukin-1 β and barrier function of retinal pigment epithelial cells (ARPE-19): aberrant expression of junctional complex molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4097–4104
11. Phillips BE, Cancel L, Tarbell JM, Antonetti DA (2008) Occludin independently regulates permeability under hydrostatic pressure and cell division in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:2568–2576
12. Villarroel M, García-Ramírez M, Corraliza L, Hernández C, Simó R (2009) Effects of high glucose concentration on the barrier function and the expression of tight junction proteins in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 89:913–920
13. Philp NJ, Wang D, Yoon H, Hjelmeland LM (2003) Polarized expression of monocarboxylate transporters in human retinal pigment epithelium and ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:1716–1721
14. Kannan R, Zhang N, Sreekumar PG, Spee CK, Rodríguez A, Barron E, Hinton DR (2006) Stimulation of apical and basolateral VEGF-A and VEGF-C secretion by oxidative stress in polarized retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:1646–1659
15. Tian, J, Ishibashi, K, Handa, JT (2004). The expression of native and cultured RPE grown on different matrices. *Physiol Genomics* 17:170–182
16. Kowluru RA, Odenbach S (2004) Role of interleukin-1beta in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 88:1343–1347

17. Gerhardinger C, Costa MB, Coulombe MC, Toth I, Hoehn T, Grosu P (2005) Expression of acute-phase response proteins in retinal Müller cells in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46:349–357
18. Demircan N, Safran BG, Soylu M, Ozcan AA, Sizmaz S (2006) Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye* 20:1366–1369
19. Vincent JA, Mohr S (2007) Inhibition of caspase-1/interleukin-1beta signaling prevents degeneration of retinal capillaries in diabetes and galactosemia. *Diabetes.* 56:224–230

Review Article

The Retinal Pigment Epithelium: Something More than a Constituent of the Blood-Retinal Barrier—Implications for the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy

**Rafael Simó, Marta Villarroel, Lúdia Corraliza, Cristina Hernández,
and Marta Garcia-Ramírez**

*CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII),
Unitat de Diabetis i Metabolisme, Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129,
08035 Barcelona, Spain*

Correspondence should be addressed to Rafael Simó, rsimo@ir.vhebron.net

Received 29 June 2009; Revised 28 September 2009; Accepted 16 November 2009

Academic Editor: Karl Chai

Copyright © 2010 Rafael Simó et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The retinal pigment epithelium (RPE) is a specialized epithelium lying in the interface between the neural retina and the choriocapillaris where it forms the outer blood-retinal barrier (BRB). The main functions of the RPE are the following: (1) transport of nutrients, ions, and water, (2) absorption of light and protection against photooxidation, (3) reversion of all-*trans*-retinal into 11-*cis*-retinal, which is crucial for the visual cycle, (4) phagocytosis of shed photoreceptor membranes, and (5) secretion of essential factors for the structural integrity of the retina. An overview of these functions will be given. Most of the research on the pathophysiology of diabetic retinopathy has been focused on the impairment of the neuroretina and the breakdown of the inner BRB. By contrast, the effects of diabetes on the RPE and in particular on its secretory activity have received less attention. In this regard, new therapeutic strategies addressed to modulating RPE impairment are warranted.

1. Introduction

The retinal pigment epithelium (RPE) is a monolayer of pigmented cells situated between the neuroretina and the choroids. The RPE is of neuroectodermal origin and is therefore considered to be part of the retina. The apical membrane of the RPE faces the photoreceptor's outer segments and its basolateral membrane faces Bruch's membrane, which separates the RPE from the fenestrated endothelium of the choriocapillaris (Figure 1). The RPE constitutes the outer blood-retinal barrier (BRB). The inner BRB is mainly constituted by endothelial cells. Tight junctions between neighbouring RPE cells and neighbouring endothelial cells are essential in the strict control of fluids and solutes that cross the BRB as well as in preventing the entrance of toxic molecules and plasma components into the retina. Therefore, this sealing function is essential for the integrity of the retina [1].

The main functions of the RPE are the following: (1) Transport of nutrients, ions, and water (2) absorption of light and protection against photooxidation, (3) reversion of all-*trans*-retinal into 11-*cis*-retinal, which is a key element of the visual cycle, (4) phagocytosis of shed photoreceptor membranes, and (5) secretion of various essential factors for the structural integrity of the retina.

Apart from these functions, the RPE stabilizes ion composition in the subretinal space, which is crucial for the maintenance of photoreceptor excitability [2]. In addition, the RPE contributes to the immune privileged status of the eye as part of the BRB and by the secretion of immunosuppressive factors inside the eye. In recent years it has become clear, mainly from *in vitro* studies, that RPE cells play an important role in immune responses by the expression of major histocompatibility complex (MHC) molecules, adhesion molecules, FasL and cytokines [3]. With these different complex functions, the RPE is essential for

visual function. A failure of any one of these functions can lead to degeneration of the retina, loss of visual function, and blindness.

Diabetic retinopathy (DR) remains the leading cause of blindness among working-age individuals in developed countries [4]. Whereas proliferative diabetic retinopathy (PDR) is the commonest sight-threatening lesion in type 1 diabetes, diabetic macular edema (DME) is the primary cause of poor visual acuity in type 2 diabetes. Because of the high prevalence of type 2 diabetes, DME is the main cause of visual impairment in diabetic patients [5]. In addition, DME is almost invariably present when PDR is detected in type 2 diabetic patients [6]. Neovascularization due to severe hypoxia is the hallmark of PDR whereas vascular leakage due to the breakdown of the blood retinal barrier (BRB) is the main event involved in the pathogenesis of DME [7, 8]. Most of the research on the pathophysiology of DR has been focused in the impairment of the neuroretina and the breakdown of the inner BRB. By contrast, the effects of diabetes on the RPE have received less attention.

In the following sections the functions of the RPE mentioned above will be described in more detail, and the deleterious effects of diabetes will be summarized. Although there is growing evidence pointing to RPE as an active secretor epithelium, it seems that this important function has been less recognized. For this reason, this review will focus on this essential propriety of RPE and its impairment in DR.

2. Transepithelial Transport

In one direction, the RPE transports electrolytes and water from the subretinal space to the choroid, and in the other direction, the RPE transports glucose and other nutrients from the blood to the photoreceptors.

2.1. Transport from Blood to Photoreceptors. The RPE takes up nutrients such as glucose, retinol, ascorbic acid, and fatty acids from the blood and delivers these nutrients to the photoreceptors.

To transport glucose, the RPE contains high amounts of glucose transporters in both the apical and the basolateral membranes. Both GLUT1 and GLUT3 are highly expressed in the RPE [9–11]. GLUT3 mediates the basic glucose transport while GLUT1 is responsible for inducible glucose transport in response to different metabolic demands.

Another important function of the RPE is the transport of retinol to ensure the supply of retinal to the photoreceptors. The bulk of the retinal is exchanged between the RPE and the photoreceptors during the visual cycle in which all-*trans*-retinol is taken up from the photoreceptors, isomerized to 11-*cis*-retinal, and redelivered to photoreceptors [12].

Delivery of fatty acids such as docosahexaenoic acid (DHA) to the photoreceptors is a third kind of transport of importance for visual function [13]. DHA is an essential omega-3 fatty acid that cannot be synthesized by neural tissue but is required as structural element by membranes of neurons and photoreceptors. DHA is synthesized from its precursor, linolenic acid, in the liver and transported in the blood bound to plasma lipoprotein where it is taken

up in a concentration-dependent manner [1, 14]. Apart from the RPE's functional integrity, DHA is the precursor of neuroprotectin D1 (NPD1), a docosatriene that protects RPE cells from oxidative stress [15, 16].

Recently it has been demonstrated that high glucose downregulates GLUT-1 by Akt pathway activation mediated by the PKC-oxidative stress signaling pathway in ARPE cells (a spontaneously immortalized line of RPE cells) [17]. In addition, the transport of retinol may be altered due to a downregulation of the interstitial retinol binding protein (IRBP) that occurs in diabetic patients (see below). Finally an impairment of the transport of ascorbic acid also exists in the presence of hyperglycemia, thus limiting the RPE's antioxidant defence [18, 19]. To the best of our knowledge, there is no information regarding the potential effects of diabetes on NPD1 or its precursor DHA.

2.2. Transport from Subretinal Space to Blood. The RPE transports ions and water from the subretinal space or apical side to the blood or basolateral side [1]. The Na⁺-K⁺-ATPase, which is located in the apical membrane, provides the energy for transepithelial transport [20–23].

There is a large amount of water produced in the retina, mainly as a consequence of the large metabolic turnover in neurons and photoreceptors. Furthermore, intraocular pressure leads to a movement of water from the vitreous body into the retina. This establishes the need for the constant removal of water from the inner retina to the choriocapillaris [24]. Water in the inner retina is transported by Müller cells, and water in the subretinal space is eliminated by the RPE [25, 26]. Constant elimination of water from the subretinal space produces an adhesion force between the retina and the RPE that is lost by inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase by ouabain [27]. The transport of water is mainly driven by a transport of Cl⁻ and K⁺ [24, 28–30].

Tight junctions establish a barrier between the subretinal space and the choriocapillaris [31, 32]. Paracellular resistance is 10 times higher than transcellular resistance, classifying the RPE as a tight epithelium [33, 34]. For this reason, water cannot pass through the paracellular transport route and water transport occurs mainly by transcellular pathways facilitated by aquaporin-1 [35–37].

Recently we have found that high glucose concentrations result in a reduction of permeability in ARPE-19 cells [38] that was unrelated to tight junction (occludin, ZO-1 and claudin-1) changes. In this regard, in cultured bovine RPE cells it has been demonstrated that hyperglycemia induces a loss of Na⁺/K⁺-ATPase function, which responds to aldose reductase inhibitor treatment [39]. Therefore, hyperglycemia could impair the transport of water from subretinal space to the choriocapillaris and, consequently, might contribute to DME development.

At present, there is no information regarding the potential effects of diabetes on aquaporin expression in the RPE.

