



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MARCELLA NEVES DÁTILO

A ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA AMPK PELOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 É
CAPAZ DE PROTEGER A RETINA CONTRA INSULTOS ISQUÊMICOS

CAMPINAS

2023

MARCELLA NEVES DÁTILO

A ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA AMPK PELOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 É
CAPAZ DE PROTEGER A RETINA CONTRA INSULTOS ISQUÊMICOS

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em
Ciências, na área de Clínica Médica.

ORIENTADORA: DOUTORA JACQUELINE MENDONÇA LOPES DE FARIA

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA MARCELLA NEVES DÁTILO, E ORIENTADA PELA PROF. DRA.
JACQUELINE MENDONÇA LOPES DE FARIA

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

D262a Dátilo, Marcella Neves, 1990-
A ativação da proteína AMPK pelos ácidos graxos ômega-3 é capaz de proteger a retina contra insultos isquêmicos / Marcella Neves Dátilo. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Jacqueline Mendonça Lopes de Faria.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Angiogênese. 2. Retinopatia da prematuridade. 3. Suplementação. 4. GPR120. 5. Proteínas quinases ativadas por AMP. I. Lopes de Faria, Jacqueline Mendonça, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: AMPK activation by omega-3 fatty acids protects the retina against ischemic insults

Palavras-chave em inglês:

Angiogenesis

Retinopathy of prematurity

Supplementation

GPR120

AMP-Activated protein kinases

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Jacqueline Mendonça Lopes de Faria [Orientador]

Dânia Emi Hamassaki

Maria Lucia Cardillo Córrea Giannella

Mônica Barbosa de Melo

Sara Teresinha Olalla Saad

Data de defesa: 16-03-2023

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-6763-3337>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6730705039553218>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARCELLA NEVES DÁTILLO

ORIENTADOR: JACQUELINE MENDONÇA LÓPES DE FARIA

MEMBROS TITULARES:

1. PROFA. DRA. JACQUELINE MENDONÇA LÓPES DE FARIA
2. PROFA. DRA. DÂNIA EMI HAMASSAKI
3. PROFA. DRA. MONICA BARBOSA DE MELO
4. PROFA. DRA. SARA TERESINHA OLALLA SAAD
5. PROFA. DRA. MARIA LUCIA CARDILLO CORRÊA GIANNELLA

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 16/03/2023

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de pesquisa (processo: 2018/07398-3) que possibilitou o desenvolvimento da tese.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo: 142522/2018-0) entre Agosto/2018 e Dezembro/2018.

Meu agradecimento e respeito a todos os animais experimentais utilizados durante a realização desta pesquisa.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas, pelo apoio, incentivo à pesquisa e pela infraestrutura fornecida.

À minha orientadora, Dra. Jacqueline Mendonça Lopes de Faria, pela oportunidade e confiança depositada no meu trabalho. Agradeço por toda a infraestrutura fornecida, pela disponibilidade em me ajudar no que fosse preciso, por todos os ensinamentos e direcionamentos durante esse processo. Obrigada pelo grande exemplo de ética e honestidade.

Ao Prof. Dr. José Butori Lopes de Faria, pela infraestrutura e por colocar seus recursos à inteira disposição. Agradeço o envolvimento durante as etapas da pesquisa, por todo o auxílio durante a construção do projeto e pelos ensinamentos durante esses cinco anos de doutorado.

Ao meu marido, Guilherme Formigari, meu parceiro de bancada e de vida. Obrigada por estar nessa jornada ao meu lado. Pelas horas de laboratório, pelo auxílio durante a execução dos experimentos e por todo o apoio. Seu companheirismo, seu amor, sua paciência, carinho e compreensão tornaram esse processo muito mais leve.

Ao Antônio Calixto, nosso técnico de laboratório, que se tornou um grande amigo e figura essencial durante esses anos de doutorado. Obrigada por todo o auxílio, pelos conselhos e por todos os momentos de descontração.

A Nilza Alzira Batista, obrigada por todo o auxílio durante a execução do projeto, pelos ensinamentos técnicos e de vida.

A todos que frequentaram o laboratório de fisiopatologia renal e complicações do diabetes entre 2018 e 2023. Obrigada pela convivência e amizade que construímos. Todos de vocês marcaram minha trajetória e foram essenciais para o meu crescimento e amadurecimento.

