

L'ERITROPOIETINA PROTEGEIX LES CÈL·LULES DE L'EPITELI PIGMENTARI DE L'AUGMENT DE LA PERMEABILITAT QUE S'INDUEIX EN CONDICIONS DIABÈTIQUES: PAPER ESSENCIAL DE LES VIES JAK2/PI3K

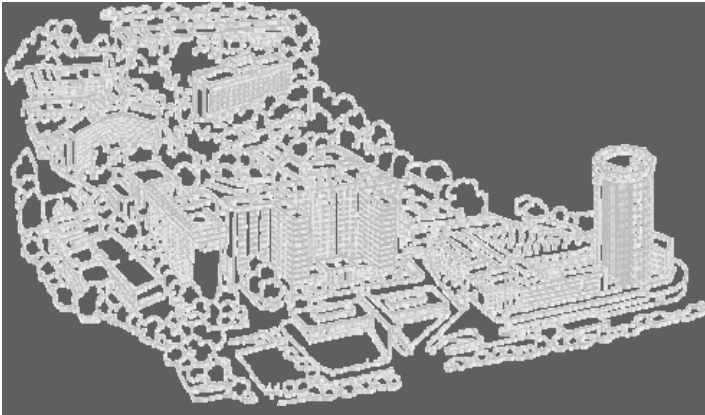
Marta García-Ramírez (PhD)^{1,2,3}, Cristina Hernández (MD, PhD)^{1,2,3}, Marisol Ruiz-Meana (PhD)^{3,4}, Marta Villarroyel (BSc)^{1,2,3}, Lidia Corraliza (BSc)^{1,2,3}, David García-Dorado (MD, PhD)^{3,4}, Rafael Simó (MD, PhD)^{1,2,3}.

¹Unitat de Recerca en Diabetis i Metabolisme, Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR). Universitat Autònoma de Barcelona (UAB);

²CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) i

³Red de Enfermedades Cardiovasculares (RECAVA; RD 06/0014/0025, RD 06/0014/0014), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain;

⁴Laboratori de Cardiologia Experimental i Cor, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.



Introducció I

-L'Eritropoietina (EPO) és una glicoproteïna de 34-kDa que es produeix i secreta principalment al ronyó. La seva principal funció és l'augment de l'hematocrit en condicions d'hipòxia.

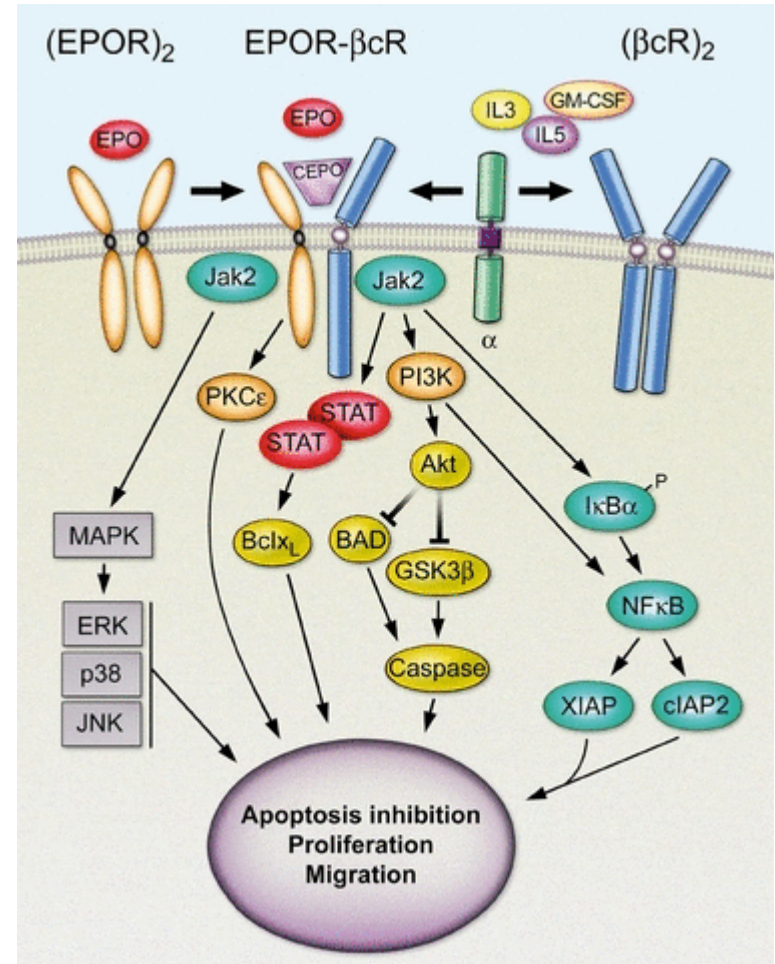
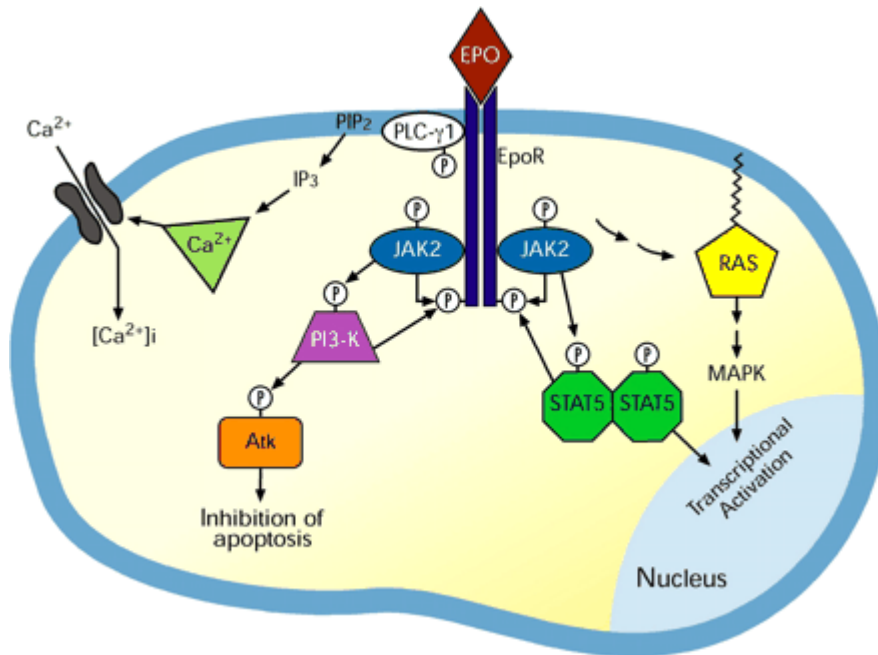
-L'Epo i el seu receptor EPOR s'expressen també en diferents teixits com en el ull.