3. Absorption of Light and Protection against Photooxidation

The retina is the only neural tissue that has a direct and frequent exposure to light. This circumstance favours the

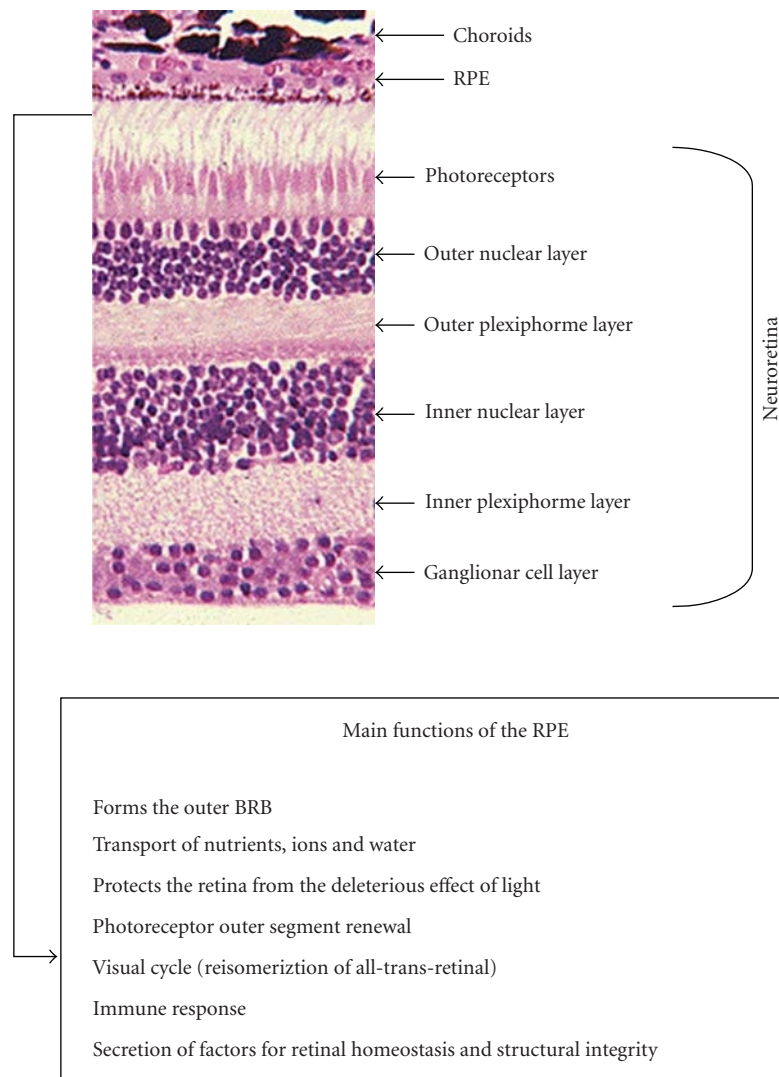


FIGURE 1: Retinal section of the retina showing the location of the retinal pigment epithelium (RPE). In the box are listed the main functions of RPE.

photooxidation of lipids which become extremely toxic to retinal cells [40]. In addition, the retina is the part of the body that proportionally consumes more oxygen, thus generating a high rate of reactive oxygen species (ROS). The RPE is essential in counterbalancing the high oxidative stress that exists in the retina, and it does this by means of three lines of defence.

The first line is the absorption and filtering of light. For this purpose, the RPE contains a complex composition of various pigments (i.e., melanin, lipofuscin) that are specialized to different wavelengths and special wavelength-dependent risks [41–43]. The second line of defence is made by antioxidants. As enzymatic antioxidants, the RPE contains high amounts of superoxide dismutase [44–47] and catalase [45, 48]. As nonenzymatic antioxidants, the RPE accumulates carotenoids, such as lutein and zeaxanthin [42, 43] or ascorbate [42, 49]. In addition, glutathione and melanin are important contributors to antioxidant defence.

DR is characterized by reduced levels of molecules with antioxidant activity such as glutathione [50, 51], superoxide dismutase (SOD) [50, 52], and ascorbic acid [18, 53], thus favouring retinal tissue damage induced by oxidative stress.

4. Visual Cycle

In vertebrate retina, vision is initiated and maintained by the photolysis and regeneration, respectively, of light sensitive pigments in the disk membranes of the photoreceptor outer segments. This cyclical process depends on an exchange of retinoids between the photoreceptors and the RPE.

Light transduction is initiated by the absorption of light by rhodopsin which is composed of a seven transmembrane domain G-coupled receptor protein, opsin, and the chromophore 11-*cis*-retinal [54]. Absorption of light changes the conformation of 11-*cis*-retinal into all-*trans*-retinal. Photoreceptors lack *cis-trans* isomerase and, therefore, all-*trans*-retinal is metabolized into all-*trans*-retinol and transported

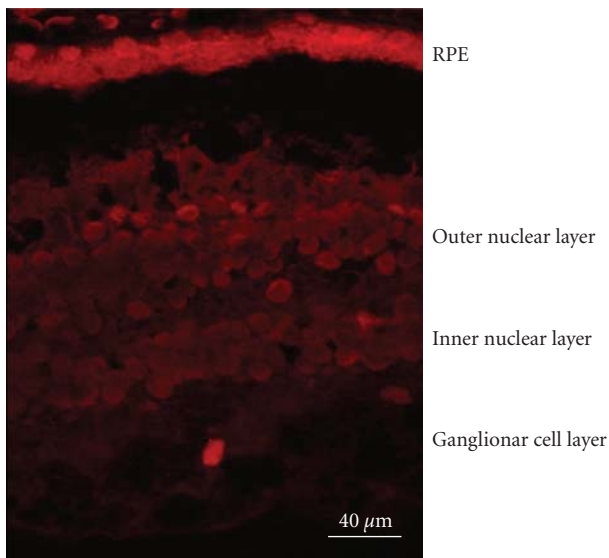


FIGURE 2: Confocal microscopy showing the expression of somatostatin (SST) in the human retina. As can be appreciated SST expression (in red) is higher in the RPE than in the neuroretina.

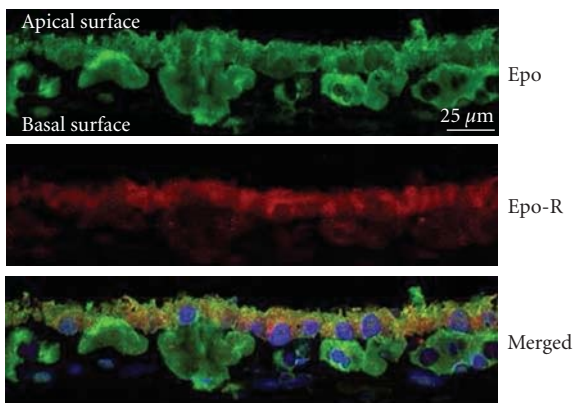
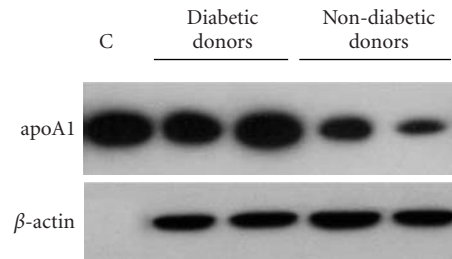


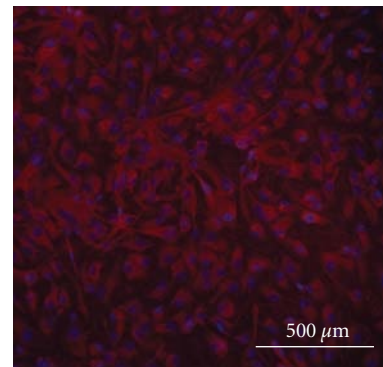
FIGURE 3: Confocal microscopy of human RPE showing the expression of both erythropoietin (Epo) in green and Epo receptor (Epo-R) in red. At the bottom the merged image shows partial colocalization of Epo and Epo-R.

to the RPE. In the RPE retinol is reisolomerized by means of *cis-trans* isomerase to 11-*cis*-retinal and then redelivered to the photoreceptors. The protein RPE65 (retinal pigment epithelium-specific protein 65 kDa) is the protein responsible for isomerization of the all-*trans*-retinaldehyde to its photoactive 11-*cis*-retinaldehyde and is essential for the visual cycle. In this regard, it has been shown that RPE65 mutations cause severe retinal diseases such as Leber congenital amaurosis [55].

There is a great deal of evidence that the transport of retinoids between these cellular compartments is mediated by the interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP), a large glycoprotein synthesized in the photoreceptors and extruded into the interphotoreceptor matrix (IPM) that fills the subretinal space [56–58]. IRBP functions to solubilize



(a)



(b)

FIGURE 4: (a) Immunoblot showing higher protein content of apolipoprotein A1 (apoA1) in RPEs from diabetic donors in comparison with RPEs from nondiabetic donors. (b) Immunofluorescent image of apoA1 (red) in ARPE cells (spontaneously immortalized cell line of human RPE).

retinal and retinol, which are otherwise insoluble in water, and mediates the targeting of these compounds and defines transport direction [59–62]. This role for IRBP is further supported by the observation that IRBP is not only present in the IPM but also in endosomes of the RPE [63]. Transport direction is then defined by the rapid turnover of IRBP between the IPM and the RPE. Apart from participating in the visual cycle, IRBP is important in fatty acid transport and is essential to the maintenance of the photoreceptors [58, 64].

Recently, it has been demonstrated that lower IRBP production is an early event in the human diabetic retina and is associated with retinal neurodegeneration [65, 66]. In addition, the content of cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP), a protein also related to retinoid metabolism, has been found increased in RPE from diabetic subjects with no clinically apparent diabetic retinopathy in comparison with control donors [67].

5. Phagocytosis

Another function in the maintenance of photoreceptor excitability is the phagocytosis of shed photoreceptor outer segments [68–70]. Photoreceptors are exposed to intense levels of light, thus leading to accumulation of photo-damaged proteins and lipids. Thus, during each day, the concentration of light-induced toxic substances increases

inside the photoreceptors [42]. Light transduction by photoreceptors is dependent on the proper functioning and structure of proteins, retinal, and membranes. Therefore, to maintain the excitability of photoreceptors, the photoreceptor outer segments (POSs) undergo a constant renewal process [69, 71, 72]. In this renewal process POSs are newly built from the base of outer segments, at the cilium. The tips of the POS that contain the highest concentration of radicals, photodamaged proteins, and lipids are shed from the photoreceptors. Through coordinated POSs tip shedding and the formation of new POS, a constant length of the POS is maintained. Shed POSs are phagocytosed by the RPE. In the RPE, shed POS are digested and essential molecules, such as docosahexaenoic acid and retinal, are redelivered to photoreceptors to rebuild light-sensitive outer segments from the base of the photoreceptors [69, 73].

An impairment of phagocytosis has been described in long term diabetes [74] and, therefore, it is possible that this could also happen to RPE cells. However, specific studies addressed to this issue are needed.