A minha maravilhosa família, meus pais, Marcelo e Cristiane, meu infinito agradecimento, vocês são meus maiores exemplos e incentivadores dessa vida; minha irmã e melhor amiga Lethícia pelo apoio, conselhos, por ser meu porto seguro e por ter partilhado todas as alegrias e angústias durante esse período; ao meu irmão

e melhor amigo, Guilherme por todas as conversas, risadas, conselhos e auxílios no audiovisual; minha cunhada e melhor amiga, Letícia, obrigada por tanto apoio, carinho e cuidado; meu marido, Guilherme, obrigada. Agradeço pela família que somos, pelo amor e cuidado que temos uns pelos outros, obrigada por acreditarem no meu sonho e me incentivarem a ser melhor a cada dia. Sem vocês, nada disso seria possível.

Aos meus familiares, minha madrinha Gislaine, pela fé, oração e ternura durante o processo; aos meus primos, Victor, Duda e Jady, obrigada pelos momentos e por todo o apoio.

Ao João e José, que me deram alegria, muito amor e me ajudaram a controlar minha ansiedade durante todo esse período.

Agradeço a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste projeto. Obrigada pela paciência e generosidade.

Por fim, mas não menos importante, agradeço à Deus, por tudo! Pelo seu amor incondicional, por estar comigo nos momentos difíceis e pela sua obra em minha vida.

EPÍGRAFE

“Nunca ande por trilhas, pois assim
só irá até onde outros já foram.”

Alexander Graham Bell

RESUMO

Introdução: As retinopatias isquêmicas (RIs) são as principais causas de alterações visuais severas, podendo levar à perda de visão. Nesse sentido, o entendimento dos mecanismos relacionados ao desenvolvimento e a elaboração de novas terapêuticas que previnam a progressão da doença são necessários. Diversos mecanismos estão relacionados com a gênese das RIs, dentre elas destaca-se o aumento do processo inflamatório, estresse oxidativo e angiogênese. Evidências sugerem que a ativação da proteína quinase dependente de AMP (AMPK), em células retinianas é capaz de reduzir a inflamação e o estresse oxidativo. Entretanto, o papel da proteína AMPK nas RIs permanece pouco compreendido. Em contrapartida, evidências também demonstram o papel benéfico dos ácidos graxos poli-insaturados da família do $\omega 3$ ($\omega 3$ -PUFAs) no desenvolvimento de retinopatias, porém os mecanismos permanecem pouco elucidados. Em relação à ativação da AMPK, estudos sugerem que a nutrientes, como os $\omega 3$ -PUFAs são capazes de atuar como ativadores da proteína, porém, o papel do eixo $\omega 3$ -AMPK no tecido retiniano permanece desconhecido.

Objetivo: Avaliar os possíveis efeitos benéficos do ômega-3 em modelo de retinopatia isquêmica e se esses possíveis efeitos podem depender da ativação da proteína AMPK.

Métodos: Células endoteliais primárias da microvasculatura da retina humana (hRMECs) foram expostas a um mimético de hipóxia (Dimetiloxalilglicina – DMOG, 400 μ m), na presença ou ausência de $\omega 3$ -PUFA (ácido docosaexaenóico – DHA, 50 μ m), sob silenciamento ou não para a proteína AMPK α . Após os diferentes tratamentos, foram avaliados parâmetros de isquemia, o fenômeno de transição mesenquimal, integridade da barreira endotelial, angiogênese e a atividade da proteína AMPK. Posteriormente, camundongos nocautes para AMPK $\alpha 2$ e seus controles genéticos (C57BL/J6) foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais: grupo controle (CT); grupo submetido ao protocolo de retinopatia induzida por oxigênio (OIR); grupo OIR+ $\omega 3$, no qual houve a suplementação materna com 50 μ L de óleo rico em $\omega 3$ -PUFAs. Ao final do período experimental, foram avaliados marcadores isquêmicos e de angiogênese através das técnicas de imunofluorescência ou imuno-histoquímica.