TABLE 1. POSSIBLE ROLES OF EPO

PRODUCTION SITES	POSSIBLE FUNCTIONS	STIMULI OF EPO PRODUCTION
FETAL LIVER	ERYTROPOIESIS	RETINOIC ACID
KIDNEY	ERYTROPOIESIS	HYPOXIA
CENTRAL NERVOUS SYSTEM	NEUROPROTECTION & NEUROGENESIS	HYPOXIA
RETINA	NEUROPROTECTION	HYPOXIA
UTERUS	ANGIOGENESIS	ESTROGEN & HYPOXIA
OVIDUC	?	ESTROGEN & HYPOXIA
TESTIS	STEROIDOGENESIS	HYPOXIA
EPIDIDYMIS	?	HYPOXIA
MAMMARY GLAND	GUT MATURATION	?

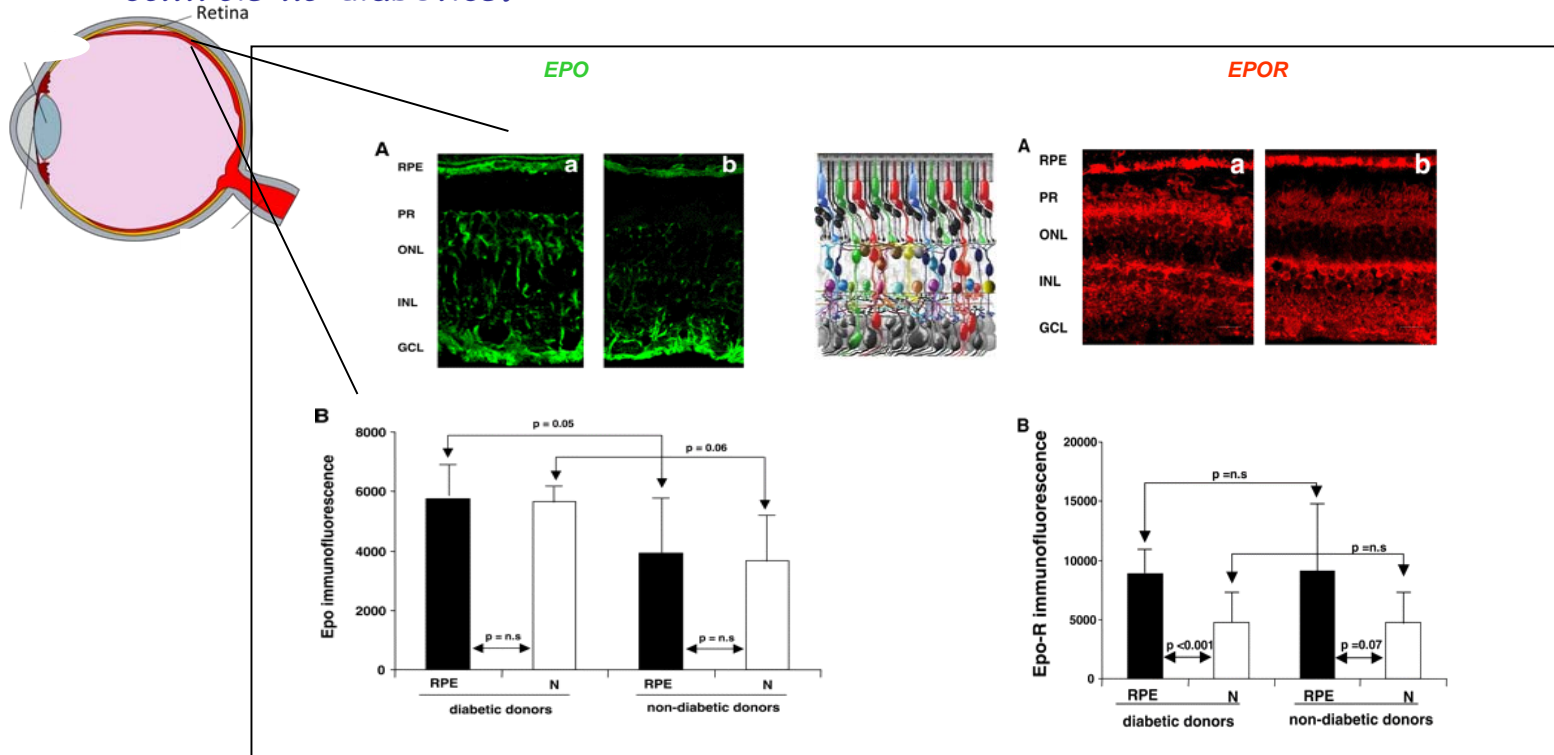
Introducció II

-L'Epo indueix l'homodimerització/heterodimerització del seu receptor i activa diferents vies de senyalització.



Introducció III

- Expressió a la retina humana d' EPO i EPOR: Comparació entre donants diabètics i controls no diabètics.



A) Confocal microscopy.

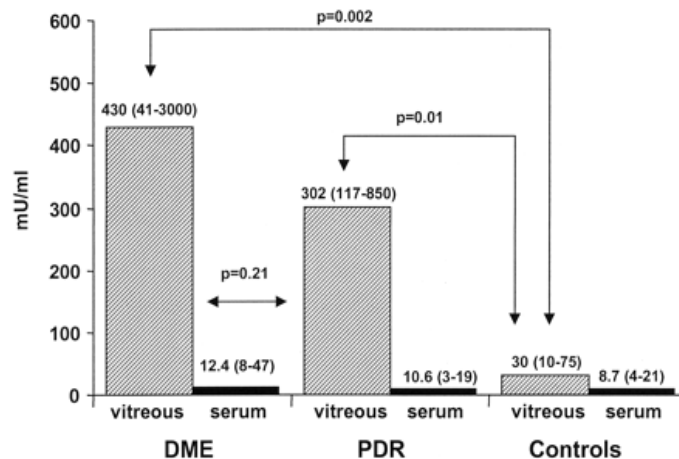
RPE, retinal pigment epithelium, PR, photoreceptors; ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; GCL, ganglion cell layer. Bar 20 μ m.