6. Secretion

The RPE is known to produce and to secrete a variety of growth factors [7, 75] as well as factors that are essential for the maintenance of the structural integrity of the retina [76, 77] and choriocapillaris [78]. Thus, the RPE produces molecules that support the survival of photoreceptors and ensure a structural basis for the optimal circulation and supply of nutrients. The RPE is able to secrete pigment epithelium-derived factor (PEDF) [7, 79, 80], VEGF [7, 81–85], fibroblast growth factors (FGF-1, FGF-2, and FGF-5) [7, 86–91], transforming growth factor- β (TGF- β) [7, 92–94], insulin-like growth factor-I (IGF-I) [95, 96], nerve growth factor (NGF), brain-derived growth factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), ciliary neurotrophic factor (CNTF) [97, 98], platelet-derived growth factor (PDGF) [7, 99, 100], lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) [101], members of the interleukin family [102–104], chemokines, tumor necrosis factor α (TNF- α), colony-stimulating factors (CSF), and different types of tissue inhibitor of matrix metalloprotease (TIMP) [105–110]. Among these factors, PEDF and VEGF seem the most significant.

6.1. PEDF and VEGF. In the healthy eye, the RPE secretes PEDF [7, 80–82], which helps to maintain the retinal as well as the choriocapillaris structure in two ways. PEDF was described as a neuroprotective factor because it was shown to protect neurons against glutamate-induced or hypoxia-induced apoptosis [76, 111, 112]. In addition, PEDF was shown to function as an antiangiogenic factor that inhibited endothelial cell proliferation and stabilized the endothelium of the choriocapillaris [7, 81, 82]. These effects on vascularization also play an important role in the embryonic development of the eye [113, 114]. Using PEDF-deficient (PEDF $^{-/-}$) mice, it has been confirmed that PEDF is an important modulator of early postnatal retinal vascularization and that in its absence retinal vascularization

proceeds at a faster rate and is more susceptible to hyperoxia-mediated vessel obliteration [115].

Another vasoactive factor synthesized by the RPE is VEGF, which is secreted in low concentrations by the RPE in the healthy eye [7, 83, 86] where it prevents endothelial cell apoptosis and is essential for an intact endothelium of the choriocapillaris [116]. VEGF also acts as a permeability factor stabilizing the fenestrations of the endothelium [117]. In a healthy eye, PEDF and VEGF are secreted at opposite sides of the RPE. PEDF is secreted to the apical side where it acts on neurons and photoreceptors whereas most of VEGF is secreted to the basal side where it acts on the choroidal endothelium [118, 119].

Overproduction of VEGF plays an essential role in the development of PDR. The pathogenesis of DME remains to be fully understood but VEGF and proinflammatory cytokines have been involved in its development. Nevertheless, the balance between angiogenic (i.e., VEGF) and antiangiogenic factors (i.e., PEDF) will be crucial for the development of DR. In this regard, advanced glycation end products increase retinal VEGF expression in RPE [120]. Downregulation of PEDF expression by elevated glucose concentration in cultured human RPE cells was also observed [121]. Therefore, strategies in blocking VEGF or stimulating PEDF have been proposed as new therapeutic approaches for DR.

Apart from the factors mentioned above, in recent years new molecules have been found to be synthesized in RPE. Among them, somatostatin, erythropoietin, and ApoA1 seem to be of special interest because they could open up new therapeutic strategies for the treatment of DR.

6.2. Somatostatin. Somatostatin (SST) is a peptide that was originally identified as the hypothalamic factor responsible for inhibition of the release of growth hormone (GH) from the anterior pituitary [122]. Subsequent studies have shown that SST has a much broader spectrum of inhibitory actions and that it is much more widely distributed in the body, occurring not only in many regions of the central nervous system but also in many tissues of the digestive tract, including the stomach, intestine, and pancreas [123]. SST mediates its multiple biologic effects via specific plasma membrane receptors that belong to the family of G-protein-coupled receptors having seven transmembrane domains. So far, five SST receptor subtypes (SSTRs) have been identified (SSTRs 1–5) [124].

In the setting of this review it must be pointed out that SST is produced by the retina of various species, including humans [125–130]. Furthermore, SSTRs are also expressed in the retina, with SSTR1 and SSTR2 being the most widely expressed [127, 131–134]. The production of both SST and its receptors simultaneously suggests an autocrine action in the human retina.

The amount of SST produced by the retina is significant as can be deduced by the strikingly high levels found in the vitreous fluid. In fact, intravitreal levels of SST are higher than in plasma. It must be emphasized that the intravitreal level of total proteins is at least 20-fold less

than in serum [135, 136]. Thus, the higher intravitreal concentration of a particular protein in relation to its plasma levels strongly suggests an important rate of intraocular production. The main source of SST in humans is RPE. Thus, it has been demonstrated that SST expression and content is higher in RPE than in the neuroretina (Figure 2) [137].

The main functions of SST for retinal homeostasis are the following (1) SST acts as a neuromodulator through multiple pathways, including intracellular Ca^{2+} signaling [138], nitric oxide function [139], and glutamate release from the photoreceptors [140]. In addition, a loss in SST immunoreactivity was found after degeneration of the ganglion cells [141]. It should be noted that retinal ganglion cells (RGCs) are the earliest cells affected and have the highest rate of apoptosis in diabetes [137, 142]. This could be because RGCs are more sensitive to hypoxic conditions and glutamate excitotoxicity [143]. Therefore, the neuroretinal damage that occurs in DR might be the reason for the decreased SST levels detected in the vitreous fluid of these patients. In fact we have recently found that low SST expression and production is an early event in DR and is associated with retinal neurodegeneration (apoptosis and glial activation) [137]. (2) SST is an angiostatic factor. SST may reduce endothelial cell proliferation and neovascularisation by multiple mechanisms, including the inhibition of postreceptor signalling events of peptide growth factors such as IGF-I, VEGF, epidermal growth factor (EGF), and PDGF [144]. Using a mouse model of hypoxia-induced retinopathy, it has been demonstrated that in retinas overexpressing subtype 2 receptor of somatostatin (sst2) neovascularization was lower than in wild type retinas [145]. In addition, also using a mouse model of hypoxia-induced retinopathy it has been observed that retinal neovascularization increased in sst(2)-KO mice [146]. Furthermore, both SSTR2- and SSTR3- selective analogues directly inhibit retinal endothelial cell growth in vitro [147, 148]. It is worthy of mention that the intravitreal levels of SST lie within the same range as those showing antiangiogenic effect in experimental studies [149–151]. Therefore, SST can be considered as a good candidate to be added to the list of the natural inhibitors of angiogenesis. (3) SST has been involved in the transport of water and ions. As previously mentioned, various ion/water transport systems are located on the apical side of the RPE, adjacent to the subretinal space, and, indeed, a high expression of SST-R2 has been shown in this apical membrane of the RPE [131]. Nevertheless, the specific mechanisms involved in ion/water transport driven by SST remain to be elucidated.

In DR there is a downregulation of SST that is associated with retinal neurodegeneration [137]. Thus, a lower expression of SST has been found in RPE and neuroretina as well as a dramatic decrease of intravitreal SST levels [137, 152–154]. As a result, the physiological role of SST in preventing both neovascularisation and fluid accumulation within the retina is reduced, and consequently the development of PDR and DME is favoured [153, 154]. In addition, the loss of neuromodulator activity also contributes to neuroretinal damage. For all these reasons, intravitreal injection of SST

analogues or gene therapy has been proposed as a new therapeutic approach in DR [155].

6.3. Erythropoietin. Erythropoietin (Epo) was first described as a glycoprotein produced exclusively in fetal liver and adult kidney that acts as a major regulator of erythropoiesis [156]. However, Epo expression has also been found in the human brain [157] and in the human fetal retina [158]. In recent years, we have demonstrated that not only Epo but also its receptor (Epo-R) is expressed in the adult human retina (Figure 3) [159, 160]. Epo and EpoR mRNAs are significantly higher in RPE than in the neuroretina [160].

In addition, intravitreal levels of Epo are ~3.5-fold higher than those found in plasma [159]. The role of Epo in the retina remains to be elucidated but it seems that it has a potent neuroprotective effect [161, 162]. In this regard, it has been shown that Epo protects cultured neurons from hypoxia and glutamate toxicity [163–165], and its systemic administration reduces neuronal injury in animal models of focal ischemic stroke and inflammation [166–168]. In addition, it has been demonstrated using an in vitro model of bovine blood-brain barrier (BBB) that Epo protects against the VEGF-induced permeability of the BBB and restores the tight junction proteins [169]. Since BRB is structurally and functionally similar to the BBB [170], it is possible that Epo could act as an antipermeability factor in the retina. In fact, Epo was able to improve DME when administered for treatment of anemia in diabetic patients with renal failure [171].

Epo is upregulated in DR [159, 160, 172, 173]. Epo overexpression has been found in both the RPE and neuroretina of diabetic eyes [159, 160]. This is in agreement with the elevated concentrations of Epo found in the vitreous fluid of diabetic patients (~30-fold higher than plasma and ~10-fold higher than in non diabetic subjects) [159]. Hypoxia is a major stimulus for both systemic [156] and intraocular Epo production [174]. In fact, high intravitreal levels of Epo have recently been reported in ischemic retinal diseases such as PDR [159, 172, 173, 175]. In addition, it has been reported that Epo has an angiogenic potential equivalent to VEGF [173, 176]. Therefore, Epo could be an important factor involved in stimulating retinal angiogenesis in PDR. However, intravitreal levels of Epo have been found at a similar range in PDR to that in DME (a condition in which hypoxia is not a predominant event) [159]. In addition, intravitreal Epo levels are not elevated in non diabetic patients with macular edema secondary to retinal vein occlusion [177]. Finally, a higher expression of Epo has been detected in the retinas from diabetic donors at early stages of DR in comparison with non diabetic donors, and this overexpression is unrelated to mRNA expression of hypoxic inducible factors (HIF-1 α and HIF-1 β) [160]. Therefore, stimulating agents other than hypoxia/ischemia are involved in the upregulation of Epo that exists in the diabetic eye.

The reason why Epo is increased in DR remains to be elucidated but the bulk of the available information points to a protective effect rather than a pathogenic effect, at least in the early stages of DR. There have been several

reports on the protective effects of Epo in the retina [175, 178–185]. In addition, Epo is a potent physiologic stimulus for the mobilization of endothelial progenitor cells (EPCs) [186] and, therefore, it could play a relevant role in regulating the traffic of circulating EPCs towards injured retinal sites. Recruitment of EPCs to the pathologic area would be beneficial because their capability of integrating into damaged vasculature can lead to the reendothelization of acellular vessels. It has recently been shown that a reduction of EPCs exists in nonproliferative DR [187] and it has also been demonstrated that EPCs from diabetic donors are less effective in repairing damaged vasculature [188]. In this regard, the increase of intraocular synthesis of Epo that occurs in early stages of DR (i.e., in nonproliferative DR) can be contemplated as a compensatory mechanism for repairing the damage induced by the diabetic milieu through an increase in EPC recruitment. However, in advanced stages of DR (i.e., in the setting of PDR) a dramatic increase of both VEGF [7] and mature EPCs has been detected [187]. In this setting, Epo could potentiate the effects of VEGF, thus contributing to neovascularisation and, in consequence, worsening PDR [181, 189].