Resultados: As células expostas ao DMOG apresentaram um aumento na expressão de marcadores hipóxicos, de transição mesenquimal (vimentina), desarranjo da proteína de junção Zônula Occludens-1 (ZO-1), acompanhado de aumento na migração celular e angiogênese quando comparados ao controle (CT) ($p < 0.05$). A exposição ao DMOG reduziu a fosforilação em treonina 172 (Thr172) da AMPK (pAMPK^{Thr172}). De maneira interessante, o tratamento com DHA sob condição de isquemia (DMOG+DHA) foi capaz de restaurar pAMPK^{Thr172} ($p < 0.05$ vs DMOG). O tratamento com DHA aumentou a expressão de seu receptor (GPR120), a concentração intracelular de cálcio e a expressão da proteína a montante da AMPK, CaMKK β . Ainda, o tratamento com DHA restaurou as alterações promovidas pelo DMOG. Sob silenciamento para AMPK α os efeitos benéficos promovidos pelo DHA, foram perdidos. *In vivo*, camundongos AMPK $\alpha_2^{-/-}$ e WT submetidos ao protocolo de OIR apresentaram alterações retinianas morfológicas similares. Por outro lado, a suplementação com óleo rico em ω 3-PUFAs foi capaz de atenuar as alterações promovidas pela isquemia apenas em animais WT, reforçando o possível papel da AMPK α nos efeitos benéficos dos ácidos graxos ômega-3 em ambiente isquêmico.

Conclusão: O ômega-3 é capaz ativar a proteína AMPK via GPR120-CaMKK β e essa ativação protege a retina contra insultos isquêmicos. Além disso, os efeitos promovidos pelos ω 3-PUFAs parecem ser dependentes da ativação da proteína AMPK. As evidências apresentadas nesse estudo podem contribuir para o desenvolvimento de uma nova ferramenta terapêutica para o controle da angiogênese patológica em doenças isquêmicas da retina. No entanto, mais estudos são necessários para a confirmação de tal hipótese.

Palavras-chave: Angiogênese; retinopatia induzida por oxigênio; suplementação; GPR120, AMPK.

ABSTRACT

Background: Ischemic retinopathies (IRs) are the main causes of severe visual alterations, which can lead to vision loss. Understanding the mechanisms related to disease development and elaborating new therapies to prevent progression are necessary. Several mechanisms are associated with the genesis of IRs, among them the increase in the inflammatory process, oxidative stress, and angiogenesis. Evidence suggests that activation of AMP-dependent protein kinase (AMPK) in retinal cells is able to reduce inflammation and oxidative stress. However, the role of the AMPK protein in IRs remains poorly understood. In addition, evidence also demonstrates the beneficial role of polyunsaturated fatty acids of the $\omega 3$ family ($\omega 3$ -PUFAs) in the development of retinopathies, but the mechanisms remain poorly understood. In relation to AMPK activation, studies suggest that nutrients such as $\omega 3$ -PUFAs can act as protein activators, however, the role of the $\omega 3$ -AMPK axis in retinal tissue remains unknown.

Objective: Evaluate the possible beneficial effects of omega-3 in a model of ischemic retinopathy and whether these effects may depend on the activation of the AMPK protein.

Methods: Primary human retinal microvascular endothelial cells (hRMECs) were exposed to a hypoxia mimetic (Dimethyloxallylglycine – DMOG, 400 μ m), in the presence or absence of $\omega 3$ -PUFA (docosahexaenoic acid – DHA, 50 μ m), under silencing for the protein AMPK α . After treatments, ischemia parameters, the mesenchymal transition phenomenon, endothelial barrier integrity, angiogenesis, and AMPK protein activity were evaluated. After that, AMPK $\alpha 2$ knockout mice and their genetic controls (C57BL/J6) were distributed into the following experimental groups: the control group (CT); the group submitted to the oxygen-induced retinopathy (OIR) protocol, and the OIR+ $\omega 3$ group that received a maternal supplementation with 50 μ L of oil rich in $\omega 3$ -PUFAs. At the end of the experimental period, ischemic and angiogenesis markers were evaluated using immunofluorescence or immunohistochemistry.