B) Quantification of Epo and EpoR immunofluorescence in nondiabetic and diabetic retinas. N, neuroretina.

- García-Ramírez M, Hernández C, Simó R. 2008 [Expression of erythropoietin and its receptor in the human retina: a comparative study of diabetic and nondiabetic subjects](#). Diabetes Care. 3:1189-94.

Introducció IV

- S'ha descrit una alta concentració de l'Epo en el vitri de pacients amb PDR o DME.



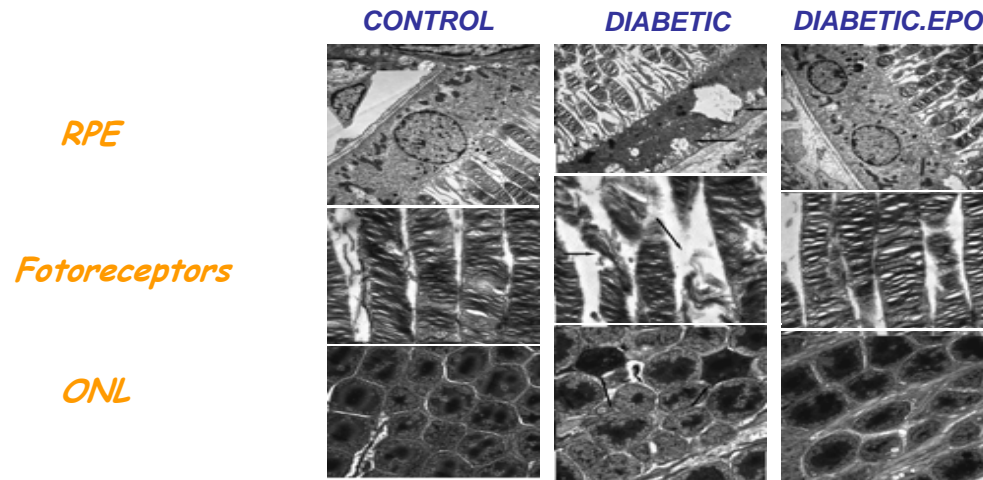
Intravitreous and serum concentrations of erythropoietin (mU/ml) in patients with DME and PDR and in control subjects. Values are expressed as median (range). (Radioimmunoassay (Incstar-Diasorin))

Hernández C, Fonollosa A, García-Ramírez M, Higuera M, Catalán R, Miralles A, García-Arumi J, Simó R. 2006 [Erythropoietin is expressed in the human retina and it is highly elevated in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema](#). Diabetes Care. 29:2028-2033.

García-Arumi J, Fonollosa A, Macià C, Hernandez C, Martinez-Castillo V, Boixadera A, Zapata MA, Simó R. 2009 [Vitreous levels of erythropoietin in patients with macular oedema secondary to retinal vein occlusions: a comparative study with diabetic macular oedema](#). Eye (Lond). 23(5):1066-71.

Introducció V

-El tractament amb Epo exògena protegeix de l'apoptosi els diferents tipus de cel. de la retina en models animals.



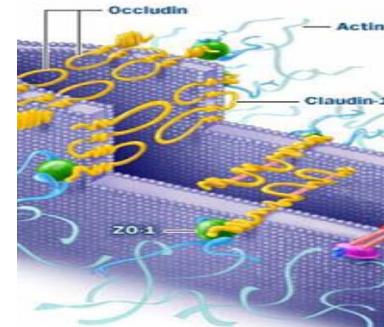
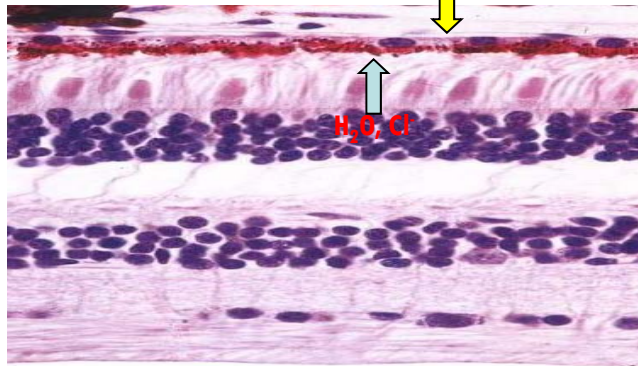
Microscopia electrònica de diferents tipus cell.ulars de la retina en rates control/ diabètiques/ diabètiques tractades amb una injecció intravitreal d'EPO

OBJECTIU:

Estudiar el possible efecte beneficiós de l'eritropoietina (Epo) en la funció de la barrera hematoretiniana externa (BHR) formada per les cèl.lules del RPE humà així com les principals vies de senyalització implicades.

Retinal Pigment Epithelium (RPE)

Neuroretina



Les proteïnes de les unions estretes (Tight junctions, TJ) del RPE mantenen un control estricte dels fluids i soluts, així com de l'entrada de molècules tòxiques i altres components del plasma a la retina

Materials i mètodes II:

TRACTAMENTS CEL·LULARS:

- IL-1 β (PreProTech Ec Ltd, London, UK)
- Epo (hEpor, R&D Systems, Vitro, Madrid, Spain).
- Ab neutralitzant (mouse IgG1 anti-Epo, Vitro, Madrid, Spain).
- Inhibidors de JAK-2 i PI3K (AG490 i LY294002 respectivament, Calbiochem, San Diego, CA).