The potential advantages of Epo or EpoR agonists in the treatment of DR include neuroprotection, vessel stability, and enhanced recruitment of EPCs to the pathological area. However, as mentioned above, timing is critical since if Epo is given at later hypoxic stages, the severity of DR could even increase. However, in the case of the eye, disease progression is easy to follow without invasive investigation and allows timing of the administration of drugs to be carefully monitored, hopefully resulting in better clinical outcomes.

6.4. Apolipoprotein A1. Apolipoprotein A1 (apoA1) has been recently proposed as a key factor for intraretinal reverse transport of lipids, thus preventing lipid accumulation in the retina [190]. In a proteomic analysis of human vitreous fluid we found that apoA1 was highly intraocularly produced in patients with proliferative DR in comparison with non-diabetic subjects [65]. In addition, we have recently shown higher apoA1 (both mRNA levels and protein) in the retinas from diabetic donors in comparison with non-diabetic donors (Figure 4) [191, 192]. Moreover, apoA1 immunofluorescence was detected in all retinal layers but mRNA was more abundant in RPE [55]. This finding suggests that RPE is the main source of apoA1 in the human retina. These results are consistent with those reported by Li et al. [193] which demonstrated the immunolocalization of apoA1 to Bruch's membrane (a thin connective tissue between the basal surface of the RPE and the choriocapillaris) in postmortem human eye specimens as well as the presence of apoA1 transcripts in the RPE and neural retina. Several independent lines of research indicate that the RPE contains LDL receptors (LDLRs) and/or scavenger receptors by which lipoproteins (LDL) are internalized and serve as a significant supply of lipids to the retina [194–196]. Taken together, the RPE, due to its capacity in internalizing and extruding lipids, can be considered as the most important regulator of lipid transport in the retina.

The reason why apoA1 is overexpressed in the diabetic retina needs to be elucidated but one possibility is that the diabetic milieu stimulates apoA1 production by the retina. In this regard, Kawai et al. [197] observed an increased secretion of apoA1 from the main lacrimal gland in patients with DR, but it was not detected in healthy subjects. In recent years new insights have been gained into the transport of lipids within the retina [190, 194], thus allowing us to hypothesize that the mechanisms regulating intraretinal lipid transport rather than serum levels are more important in the pathogenesis of DR [191, 192, 198]. In this regard, ABCA (ATP binding cassette transporter A1) and apoA1 have been found in several layers of monkey retina, thus suggesting the existence of an intraretinal mechanism to export HDL-like particles [190]. Ishida et al. [199] have demonstrated that HDL stimulates the efflux of radiolabelled lipids, of photoreceptor outer segment origin, from the basal surface of RPE cells in culture. The role of this HDL-based intraretinal lipid transport could be important in preventing lipotoxicity. The fact that the retina is the only neural tissue that has a direct and frequent exposure to light presents a significant problem. This is because many lipids, especially polyunsaturated fatty acids (which are mainly located in the photoreceptor outer segments) and cholesterol esters, are highly susceptible to photo-oxidation and these oxidized lipids become extremely toxic to retinal cells [40]. In DR, this problem could be aggravated by the increase of oxidative stress and lipid peroxidation associated with diabetes. Apart from preventing or arresting lipotoxicity, apoA1 is a potent scavenger of reactive oxygen species [200, 201]; therefore, it could play an important role in protecting the retina from the overall oxidative stress due to diabetes. In this regard, it should be noted that retinopathy has been associated with apoA1 deficiency of genetic origin [202, 203].

Lipoprotein deposition plays an essential role in the pathogenesis of age-related macular degeneration (ARMD) [204, 205], but little is known about the origin of lipoproteins in the retina of diabetic patients and their potential role in the pathogenesis of DR. The role of apoA1 in extruding lipids out of the retina permits us to hypothesize that apoA1 is increased in diabetic patients as a compensatory mechanism in order to prevent the development of DR [67]. In other words, those diabetic patients with less capacity for apoA1 production by the retina would be more prone to develop lipid deposition (hard exudates) in the retina and, in consequence, to initiate DR.

Given that apoA1 has antioxidant properties and prevents lipid deposition in the retina, the design of new treatment strategies addressed to promoting the overexpression of apoA1 in order to reduce the development of DR seems warranted.

7. Concluding Remarks

The RPE lies in the interface between the neural retina and the choriocapillaris where it forms the outer BRB. To retard transepithelium diffusion between cells, the cells of the epithelium are bound together by a partially occluding

seal, the tight junction. The tight junction subdivides the plasma membrane into two functionally distinct domains. The apical membrane faces the photoreceptors of the neural retina, while the basolateral membrane faces the fenestrated choriocapillaris.

As a layer of pigmented cells the RPE absorbs the light energy focused by the lens on the retina. To regulate transport across the monolayer, various pumps, channels, and transporters are distributed specifically to either the apical or the basolateral membrane. The RPE transports ions, water, and metabolic end products from the subretinal space to the blood and, conversely, takes up nutrients such as glucose, retinol, and fatty acids from the blood and delivers these nutrients to the photoreceptors. To maintain photoreceptor excitability retinal is constantly transported from the photoreceptors to the RPE where it is reisolomerized to 11-*cis*-retinal and transported back to the photoreceptors. This is the key component of the visual cycle. Another function that contributes to the maintenance of photoreceptor excitability is the phagocytosis of the shed photoreceptor outer segments. The photoreceptor outer segments are digested, and essential substances such as retinal are recycled and returned to the photoreceptors for rebuilding light-sensitive outer segments from the base of the photoreceptors. In addition, the RPE is able to secrete a variety of growth factors as well as factors that are essential for the maintenance of the structural integrity of the retina and the choriocapillaris. Furthermore, the secretory activity of the RPE plays an important role in establishing the immune privilege of the eye by secreting immunosuppressive factors.

Most investigations into the pathogenesis of DR have been concentrated on the neural retina since this is where clinical lesions are manifested. However, RPE is essential for neuroretina survival and, consequently, for visual function. In recent years, various abnormalities in both the structural and secretory functions of RPE have been found in DR. Therefore, future scenarios involving new therapeutic strategies addressed to modulating RPE impairment are warranted.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Generalitat de Catalunya (2009SGR739) and the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2006-05284). CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III. Marta Villaruel is a recipient of a grant from the Institut de Recerca Hospital Vall d'Hebron.

References

- [1] O. Strauss, "The retinal pigment epithelium in visual function," *Physiological Reviews*, vol. 85, no. 3, pp. 845–881, 2005.
- [2] R. H. Steinberg, "Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina," *Documenta Ophthalmologica*, vol. 60, no. 4, pp. 327–346, 1985.
- [3] G. M. Holtkamp, A. Kijlstra, R. Peek, and A. F. de Vos, "Retinal pigment epithelium-immune system interactions: cytokine production and cytokine-induced changes,"

- Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 20, no. 1, pp. 29–48, 2001.
- [4] N. G. Congdon, D. S. Friedman, and T. Lietman, "Important causes of visual impairment in the world today," *Journal of the American Medical Association*, vol. 290, no. 15, pp. 2057–2060, 2003.
 - [5] S. Lightman and H. M. A. Towler, "Diabetic retinopathy," *Clinical Cornerstone*, vol. 5, no. 2, pp. 12–21, 2003.
 - [6] L. Tong, S. A. Vernon, W. Kiel, V. Sung, and G. M. Orr, "Association of macular involvement with proliferative retinopathy in type 2 diabetes," *Diabetic Medicine*, vol. 18, no. 5, pp. 388–394, 2001.
 - [7] R. Simó, E. Carrasco, M. García-Ramírez, and C. Hernández, "Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy," *Current Diabetes Reviews*, vol. 2, no. 1, pp. 71–98, 2006.
 - [8] A. Jousen, N. Smyth, and C. Niessen, "Pathophysiology of diabetic macular edema," *Developments in Ophthalmology*, vol. 39, pp. 1–12, 2007.
 - [9] Y. Ban and L. J. Rizzolo, "Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium," *Developmental Brain Research*, vol. 121, no. 1, pp. 89–95, 2000.
 - [10] L. Bergersen, E. Jóhannsson, M. L. Veruki, et al., "Cellular and subcellular expression of monocarboxylate transporters in the pigment epithelium and retina of the rat," *Neuroscience*, vol. 90, no. 1, pp. 319–331, 1999.
 - [11] P. deS Senanayake, A. Calabro, J. G. Hu, et al., "Glucose utilization by the retinal pigment epithelium: evidence for rapid uptake and storage in glycogen, followed by glycogen utilization," *Experimental Eye Research*, vol. 83, no. 2, pp. 235–246, 2006.
 - [12] W. Baehr, S. M. Wu, A. C. Bird, and K. Palczewski, "The retinoid cycle and retina disease," *Vision Research*, vol. 43, no. 28, pp. 2957–2958, 2003.
 - [13] N. G. Bazan, W. C. Gordon, and E. B. Rodriguez de Turco, "Docosahexaenoic acid uptake and metabolism in photoreceptors: retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 318, pp. 295–306, 1992.
 - [14] R. E. Anderson, P. J. O'Brien, R. D. Wiegand, C. A. Koutz, and A. M. Stinson, "Conservation of docosahexaenoic acid in the retina," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 318, pp. 285–294, 1992.
 - [15] P. K. Mukherjee, V. L. Marcheselli, C. N. Serhan, and N. G. Bazan, "Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 22, pp. 8491–8496, 2004.
 - [16] N. G. Bazan, "Neurotrophins induce neuroprotective signaling in the retinal pigment epithelial cell by activating the synthesis of the anti-inflammatory and anti-apoptotic neuroprotectin d1," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 613, pp. 39–44, 2008.
 - [17] D.-I. Kim, S.-K. Lim, M.-J. Park, H.-J. Han, G.-Y. Kim, and S. H. Park, "The involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in high glucose-induced downregulation of GLUT-1 expression in ARPE cells," *Life Sciences*, vol. 80, no. 7, pp. 626–632, 2007.
 - [18] R. Salceda and C. Contreras-Cubas, "Ascorbate uptake in normal and diabetic rat retina and retinal pigment