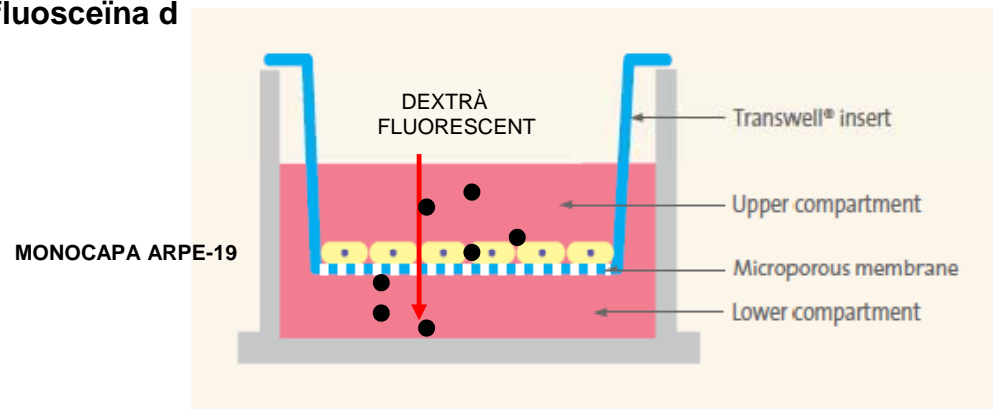
ASSAIG PERMEABILITAT:

- Moviment apical/basal de Isotiocianat de fluoresceïna d

70 KDa (Sigma, Madrid, Spain) 100 μ g/mL

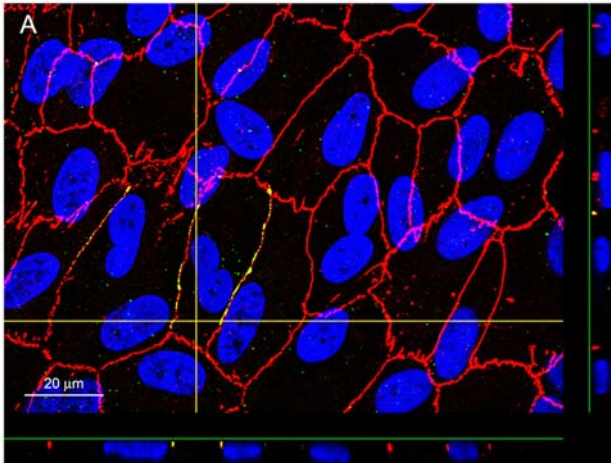
200 ul del medi basal mesurat

485 nm exc/528 nm emis.



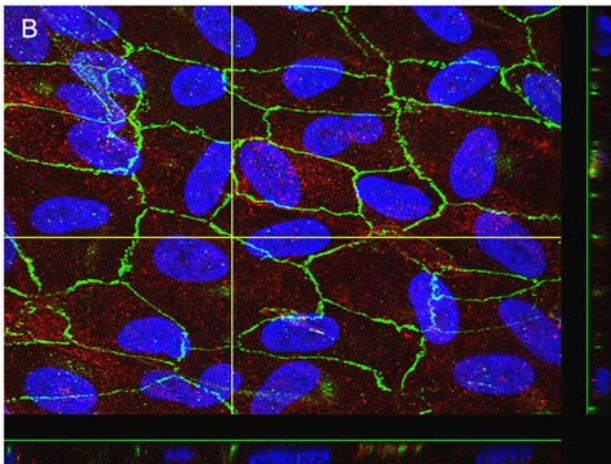
RESULTATS I:

*Demostració de la polarització de la monocapa
cel.lular*



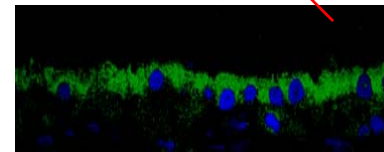
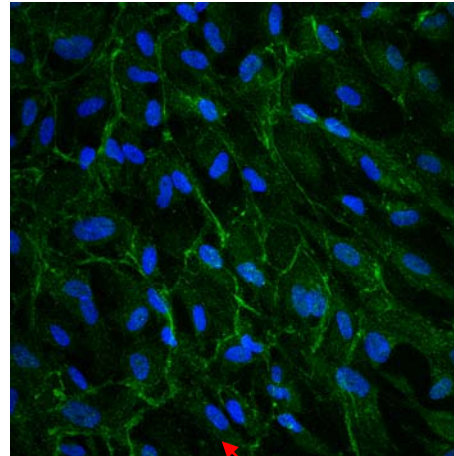
ARPE-19
25 mM D-Glucose

ZO-1 (vermell)
Claudina-1(verd)



Na+/K+ ATPasa (vermell)
Ocludina (verd)