- epithelium," *Comparative Biochemistry and Physiology C*, vol. 146, no. 1-2, pp. 175–179, 2007.
- [19] A. Minamizono, M. Tomi, and K.-I. Hosoya, "Inhibition of dehydroascorbic acid transport across the rat blood-retinal and -brain barriers in experimental diabetes," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 29, no. 10, pp. 2148–2150, 2006.
- [20] A. D. Marmorstein, "The polarity of the retinal pigment epithelium," *Traffic*, vol. 2, no. 12, pp. 867–872, 2001.
- [21] T. J. Ostwald and R. H. Steinberg, "Localization of frog retinal pigment epithelium Na^+ - K^+ ATPase," *Experimental Eye Research*, vol. 31, no. 3, pp. 351–360, 1980.
- [22] L. J. Rizzolo, "The distribution of Na^+ , K^+ -ATPase in the retinal pigmented epithelium from chicken embryo is polarized in vivo but not in primary cell culture," *Experimental Eye Research*, vol. 51, no. 4, pp. 435–446, 1990.
- [23] L. J. Rizzolo, "Polarization of the Na^+ , K^+ -ATPase in epithelia derived from the neuroepithelium," *International Review of Cytology*, vol. 185, pp. 195–235, 1999.
- [24] S. Hamann, "Molecular mechanisms of water transport in the eye," *International Review of Cytology*, vol. 215, pp. 395–431, 2002.
- [25] H. Moseley, W. S. Foulds, D. Allan, and P. M. Kyle, "Routes of clearance of radioactive water from the rabbit vitreous," *British Journal of Ophthalmology*, vol. 68, no. 3, pp. 145–151, 1984.
- [26] E. A. Nagelhus, Y. Horio, A. Inanobe, et al., "Immunogold evidence suggests that coupling of K^+ siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains," *GLIA*, vol. 26, no. 1, pp. 47–54, 1999.
- [27] D. A. Frambach, C. E. Roy, J. L. Valentine, and J. J. Weiter, "Precocious retinal adhesion is affected by furosemide and ouabain," *Current Eye Research*, vol. 8, no. 6, pp. 553–556, 1989.
- [28] J. G. Hu, R. P. Gallemore, D. Bok, and D. A. Frambach, "Chloride transport in cultured fetal human retinal pigment epithelium," *Experimental Eye Research*, vol. 62, no. 4, pp. 443–448, 1996.
- [29] M. F. Marmor, "Control of subretinal fluid: experimental and clinical studies," *Eye*, vol. 4, part 2, pp. 340–344, 1990.
- [30] S. S. Miller and J. L. Edelman, "Active ion transport pathways in the bovine retinal pigment epithelium," *Journal of Physiology*, vol. 424, pp. 283–300, 1990.
- [31] Y. Ban and L. J. Rizzolo, "Differential regulation of tight junction permeability during development of the retinal pigment epithelium," *American Journal of Physiology*, vol. 279, no. 3, pp. C744–C750, 2000.
- [32] K. K. Erickson, J. M. Sundstrom, and D. A. Antonetti, "Vascular permeability in ocular disease and the role of tight junctions," *Angiogenesis*, vol. 10, no. 2, pp. 103–117, 2007.
- [33] S. S. Miller and R. H. Steinberg, "Active transport of ions across frog retinal pigment epithelium," *Experimental Eye Research*, vol. 25, no. 3, pp. 235–248, 1977.
- [34] S. S. Miller and R. H. Steinberg, "Passive ionic properties of frog retinal pigment epithelium," *Journal of Membrane Biology*, vol. 36, no. 4, pp. 337–372, 1977.
- [35] S. Hamann, T. Zeuthen, M. La Cour, et al., "Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1–5 in human and rat eye," *American Journal of Physiology*, vol. 274, no. 5, pp. C1332–C1345, 1998.
- [36] W. D. Stamer, D. Bok, J. Hu, G. J. Jaffe, and B. S. McKay, "Aquaporin-1 channels in human retinal pigment epithelium: role in transepithelial water movement," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 44, no. 6, pp. 2803–2808, 2003.
- [37] A. S. Verkman, J. Ruiz-Ederra, and M. H. Levin, "Functions of aquaporins in the eye," *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 27, no. 4, pp. 420–433, 2008.
- [38] M. Villarroel, M. García-Ramírez, L. Corraliza, C. Hernández, and R. Simó, "Effects of high glucose concentration on the barrier function and the expression of tight junction proteins in human retinal pigment epithelial cells," *Experimental Eye Research*, vol. 89, no. 6, pp. 913–920, 2009.
- [39] J. Y. Crider, T. Yorio, N. A. Sharif, and B. W. Griffin, "The effects of elevated glucose on Na^+ / K^+ -ATPase of cultured bovine retinal pigment epithelial cells measured by a new nonradioactive rubidium uptake assay," *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, vol. 13, no. 4, pp. 337–352, 1997.
- [40] A. W. Girotti and T. Kriska, "Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 6, no. 2, pp. 301–310, 2004.
- [41] S. Beatty, M. Boulton, D. Henson, H.-H. Koh, and I. J. Murray, "Macular pigment and age related macular degeneration," *British Journal of Ophthalmology*, vol. 83, no. 7, pp. 867–877, 1999.
- [42] S. Beatty, H.-H. Koh, M. Phil, D. Henson, and M. Boulton, "The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration," *Survey of Ophthalmology*, vol. 45, no. 2, pp. 115–134, 2000.
- [43] S. Beatty, I. J. Murray, D. B. Henson, D. Carden, H.-H. Koh, and M. E. Boulton, "Macular pigment and risk for age-related macular degeneration in subjects from a northern European population," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 42, no. 2, pp. 439–446, 2001.
- [44] R. N. Frank, R. H. Amin, and J. E. Puklin, "Antioxidant enzymes in the macular retinal pigment epithelium of eyes with neovascular age-related macular degeneration," *American Journal of Ophthalmology*, vol. 127, no. 6, pp. 694–709, 1999.
- [45] M. V. Miceli, M. R. Liles, and D. A. Newsome, "Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis," *Experimental Cell Research*, vol. 214, no. 1, pp. 242–249, 1994.
- [46] D. A. Newsome, E. P. Dobard, M. R. Liles, and P. D. Oliver, "Human retinal pigment epithelium contains two distinct species of superoxide dismutase," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 31, no. 12, pp. 2508–2513, 1990.
- [47] P. D. Oliver and D. A. Newsome, "Mitochondrial superoxide dismutase in mature and developing human retinal pigment epithelium," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 33, no. 6, pp. 1909–1918, 1992.
- [48] D. J. Tate Jr., M. V. Miceli, and D. A. Newsome, "Phagocytosis and H_2O_2 induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 36, no. 7, pp. 1271–1279, 1995.
- [49] D. A. Newsome, M. V. Miceli, M. R. Liles, D. J. Tate Jr., and P. D. Oliver, "Antioxidants in the retinal pigment epithelium," *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 13, no. 1, pp. 101–123, 1994.
- [50] M. Kanwar, P.-S. Chan, T. S. Kern, and R. A. Kowluru, "Oxidative damage in the retinal mitochondria of diabetic mice: possible protection by superoxide dismutase," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 48, no. 8, pp. 3805–3811, 2007.

- [51] S. A. Madsen-Bouterse and R. A. Kowluru, "Oxidative stress and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives," *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, vol. 9, no. 4, pp. 315–327, 2008.
- [52] K. C. Silva, M. A. B. Rosales, S. K. Biswas, J. B. Lopes de Faria, and J. M. Lopes de Faria, "Diabetic retinal neurodegeneration is associated with mitochondrial oxidative stress and is improved by an angiotensin receptor blocker in a model combining hypertension and diabetes," *Diabetes*, vol. 58, no. 6, pp. 1382–1390, 2009.
- [53] A. Minamizono, M. Tomi, and K.-I. Hosoya, "Inhibition of dehydroascorbic acid transport across the rat blood-retinal and -brain barriers in experimental diabetes," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 29, no. 10, pp. 2148–2150, 2006.
- [54] P. A. Hargrave, "Rhodopsin structure, function, and topography: the Friedenwald lecture," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 42, no. 1, pp. 3–9, 2001.
- [55] J.-J. Pang, B. Chang, A. Kumar, et al., "Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 leber congenital amaurosis," *Molecular Therapy*, vol. 13, no. 3, pp. 565–572, 2006.
- [56] F. Gonzalez-Fernandez, "Interphotoreceptor retinoid-binding protein—an old gene for new eyes," *Vision Research*, vol. 43, no. 28, pp. 3021–3036, 2003.
- [57] Q. Wu, L. R. Blakeley, M. C. Cornwall, R. K. Crouch, B. N. Wiggert, and Y. Koutalos, "Interphotoreceptor retinoid-binding protein is the physiologically relevant carrier that removes retinol from rod photoreceptor outer segments," *Biochemistry*, vol. 46, no. 29, pp. 8669–8679, 2007.
- [58] F. Gonzalez-Fernandez and D. Ghosh, "Focus on molecules: interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)," *Experimental Eye Research*, vol. 86, no. 2, pp. 169–170, 2008.
- [59] T.-I. L. Okajima, D. R. Pepperberg, H. Ripps, B. Wiggert, and G. J. Chader, "Interphotoreceptor retinoid-binding: role in delivery of retinol to the pigment epithelium," *Experimental Eye Research*, vol. 49, no. 4, pp. 629–644, 1989.
- [60] T.-I. L. Okajima, D. R. Pepperberg, H. Ripps, B. Wiggert, and G. J. Chader, "Interphotoreceptor retinoid-binding protein promotes rhodopsin regeneration in toad photoreceptors," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 17, pp. 6907–6911, 1990.
- [61] D. R. Pepperberg, T. L. Okajima, H. Ripps, G. J. Chader, and B. Wiggert, "Functional properties of interphotoreceptor retinoid-binding protein," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 54, no. 6, pp. 1057–1060, 1991.
- [62] D. R. Pepperberg, T.-I. L. Okajima, B. Wiggert, H. Ripps, R. K. Crouch, and G. J. Chader, "Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)—molecular biology and physiological role in the visual cycle of rhodopsin," *Molecular Neurobiology*, vol. 7, no. 1, pp. 61–84, 1993.
- [63] L. L. Cunningham and F. Gonzalez-Fernandez, "Internalization of interphotoreceptor retinoid-binding protein by the *Xenopus* retinal pigment epithelium," *Journal of Comparative Neurology*, vol. 466, no. 3, pp. 331–342, 2003.
- [64] G. I. Liou, Y. Fei, N. S. Peachey, et al., "Early onset photoreceptor abnormalities induced by targeted disruption of the interphotoreceptor retinoid-binding protein gene," *Journal of Neuroscience*, vol. 18, no. 12, pp. 4511–4520, 1998.
- [65] M. García-Ramírez, F. Canals, C. Hernández, et al., "Proteomic analysis of human vitreous fluid by fluorescence-based difference gel electrophoresis (DIGE): a new strategy for identifying potential candidates in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy," *Diabetologia*, vol. 50, no. 6, pp. 1294–1303, 2007.
- [66] M. García-Ramírez, C. Hernández, M. Villarreal, et al., "Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) is downregulated at early stages of diabetic retinopathy," *Diabetologia*, vol. 52, no. 12, pp. 2633–2641, 2009.
- [67] A. Decanini, P. R. Karunadharm, C. L. Nordgaard, X. Feng, T. W. Olsen, and D. A. Ferrington, "Human retinal pigment epithelium proteome changes in early diabetes," *Diabetologia*, vol. 51, no. 6, pp. 1051–1061, 2008.
- [68] E. Bosch, J. Horwitz, and D. Bok, "Phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium: phagosome-lysosome interaction," *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 41, no. 2, pp. 253–263, 1993.
- [69] D. Bok, "The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision," *Journal of Cell Science*, vol. 17, pp. 189–195, 1993.
- [70] S. C. Finnemann, "Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors," *The EMBO Journal*, vol. 22, no. 16, pp. 4143–4154, 2003.
- [71] R. H. Steinberg, "Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina," *Documenta Ophthalmologica*, vol. 60, no. 4, pp. 327–346, 1985.
- [72] J. Nguyen-Legros and D. Hicks, "Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium," *International Review of Cytology*, vol. 196, pp. 245–313, 2000.
- [73] C. Bibb and R. W. Young, "Renewal of fatty acids in the membranes of visual cell outer segments," *Journal of Cell Biology*, vol. 61, no. 2, pp. 327–343, 1974.
- [74] B.-F. Liu, S. Miyata, H. Kojima, et al., "Low phagocytic activity of resident peritoneal macrophages in diabetic mice: relevance to the formation of advanced glycation end products," *Diabetes*, vol. 48, no. 10, pp. 2074–2082, 1999.
- [75] H. Tanihara, M. Inatani, and Y. Honda, "Growth factors and their receptors in the retina and pigment epithelium," *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 16, no. 2, pp. 271–301, 1997.
- [76] W. Cao, J. Tombran-Tink, W. Chen, D. Mrazek, R. Elias, and J. F. McGinnis, "Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 57, no. 6, pp. 789–800, 1999.
- [77] F. R. Steele, G. J. Chader, L. V. Johnson, and J. Tombran-Tink, "Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 4, pp. 1526–1530, 1993.
- [78] A. N. Witmer, G. F. J. M. Vrensen, C. J. F. Van Noorden, and R. O. Schlingemann, "Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease," *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 22, no. 1, pp. 1–29, 2003.
- [79] D. W. Dawson, O. V. Volpert, P. Gillis, et al., "Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis," *Science*, vol. 285, no. 5425, pp. 245–248, 1999.
- [80] G. L. King and K. Suzuma, "Pigment-epithelium-derived factor—a key coordinator of retinal neuronal and vascular functions," *The New England Journal of Medicine*, vol. 342, no. 5, pp. 349–351, 2000.
- [81] A. P. Adamis, D. T. Shima, K.-T. Yeo, et al., "Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 193, no. 2, pp. 631–638, 1993.