Expressió del receptor de l'Epo



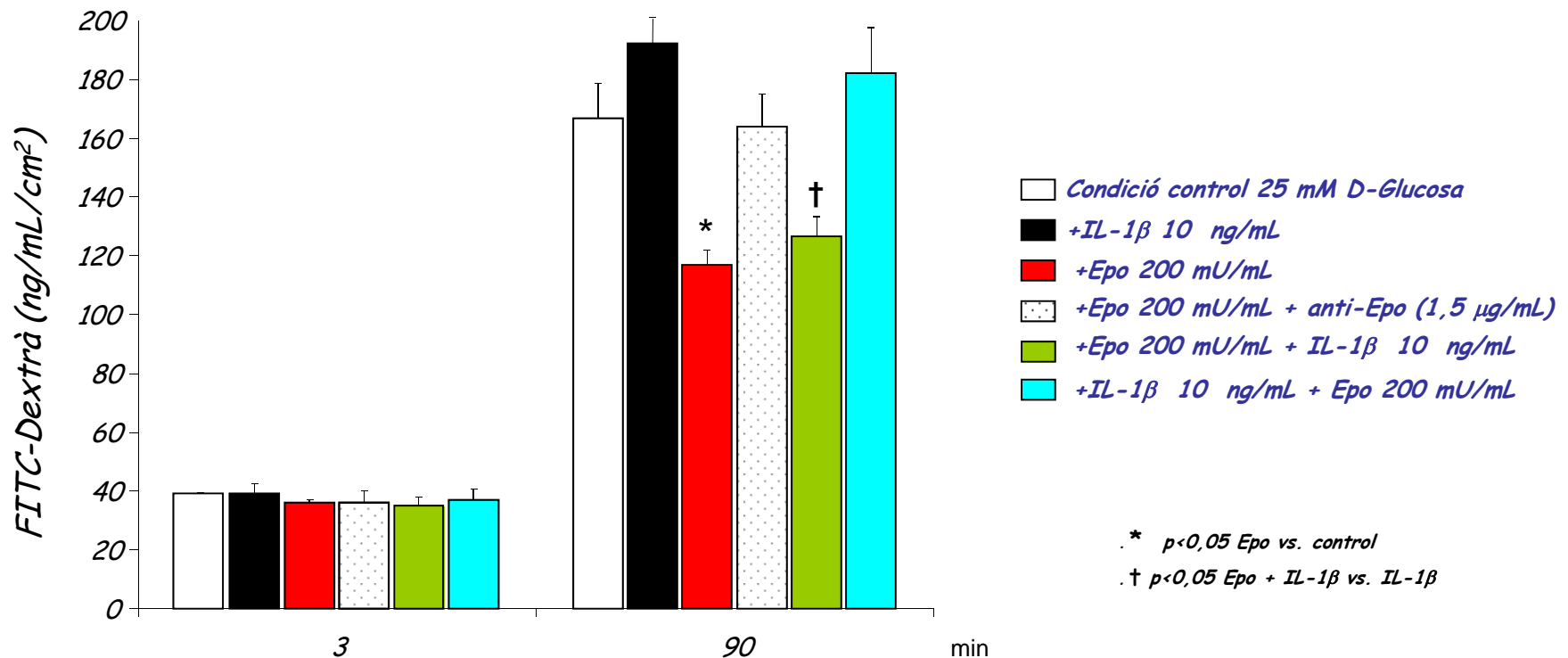
RPE

RESULTATS II:

L'Epo evita la hiperpermeabilitat induïda en condicions semblants a les diabètiques:

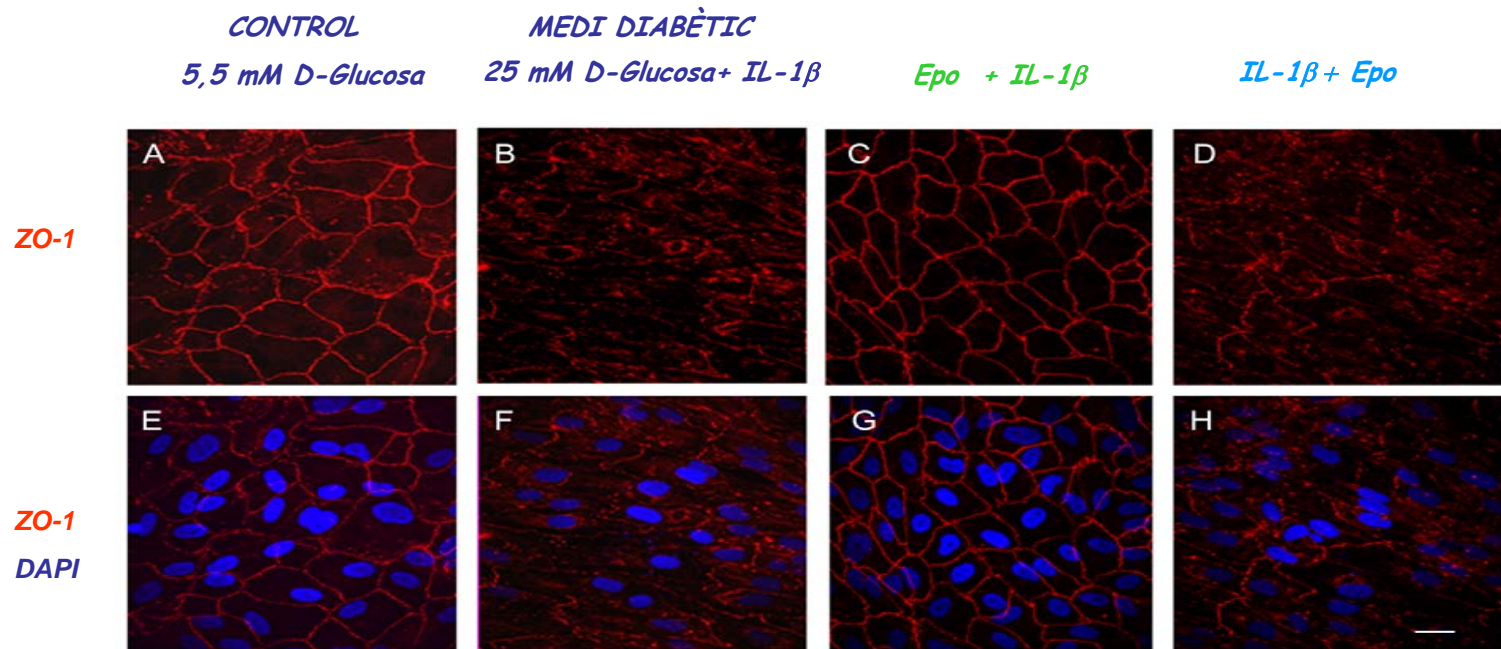
- L'administració d'Epo produeix una reducció significativa de la permeabilitat al dextrà en relació a les condicions control. L'Epo evita la hiperpermeabilitat induïda per IL-1 β

- L'efecte de l'Epo es reverteix amb un anticòs neutralitzador anti-Epo.



RESULTATS III:

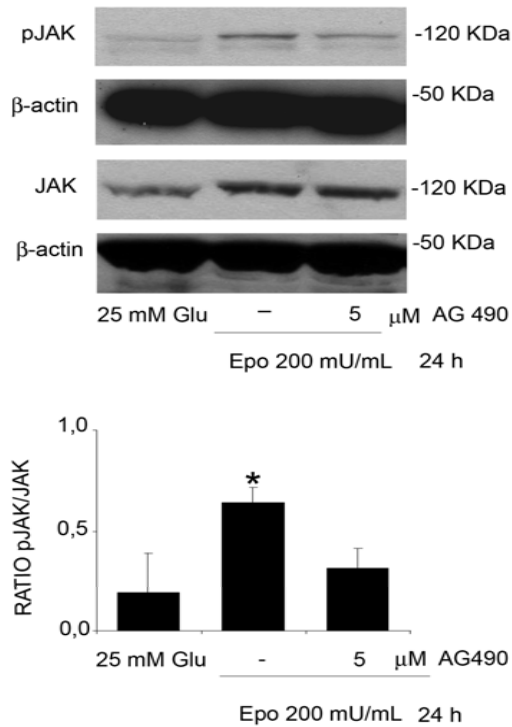
3. - L'Epo evita la disrupció de la monocapa cel.lular induïda per IL-1 β