- [82] P. F. Lopez, B. D. Sippy, H. M. Lambert, A. B. Thach, and D. R. Hinton, "Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 37, no. 5, pp. 855–868, 1996.
- [83] M. Lu, M. Kuroki, S. Amano, et al., "Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 101, no. 6, pp. 1219–1224, 1998.
- [84] A. N. Witmer, G. F. J. M. Vrensen, C. J. F. Van Noorden, and R. O. Schlingemann, "Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease," *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 22, no. 1, pp. 1–29, 2003.
- [85] B. Wirosko, T. Y. Wong, and R. Simó, "Vascular endothelial growth factor and diabetic complications," *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 27, no. 6, pp. 608–621, 2008.
- [86] M. D. Sternfeld, J. E. Robertson, G. D. Shipley, J. Tsai, and J. T. Rosenbaum, "Cultured human retinal pigment epithelial cells express basic fibroblast growth factor and its receptor," *Current Eye Research*, vol. 8, no. 10, pp. 1029–1037, 1989.
- [87] L. M. Bost, A. E. Aotaki-Keen, and L. M. Hjelmeland, "Coexpression of FGF-5 and bFGF by the retinal pigment epithelium in vitro," *Experimental Eye Research*, vol. 55, no. 5, pp. 727–734, 1992.
- [88] T. Kitaoka, L. M. Bost, H. Ishigooka, A. E. Aotaki-Keen, and L. M. Hjelmeland, "Increasing cell density down-regulates the expression of acidic FGF by human RPE cells in vitro," *Current Eye Research*, vol. 12, no. 11, pp. 993–999, 1993.
- [89] L. M. Bosta, A. E. Aotaki-Keen, and L. M. Hjelmeland, "Cellular adhesion regulates bFGF gene expression in human retinal pigment epithelial cells," *Experimental Eye Research*, vol. 58, no. 5, pp. 545–552, 1994.
- [90] T. Kitaoka, A. E. Aotaki-Keen, and L. M. Hjelmeland, "Distribution of FGF-5 in the rhesus macaque retina," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 35, no. 8, pp. 3189–3198, 1994.
- [91] K. C. Dunn, A. D. Marmorstein, V. L. Bonilha, E. Rodriguez-Boulan, F. Giordano, and L. M. Hjelmeland, "Use of the ARPE-19 cell line as a model of RPE polarity: basolateral secretion of FGF5," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 39, no. 13, pp. 2744–2749, 1998.
- [92] A. Kvanta, "Expression and secretion of transforming growth factor- β in transformed and nontransformed retinal pigment epithelial cells," *Ophthalmic Research*, vol. 26, no. 6, pp. 361–367, 1994.
- [93] M. Matsumoto, N. Yoshimura, and Y. Honda, "Increased production of transforming growth factor- β 2 from cultured human retinal pigment epithelial cells by photocoagulation," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 35, no. 13, pp. 4245–4252, 1994.
- [94] H. Tanihara, M. Yoshida, M. Matsumoto, and N. Yoshimura, "Identification of transforming growth factor- β expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 34, no. 2, pp. 413–419, 1993.
- [95] D. M. Martin, D. Yee, and E. L. Feldman, "Gene expression of the insulin-like growth factors and their receptors in cultured human retinal pigment epithelial cells," *Brain Research*, vol. 12, no. 1–3, pp. 181–186, 1992.
- [96] M. G. Slomiany and S. A. Rosenzweig, "Autocrine effects of IGF-I-induced VEGF and IGFBP-3 secretion in retinal pigment epithelial cell line ARPE-19," *American Journal of Physiology*, vol. 287, no. 3, pp. C746–C753, 2004.
- [97] W. Cao, R. Wen, F. Li, M. M. Lavail, and R. H. Steinberg, "Mechanical injury increases bFGF and CNTF mRNA expression in the mouse retina," *Experimental Eye Research*, vol. 65, no. 2, pp. 241–248, 1997.
- [98] N. Walsh, K. Valter, and J. Stone, "Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina," *Experimental Eye Research*, vol. 72, no. 5, pp. 495–501, 2001.
- [99] P. A. Campochiaro, S. F. Hackett, S. A. Viores, et al., "Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells," *Journal of Cell Science*, vol. 107, no. 9, pp. 2459–2469, 1994.
- [100] P. A. Campochiaro, R. Sugg, G. Grotendorst, and L. M. Hjelmeland, "Retinal pigment epithelial cells produce PDGF-like proteins and secrete them into their media," *Experimental Eye Research*, vol. 49, no. 2, pp. 217–227, 1989.
- [101] P. Ahuja, A. R. Caffé, I. Holmqvist, et al., "Lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) delays photoreceptor degeneration in explants of rd/rd mouse retina," *NeuroReport*, vol. 12, no. 13, pp. 2951–2955, 2001.
- [102] H. Wenkel and J. W. Streilein, "Evidence that retinal pigment epithelium functions as an immune-privileged tissue," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 41, no. 11, pp. 3467–3473, 2000.
- [103] J. W. Streilein, N. Ma, H. Wenkel, T. F. Ng, and P. Zamiri, "Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants," *Vision Research*, vol. 42, no. 4, pp. 487–495, 2002.
- [104] K. Ishida, N. Panjwani, Z. Cao, and J. W. Streilein, "Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms," *Ocular Immunology and Inflammation*, vol. 11, no. 2, pp. 91–105, 2003.
- [105] J. P. Alexander, J. M. B. Bradley, J. D. Gabourel, and T. S. Acott, "Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human retinal pigment epithelium," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 31, no. 12, pp. 2520–2528, 1990.
- [106] A. Ruiz, P. Brett, and D. Bok, "TIMP-3 is expressed in the human retinal pigment epithelium," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 226, no. 2, pp. 467–474, 1996.
- [107] N. G. Della, P. A. Campochiaro, and D. J. Zack, "Localization of TIMP-3 mRNA expression to the retinal pigment epithelium," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 37, no. 9, pp. 1921–1924, 1996.
- [108] L. C. Padgett, G.-M. Lui, Z. Werb, and M. M. Lavail, "Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: vectorial secretion and regulation," *Experimental Eye Research*, vol. 64, no. 6, pp. 927–938, 1997.
- [109] W. Eichler, U. Friedrichs, A. Thies, C. Tratz, and P. Wiedemann, "Modulation of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression by cytokines in human RPE cells," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 43, no. 8, pp. 2767–2773, 2002.
- [110] J. H. Qi, Q. Ebrahim, N. Moore, et al., "A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2," *Nature Medicine*, vol. 9, no. 4, pp. 407–415, 2003.
- [111] N. Ogata, L. Wang, N. Jo, et al., "Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal