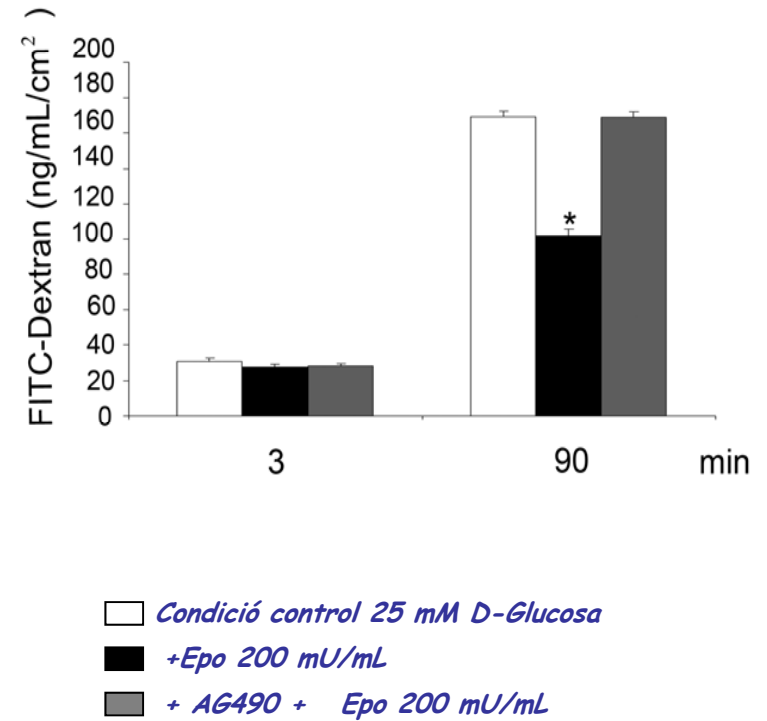
RESULTATS IV:

L'efecte beneficiós de l'Epo sobre la permeabilitat és mediat per l'activació de la JAK2.

A



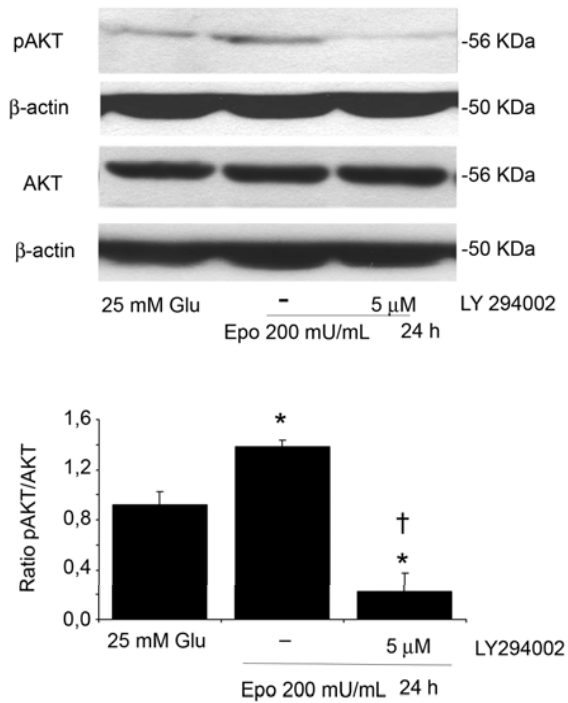
B



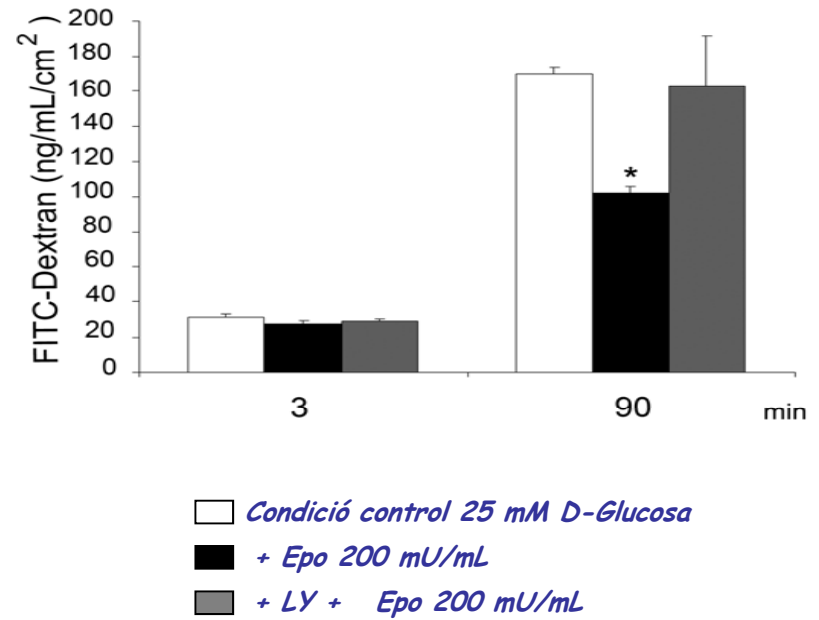
RESULTATS V:

- L'efecte beneficiós de l'Epo sobre la permeabilitat és en part mediat per PI3K/AKT