- injury," *Current Eye Research*, vol. 22, no. 4, pp. 245–252, 2001.
- [112] W. Cao, J. Tombran-Tink, R. Elias, S. Sezate, D. Mrazek, and J. F. McGinnis, "In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 42, no. 7, pp. 1646–1652, 2001.
- [113] K. C. Behling, E. M. Surace, and J. Bennett, "Pigment epithelium-derived factor expression in the developing mouse eye," *Molecular Vision*, vol. 8, pp. 449–454, 2002.
- [114] M. M. Jablonski, J. Tombran-Tink, D. A. Mrazek, and A. Iannaccone, "Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal," *Journal of Neuroscience*, vol. 20, no. 19, pp. 7149–7157, 2000.
- [115] Q. Huang, S. Wang, C. M. Sorenson, and N. Sheibani, "PEDF-deficient mice exhibit an enhanced rate of retinal vascular expansion and are more sensitive to hyperoxia-mediated vessel obliteration," *Experimental Eye Research*, vol. 87, no. 3, pp. 226–241, 2008.
- [116] M. S. Burns and M. J. Hartz, "The retinal pigment epithelium induces fenestration of endothelial cells in vivo," *Current Eye Research*, vol. 11, no. 9, pp. 863–873, 1992.
- [117] W. G. Roberts and G. E. Palade, "Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor," *Journal of Cell Science*, vol. 108, no. 6, pp. 2369–2379, 1995.
- [118] S. P. Becerra, R. N. Fariss, Y. Q. Wu, L. M. Montuenga, P. Wong, and B. A. Pfeffer, "Pigment epithelium-derived factor in the monkey retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: apical secretion and distribution," *Experimental Eye Research*, vol. 78, no. 2, pp. 223–234, 2004.
- [119] H. G. T. Blaauwgeers, G. M. Holtkamp, H. Rutten, et al., "Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris: evidence for a trophic paracrine relation," *American Journal of Pathology*, vol. 155, no. 2, pp. 421–428, 1999.
- [120] M. Lu, M. Kuroki, S. Amano, et al., "Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 101, no. 6, pp. 1219–1224, 1998.
- [121] Y. Yao, M. Guan, X. Q. Zhao, and Y. F. Huang, "Downregulation of the pigment epithelium derived factor by hypoxia and elevated glucose concentration in cultured human retinal pigment epithelial cells," *Zhonghua yi xue za zhi*, vol. 83, no. 22, pp. 1989–1992, 2003.
- [122] P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus, et al., "Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone," *Science*, vol. 179, no. 4068, pp. 77–79, 1973.
- [123] S. Reichlin, "Somatostatin. (First of two parts)," *The New England Journal of Medicine*, vol. 309, no. 24, pp. 1495–1501, 1983.
- [124] Y. C. Patel, M. T. Greenwood, A. Warszynska, R. Panetta, and C. B. Srikant, "All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 198, no. 2, pp. 605–612, 1994.
- [125] K. Yamaguchi, V. P. Gaur, A. W. Spira, and J. E. Turner, "Cellular localization of somatostatin mRNA in rat retina," *Neuropeptides*, vol. 17, no. 1, pp. 13–16, 1990.
- [126] J. N. Larsen, "Somatostatin in the retina," *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, no. 218, pp. 1–24, 1995.
- [127] J. Johnson, D. W. Rickman, and N. C. Brecha, "Somatostatin and somatostatin subtype 2A expression in the mammalian retina," *Microscopy Research and Technique*, vol. 50, no. 2, pp. 103–111, 2000.
- [128] O. P. Rorstad, M. K. Senterman, K. M. Hoyte, and J. B. Martin, "Immunoreactive and biologically active somatostatin-like material in the human retina," *Brain Research*, vol. 199, no. 2, pp. 488–492, 1980.
- [129] S. M. Sagar and P. E. Marshall, "Somatostatin-like immunoreactive material in associational ganglion cells of human retina," *Neuroscience*, vol. 27, no. 2, pp. 507–516, 1988.
- [130] P. M. Van Hagen, G. S. Baarsma, C. M. Mooy, et al., "Somatostatin and somatostatin receptors in retinal diseases," *European Journal of Endocrinology*, vol. 143, supplement 1, pp. S43–S51, 2000.
- [131] A. C. Lambooi, R. W. A. M. Kuijpers, E. G. R. Van Lichtenauer-Kaligis, et al., "Somatostatin receptor 2A expression in choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 41, no. 8, pp. 2329–2335, 2000.
- [132] L. Helboe and M. Moller, "Immunohistochemical localization of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2 in the rat retina," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 40, no. 10, pp. 2376–2382, 1999.
- [133] D. D. Klisovic, M. S. O'Dorisio, S. E. Katz, et al., "Somatostatin receptor gene expression in human ocular tissues: RT-PCR and immunohistochemical study," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 42, no. 10, pp. 2193–2201, 2001.
- [134] D. Cervia, G. Casini, and P. Bagnoli, "Physiology and pathology of somatostatin in the mammalian retina: a current view," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 286, no. 1–2, pp. 112–122, 2008.
- [135] R. Burgos, C. Mateo, A. Cantón, C. Hernández, J. Mesa, and R. Simó, "Vitreous levels of IGF-I, IGF binding protein 1, and IGF binding protein 3 in proliferative diabetic retinopathy: a case-control study," *Diabetes Care*, vol. 23, no. 1, pp. 80–83, 2000.
- [136] C. Hernández, R. Burgos, A. Cantón, J. García-Arumí, R. M. Segura, and R. Simó, "Vitreous levels of vascular cell adhesion molecule and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy: a case-control study," *Diabetes Care*, vol. 24, no. 3, pp. 516–521, 2001.
- [137] E. Carrasco, C. Hernández, A. Miralles, P. Hugué, J. Farrés, and R. Simó, "Lower somatostatin expression is an early event in diabetic retinopathy and is associated with retinal neurodegeneration," *Diabetes Care*, vol. 30, no. 11, pp. 2902–2908, 2007.
- [138] J. Johnson, M. L. Caravelli, and N. C. Brecha, "Somatostatin inhibits calcium influx into rat rod bipolar cell axonal terminals," *Visual Neuroscience*, vol. 18, no. 1, pp. 101–108, 2001.
- [139] A. Vasilaki, R. Gardette, J. Epelbaum, and K. Thermos, "NADPH-diaphorase colocalization with somatostatin receptor subtypes sst2A and sst2B in the retina," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 42, no. 7, pp. 1600–1609, 2001.
- [140] A. Akopian, J. Johnson, R. Gabriel, N. Brecha, and P. Witkovsky, "Somatostatin modulates voltage-gated K^+ and Ca^{2+} currents in rod and cone photoreceptors of the

- salamander retina," *Journal of Neuroscience*, vol. 20, no. 3, pp. 929–936, 2000.
- [141] N. Lake and Y. C. Patel, "Neurotoxic agents reduce retinal somatostatin," *Brain Research*, vol. 181, no. 1, pp. 234–236, 1980.
- [142] T. S. Kern and A. J. Barber, "Retinal ganglion cells in diabetes," *Journal of Physiology*, vol. 586, no. 18, pp. 4401–4408, 2008.
- [143] X. Luo, G. N. Lambrou, J. A. Sahel, and D. Hicks, "Hypoglycemia induces general neuronal death, whereas hypoxia and glutamate transport blockade lead to selective retinal ganglion cell death in vitro," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 42, no. 11, pp. 2695–2705, 2001.
- [144] M. I. Davis, S. H. Wilson, and M. B. Grant, "The therapeutic problem of proliferative diabetic retinopathy: targeting somatostatin receptors," *Hormone and Metabolic Research*, vol. 33, no. 5, pp. 295–299, 2001.
- [145] C. Ristori, M. E. Ferretti, B. Pavan, et al., "Adenylyl cyclase/cAMP system involvement in the antiangiogenic effect of somatostatin in the retina. Results from transgenic mice," *Neurochemical Research*, vol. 33, no. 7, pp. 1247–1255, 2008.
- [146] M. Dal Monte, M. Cammalleri, D. Martini, G. Casini, and P. Bagnoli, "Antiangiogenic role of somatostatin receptor 2 in a model of hypoxia-induced neovascularization in the retina: results from transgenic mice," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 48, no. 8, pp. 3480–3489, 2007.
- [147] S. H. Wilson, M. I. Davis, S. Caballero, and M. B. Grant, "Modulation of retinal endothelial cell behaviour by insulin-like growth factor I and somatostatin analogues: implications for diabetic retinopathy," *Growth Hormone and IGF Research*, vol. 11, supplement 1, pp. S53–S59, 2001.
- [148] L. E. H. Smith, W. Shen, C. Perruzzi, et al., "Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor," *Nature Medicine*, vol. 5, no. 12, pp. 1390–1395, 1999.
- [149] B. Mallet, B. Vialettes, S. Haroche, et al., "Stabilisation of severe proliferative diabetic retinopathy by long-term treatment with SMS 201-995," *Diabete et Metabolisme*, vol. 18, no. 6, pp. 438–444, 1992.
- [150] B. O. Boehm, G. K. Lang, P. M. Jehle, B. Feldmann, and G. E. Lang, "Octreotide reduces vitreous hemorrhage and loss of visual acuity risk in patients with high-risk proliferative diabetic retinopathy," *Hormone and Metabolic Research*, vol. 33, no. 5, pp. 300–306, 2001.
- [151] A. Baldysiak-Figiel, G. K. Lang, J. Kampmeier, and G. E. Lang, "Octreotide prevents growth factor-induced proliferation of bovine retinal endothelial cells under hypoxia," *Journal of Endocrinology*, vol. 180, no. 3, pp. 417–424, 2004.
- [152] R. Simó, A. Lecube, L. Sararols, et al., "Deficit of somatostatin-like immunoreactivity in the vitreous fluid of diabetic patients. Possible role in the development of proliferative diabetic retinopathy," *Diabetes Care*, vol. 25, no. 12, pp. 2282–2286, 2002.
- [153] C. Hernández, E. Carrasco, R. Casamitjana, R. Deulofeu, J. García-Arumí, and R. Simó, "Somatostatin molecular variants in the vitreous fluid: a comparative study between diabetic patients with proliferative diabetic retinopathy and nondiabetic control subjects," *Diabetes Care*, vol. 28, no. 8, pp. 1941–1947, 2005.
- [154] R. Simó, E. Carrasco, A. Fonollosa, J. García-Arumí, R. Casamitjana, and C. Hernández, "Deficit of somatostatin in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema," *Diabetes Care*, vol. 30, no. 3, pp. 725–727, 2007.
- [155] C. Hernández and R. Simó, "Strategies for blocking angiogenesis in diabetic retinopathy: from basic science to clinical practice," *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 16, no. 8, pp. 1209–1226, 2007.
- [156] J. W. Fisher, "Erythropoietin: physiology and pharmacology update," *Experimental Biology and Medicine*, vol. 228, no. 1, pp. 1–14, 2003.
- [157] H. H. Marti, "Erythropoietin and the hypoxic brain," *Journal of Experimental Biology*, vol. 207, no. 18, pp. 3233–3242, 2004.
- [158] S. E. Juul, A. T. Yachnis, and R. D. Christensen, "Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus," *Early Human Development*, vol. 52, no. 3, pp. 235–249, 1998.
- [159] C. Hernández, A. Fonollosa, M. García-Ramírez, et al., "Erythropoietin is expressed in the human retina and it is highly elevated in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema," *Diabetes Care*, vol. 29, no. 9, pp. 2028–2033, 2006.
- [160] M. García-Ramírez, C. Hernández, and R. Simó, "Expression of erythropoietin and its receptor in the human retina: a comparative study of diabetic and nondiabetic subjects," *Diabetes Care*, vol. 31, no. 6, pp. 1189–1194, 2008.
- [161] W. Jelkmann, "Effects of erythropoietin on brain function," *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 6, no. 1, pp. 65–79, 2005.
- [162] S. P. Becerra and J. Amaral, "Erythropoietin—an endogenous retinal survival factor," *The New England Journal of Medicine*, vol. 347, no. 24, pp. 1968–1970, 2002.
- [163] M. Kawakami, M. Sekiguchi, K. Sato, S. Kozaki, and M. Takahashi, "Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 42, pp. 39469–39475, 2001.
- [164] M. Yamasaki, H. K. Mishima, H. Yamashita, et al., "Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells," *Brain Research*, vol. 1050, no. 1–2, pp. 15–26, 2005.
- [165] L. Danielyan, L. Mueller, B. Proksch, et al., "Similar protective effects of BQ-123 and erythropoietin on survival of neural cells and generation of neurons upon hypoxic injury," *European Journal of Cell Biology*, vol. 84, no. 11, pp. 907–913, 2005.
- [166] A. K. Junk, A. Mammis, S. I. Savitz, et al., "Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 16, pp. 10659–10664, 2002.
- [167] E. Kilic, U. Kilic, J. Soliz, C. L. Bassetti, M. Gassmair, and D. M. Hermann, "Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways," *The FASEB Journal*, vol. 19, no. 14, pp. 2026–2028, 2005.
- [168] D. Agnello, P. Bigini, P. Villa, et al., "Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis," *Brain Research*, vol. 952, no. 1, pp. 128–134, 2002.
- [169] O. M. Martínez-Estrada, E. Rodríguez-Millan, E. Gonzalez-de Vicente, M. Reina, S. Vilaro, and M. Fabre, "Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability," *European Journal of Neuroscience*, vol. 18, no. 9, pp. 2538–2544, 2003.
- [170] K.-I. Hosoya and M. Tomi, "Advances in the cell biology of transport via the inner blood-retinal barrier: establishment

- of cell lines and transport functions," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 28, no. 1, pp. 1–8, 2005.
- [171] E. A. Friedman, F. A. L'Esperance Jr., C. D. Brown, and D. H. Berman, "Treating azotemia-induced anemia with erythropoietin improves diabetic eye disease," *Kidney International, Supplement*, vol. 64, no. 87, pp. S57–S63, 2003.
- [172] Y. Katsura, T. Okano, K. Matsuno, et al., "Erythropoietin is highly elevated in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy," *Diabetes Care*, vol. 28, no. 9, pp. 2252–2254, 2005.
- [173] D. Watanabe, K. Suzuma, S. Matsui, et al., "Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy," *The New England Journal of Medicine*, vol. 353, no. 8, pp. 782–792, 2005.
- [174] C. Grimm, A. Wenzel, M. Groszer, et al., "HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration," *Nature Medicine*, vol. 8, no. 7, pp. 718–724, 2002.
- [175] Y. Inomata, A. Hirata, E. Takahashi, T. Kawaji, M. Fukushima, and H. Tanihara, "Elevated erythropoietin in vitreous with ischemic retinal diseases," *NeuroReport*, vol. 15, no. 5, pp. 877–879, 2004.
- [176] K. Jaquet, K. Krause, M. Tawakol-Khodai, S. Geidel, and K.-H. Kuck, "Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential," *Microvascular Research*, vol. 64, no. 2, pp. 326–333, 2002.
- [177] J. Garcí-Arumí, A. Fonollosa, C. MacI, et al., "Vitreous levels of erythropoietin in patients with macular oedema secondary to retinal vein occlusions: a comparative study with diabetic macular oedema," *Eye*, vol. 23, no. 5, pp. 1066–1071, 2009.
- [178] J. Zhang, Y. Wu, Y. Jin, et al., "Intravitreal injection of erythropoietin protects both retinal vascular and neuronal cells in early diabetes," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 49, no. 2, pp. 732–742, 2008.
- [179] B. Zhu, W. Wang, Q. Gu, and X. Xu, "Erythropoietin protects retinal neurons and glial cells in early-stage streptozotocin-induced diabetic rats," *Experimental Eye Research*, vol. 86, no. 2, pp. 375–382, 2008.
- [180] J. C. Dreixler, S. Hagevik, J. W. Hemmert, A. R. Shaikh, D. M. Rosenbaum, and S. Roth, "Involvement of erythropoietin in retinal ischemic preconditioning," *Anesthesiology*, vol. 110, no. 4, pp. 774–780, 2009.
- [181] J. Chen, K. M. Connor, C. M. Aderman, and L. E. H. Smith, "Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 2, pp. 526–533, 2008.
- [182] A. E. Gawad, L. Schlichting, O. Strauß, and O. Zeitz, "Antiapoptotic properties of erythropoietin: novel strategies for protection of retinal pigment epithelial cells," *Eye*, vol. 23, no. 10, pp. 2245–2250, 2009.
- [183] H. Chung, H. Lee, F. Lamoke, W. J. M. Hrushesky, P. A. Wood, and W. J. Jahng, "Neuroprotective role of erythropoietin by antiapoptosis in the retina," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 87, no. 10, pp. 2365–2374, 2009.
- [184] G. Grasso, F. Graziano, A. Sfacteria, et al., "Neuroprotective effect of erythropoietin and darbepoetin alfa after experimental intracerebral hemorrhage," *Neurosurgery*, vol. 65, no. 4, pp. 763–769, 2009.
- [185] Z.-Y. Wang, L.-J. Shen, L. Tu, et al., "Erythropoietin protects retinal pigment epithelial cells from oxidative damage," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 46, no. 8, pp. 1032–1041, 2009.
- [186] C. Heeschen, A. Aicher, R. Lehmann, et al., "Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization," *Blood*, vol. 102, no. 4, pp. 1340–1346, 2003.
- [187] S. Brunner, G. H. Scherthaner, M. Satler, et al., "Correlation of different circulating endothelial progenitor cells to stages of diabetic retinopathy: first in vivo data," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 50, no. 1, pp. 392–398, 2009.
- [188] S. Caballero, N. Sengupta, A. Afzal, et al., "Ischemic vascular damage can be repaired by healthy, but not diabetic, endothelial progenitor cells," *Diabetes*, vol. 56, no. 4, pp. 960–967, 2007.
- [189] M. B. Grant, M. E. Boulton, and A. V. Ljubimov, "Erythropoietin: when liability becomes asset in neurovascular repair," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 2, pp. 467–470, 2008.
- [190] N. Tserentsoodol, N. V. Gordiyenko, I. Pascual, J. W. Lee, S. J. Fliesler, and I. R. Rodriguez, "Intraretinal lipid transport is dependent on high density lipoprotein-like particles and class B scavenger receptors," *Molecular Vision*, vol. 12, pp. 1319–1333, 2006.
- [191] R. Simó, M. Higuera, M. García-Ramírez, F. Canals, J. García-Arumí, and C. Hernández, "Elevation of apolipoprotein A-I and apolipoprotein H levels in the vitreous fluid and overexpression in the retina of diabetic patients," *Archives of Ophthalmology*, vol. 126, no. 8, pp. 1076–1081, 2008.
- [192] R. Simó, M. García-Ramírez, M. Higuera, and C. Hernández, "Apolipoprotein A1 is overexpressed in the retina of diabetic patients," *American Journal of Ophthalmology*, vol. 147, no. 2, pp. 319–325.e1, 2009.
- [193] C.-M. Li, M. E. Clark, M. F. Chimento, and C. A. Curcio, "Apolipoprotein localization in isolated drusen and retinal apolipoprotein gene expression," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 47, no. 7, pp. 3119–3128, 2006.
- [194] N. Tserentsoodol, J. Sztain, M. Campos, et al., "Uptake of cholesterol by the retina occurs primarily via a low density lipoprotein receptor-mediated process," *Molecular Vision*, vol. 12, pp. 1306–1318, 2006.
- [195] K. C. Hayes, S. Lindsey, Z. F. Stephan, and D. Brecker, "Retinal pigment epithelium possesses both LDL and scavenger receptor activity," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 30, no. 2, pp. 225–232, 1989.
- [196] K. G. Duncan, K. R. Bailey, J. P. Kane, and D. M. Schwartz, "Human retinal pigment epithelial cells express scavenger receptors BI and BII," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 292, no. 4, pp. 1017–1022, 2002.
- [197] S. Kawai, T. Nakajima, S. Hokari, T. Komoda, and K. Kawai, "Apolipoprotein A-I concentration in tears in diabetic retinopathy," *Annals of Clinical Biochemistry*, vol. 39, no. 1, pp. 56–61, 2002.
- [198] R. Simó and C. Hernández, "Fenofibrate for diabetic retinopathy," *The Lancet*, vol. 370, no. 9600, pp. 1667–1668, 2007.
- [199] B. Y. Ishida, K. G. Duncan, K. R. Bailey, J. P. Kane, and D. M. Schwartz, "High density lipoprotein mediated lipid efflux from retinal pigment epithelial cells in culture," *British Journal of Ophthalmology*, vol. 90, no. 5, pp. 616–620, 2006.
- [200] M. I. Mackness and P. N. Durrington, "HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation," *Atherosclerosis*, vol. 115, no. 2, pp. 243–253, 1995.
- [201] F. Robbesyn, N. Augé, C. Vindis, et al., "High-density lipoproteins prevent the oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial growth factor receptor activation and subsequent matrix metalloproteinase-2 upregulation," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 25, no. 6, pp. 1206–1212, 2005.

- [202] D. S. Ng, L. A. Leiter, C. Vezina, P. W. Connelly, and R. A. Hegele, "Apolipoprotein A-I Q[-2]X causing isolated apolipoprotein A-I deficiency in a family with anaphalipoproteinemia," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 93, no. 1, pp. 223–229, 1994.
- [203] D. S. Ng, P. W. O'Connor, C. B. Mortimer, L. A. Leiter, P. W. Connelly, and R. A. Hegele, "Retinopathy and neuropathy associated with complete apolipoprotein A-I deficiency," *American Journal of the Medical Sciences*, vol. 312, no. 1, pp. 30–33, 1996.
- [204] C. A. Curcio, C. L. Millican, T. Bailey, and H. S. Kruth, "Accumulation of cholesterol with age in human Bruch's membrane," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 42, no. 1, pp. 265–274, 2001.
- [205] C.-M. Li, M. E. Clark, M. F. Chimento, and C. A. Curcio, "Apolipoprotein localization in isolated drusen and retinal apolipoprotein gene expression," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 47, no. 7, pp. 3119–3128, 2006.