A

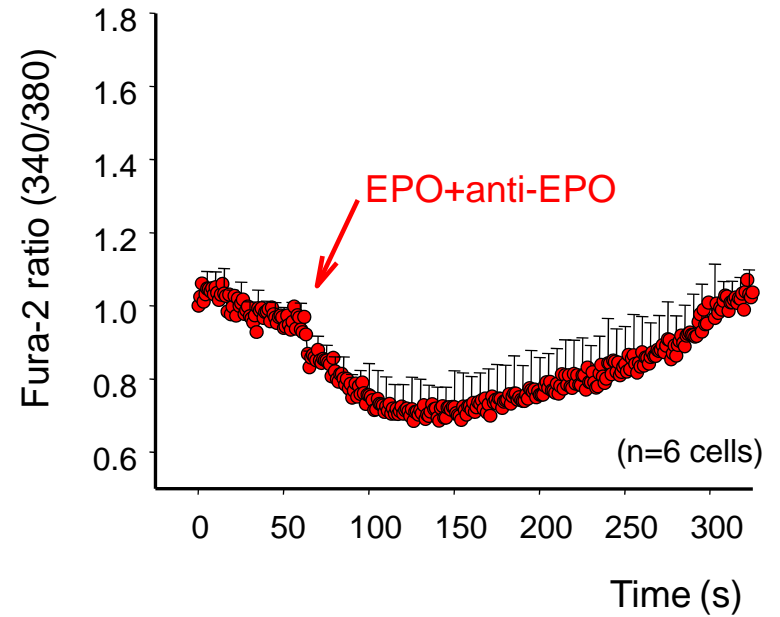
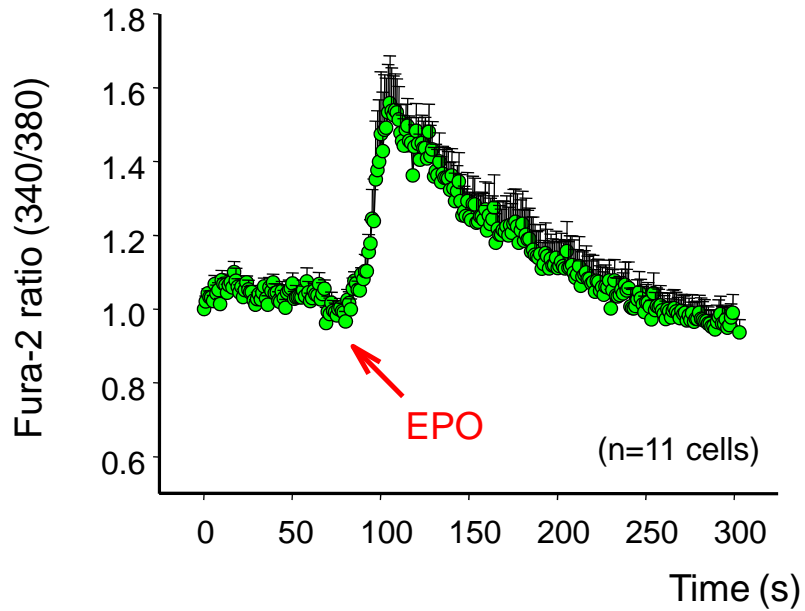


B

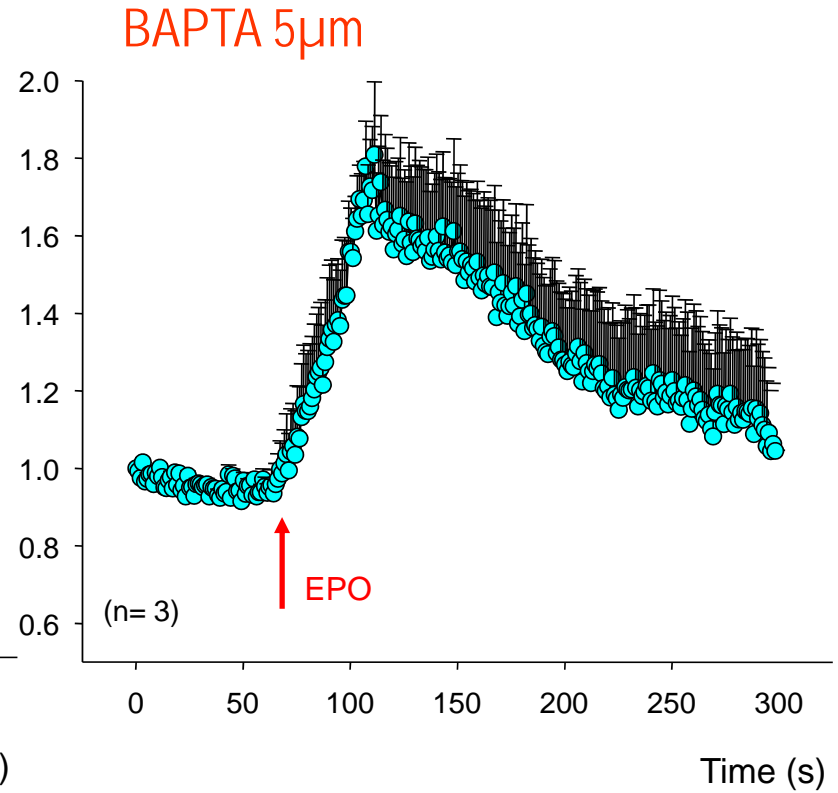
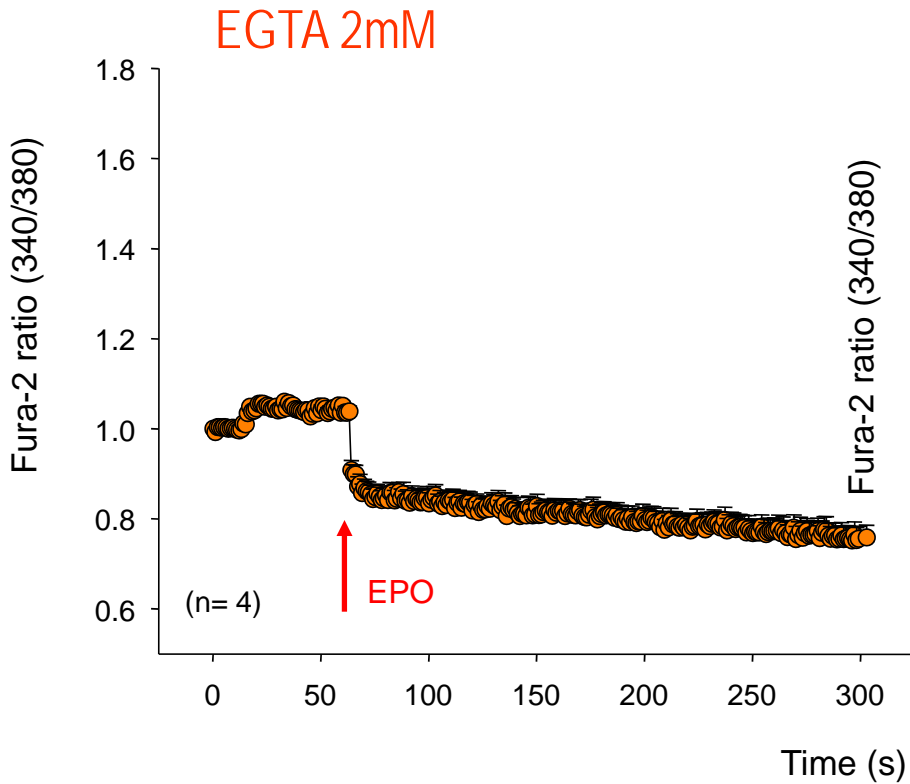


RESULTATS VI:

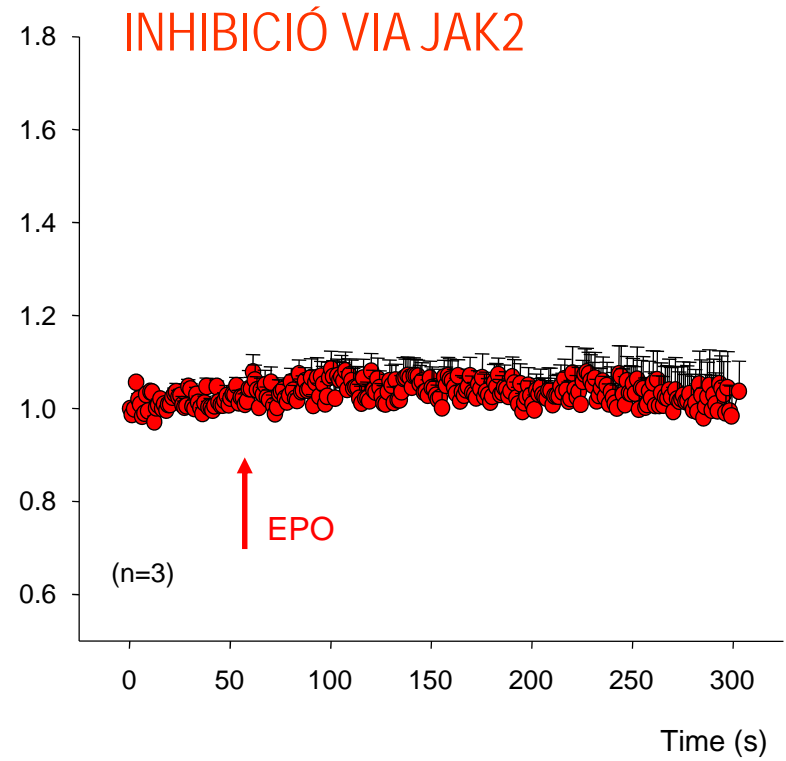
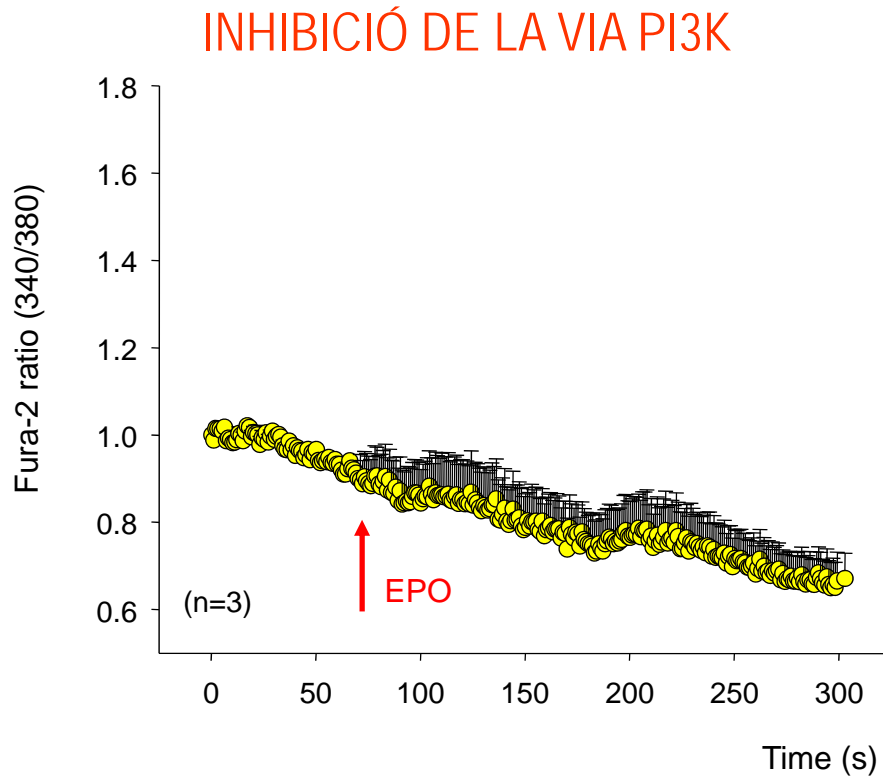
El tractament amb Epo indueix l'augment del Ca^{2+} intracel.lular.



L'augment del Ca^{2+} intracel.lular és dependent de la concentració del Ca^{2+} extracel.lular però no del Ca^{2+} intracel.lular



La resposta al Ca^{2+} induïda per l'Epo, resulta inhibida pels inhibidors de PI3K i JAK2.



CONCLUSIONS:

- L'Epo protegeix la disrupció de la BHR induïda en condicions semblants a les del medi diabètic, hiperglucèmia més inflamació (IL-1 β).*
- En l'efecte beneficiós induït per l'Epo sobre la permeabilitat de la BHR, es troben implicades les vies de senyalització de JAK2 i de PI3K/AKT.*
- L'Epo indueix un augment de la concentració del Ca²⁺ intracel.lular en les cèl.lules de RPE dependent del Ca²⁺ extracel.lular que es bloqueja quan s'inhibeixen JAK2 o PI3K/AKT.*
- Els presents resultats suggereixen que l'Epo podria ser un tractament beneficiós en el DME.*

Diabetes and Metabolism Research Group

Rafael Simó

Cristina Hernández

Albert Lecube

Marta Garcia-Ramírez

David Martínez

Lidia Corraliza

Anna Barbosa

Lorena Ramos

Marta Villarroel