Results: Cells exposed to DMOG treatment showed an increase in the expression of hypoxic markers, mesenchymal transition (vimentin), and disruption of the zonula

junction protein Occludens-1 (ZO-1), along with an increase in cell migration and angiogenesis when compared to the control (CT) ($p < 0.05$). DMOG exposure reduced threonine 172 (Thr172) phosphorylation of AMPK (pAMPKThr¹⁷²). Interestingly, DHA treatment under ischemic conditions (DMOG+DHA) was able to restore pAMPKThr172 ($p < 0.05$ vs DMOG). DHA treatment also increased the expression of its receptor (GPR120), the intracellular calcium concentration, and the expression of the AMPK upstream protein, CaMKK β . In addition, DHA treatment restored the alterations promoted by DMOG. However, under AMPK α silencing, the beneficial effects promoted by DHA were lost. In vivo, AMPK α 2^{-/-} and WT mice submitted to the OIR protocol showed similar morphological retinal changes. On the other hand, supplementation with oil rich in ω 3-PUFAs reduced alterations promoted by ischemia only in WT animals, reinforcing the possible role of AMPK α in the beneficial effects of omega-3 fatty acids in an ischemic environment.

Conclusion: Omega-3 fatty acids can activate the AMPK protein via GPR120-CaMKK β protecting the retina against ischemic insults. Furthermore, ω 3-PUFAs effects seem to be dependent on the activation of the AMPK. Then, the evidence presented in this study may contribute to the development of a new therapeutic tool to control pathological angiogenesis in retinal ischemic diseases. However, further studies are required to confirm this original hypothesis.

Keywords: Angiogenesis; oxygen-induced retinopathy; supplementation; GPR120; AMPK.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Diagrama das estruturas oculares.....	26
Figura 2	Diagrama do circuito básico da retina.....	27
Figura 3	Diagrama das barreiras hemato-retinianas (BHR)	29
Figura 4	Diagrama dos complexos juncionais.....	32
Figura 5	Diagrama representativo do desenvolvimento da vasculatura retiniana...	35
Figura 6	Desenvolvimento da vasculatura retiniana de camundongos.....	36
Figura 7	Representação dos plexos retinianos.....	37
Figura 8	Imagens representativas dos estágios da retinopatia da prematuridade (ROP)	39
Figura 9	Imagens representativas dos estágios da Retinopatia Diabética (RD)...	41
Figura 10	Sinalização do fator induzível por hipóxia (HIF)	44
Figura 11	Sinalização mediada pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	46
Figura 12	Ativação e sinalização da proteína AMPK.....	48
Figura 13	Ativação e sinalização anti-inflamatória de GPR120.....	51
Figura 14	Caracterização de hMRECs e avaliação da viabilidade celular em exposição ao DMOG.....	65
Figura 15	DMOG induz isquemia em hMRECs.....	66
Figura 16	DMOG induz EndMT em hMRECs.....	68
Figura 17	DMOG reduz atividade de AMPK em hRMECs.....	69
Figura 18	Ensaio de viabilidade celular em exposição ao DHA em condição de hipóxia química.....	69
Figura 19	DHA restaura fosforilação de AMPK em hRMECs sob condição de hipóxia química.....	70

Figura 20	DHA aumenta níveis de cálcio intracelular hRMECs sob condição de hipóxia química.....	71
Figura 21	Conteúdo proteico e atividade de AMPK em células endoteliais silenciadas para AMPK α	72
Figura 22	Efeitos benéficos promovidos pelo DHA em condição mimética de hipóxia nas hRMECs são dependentes de AMPK.....	73
Figura 23	Avaliação do potencial antiangiogênico do DHA em condição mimética de hipóxia em células silenciadas ou não para AMPK.....	75
Figura 24	Os efeitos benéficos do DHA sobre a migração celular em hRMECs são dependentes da ação de AMPK α	76
Figura 25	Os efeitos benéficos do DHA na transição mesenquimal e na função de barreira em hRMECs são dependentes da ação de AMPK α	78
Figura 26	Benefícios promovidos pelo ômega-3 no desenvolvimento retinopatia isquêmica proliferativa são dependentes de AMPK.....	80
Figura 27	Efeitos benéficos do ômega-3 na expressão de HIF-1 α em modelo de retinopatia induzida por oxigênio são dependentes de AMPK α	81
Figura 28	Efeitos benéficos do ômega-3 na expressão de VEGF em modelo de retinopatia induzida por oxigênio são dependentes de AMPK α	82
Figura 29	Efeitos benéficos do ômega-3 na angiogênese em modelo de retinopatia induzida por oxigênio são dependentes de AMPK α	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Lista de anticorpos utilizados.....	58
-----------------	-------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-CoA carboxilase
ADP	Difosfato de adenosina
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
AH	Artéria hialoide
AICAR	Ribonucleotídeo 5-aminoimidazol-4-carboxamida
AKT	Proteína quinase B
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Proteína quinase dependente de AMP
ANOVA	Análise de variância
ARNT	Translocador nuclear receptor aril hidrocarboneto
ATP	Trifosfato de adenosina
BHR	Barreira hemato-retiniana
BHRe	BHR externa
BHRi	BHR interna
CaMKKβ	Proteína quinase quinase β dependente de cálcio/calmodulina
CCG	Camada de células ganglionares
CEMIB	Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas
CFN	Camada de fibras nervosas
CNI	Camada nuclear interna
CNE	Camada nuclear externa
CPE	Camada plexiforme externa
CO₂	Dióxido de carbono
CPI	Camada plexiforme interna
CT	Controle
DAG	Diacilglicerol
DHA	Ácido docosahexaenóico
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1

DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMOG	Dimetiloxalilglicina
DMRI	Degeneração macular relacionada à idade
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DVP	Plexo vascular profundo
EGM-2	<i>Endothelial Cell Growth Medium-2</i>
EndMT	Transição endotélio-mesenquimal
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERK	Proteína quinase regulada por estímulos extracelulares
EPO	Eritropoetina
FBS	Soro fetal bovino
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
GPR120	Receptor acoplado à proteína G 120
HE	Hematoxilina e eosina
HIF	Fator induzível por hipóxia
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
hRMECs	Células endoteliais primárias da microvasculares da retina humana
JAM	Moléculas de adesão juncional
IKK	Inibidor da quinase capa
IκBα	Inibidor do fator de transcrição nuclear cappa B alfa
iNOS	Sintase induzível do óxido nítrico
IP3	1,4,5-trifosfato
IVP	Plexo vascular intermediário
JNK	Quinase c-Jun N-terminal quinase
LKB1	Quinase do fígado B1
MAPK	Proteína ativada por mitógeno quinase
MLE	Membrana limitante externa
MLI	Membrana limitante interna

MP	Membrana pupilar
mTORC-1	Proteína alvo mamífero do complexo 1 de rapamicina
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 brometo de difenil tetrazólio
NF-κB	Fator nuclear capa b
NVU	Unidade neurovascular
PBS	Solução tampão Salina-Fosfato
PHD	Prolil-hidroxilase
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PLGF	Fator de crescimento placentário
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
RD	Retinopatia diabética
RDNP	RD não-proliferativa
RDP	RD proliferativa
RMECs	Células endoteliais da microvasculatura retiana
ROP	Retinopatia da prematuridade
RPE	Epitélio pigmentado retiniano
RIs	Retinopatias isquêmicas
O₂	Oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
SVP	Plexo vascular superficial
TEER	Resistência elétrica transendotelial
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TJ	Junções compactas
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
TNFR	Receptor de TNF
TSC2	Complexo de Esclerose Tuberosa 2
TVL	<i>Tunica vasculosa lentis</i>

VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor de VEGF
VHL	Von-Hippel-Lindau
VHP	<i>Vasculosa hyaloidea propria</i>
ZFA	Zona foveal avascular
ZO	Zônula Ocludens
WT	<i>Wild type</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Capa
μ	Micro
ω	Ômega

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Retina.....	25
1.1.1 Barreira hemato-retiniana.....	28
1.1.2 Vasculatura retiniana.....	32
1.1.2.1 Desenvolvimento da vasculatura retiniana.....	34
1.1.2.2 Plexos retinianos.....	36
1.2 Fisiopatologia das retinopatias isquêmicas	38
1.2.1 Retinopatia da prematuridade (ROP)	38
1.2.2 Retinopatia diabética (RD)	40
1.2.3 RD e ROP	42
1.2.4 Fator induzido por hipóxia (HIF)	43
1.2.5 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	44
1.3 Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK)	46
1.3.1 AMPK e angiogênese.....	48
1.4 Ácidos graxos ômega-3 (ω 3)	49
2. OBJETIVO	53
3. MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1 Cultura de células e tratamentos	54
3.1.1 Ensaio de viabilidade celular	54
3.1.2 Silenciamento da proteína AMPK α	55
3.2 Ensaio de migração celular	55
3.3 Ensaio de tubulogênese	56
3.4 Avaliação resistência elétrica transendotelial	56
3.5 Avaliação da concentração de Cálcio intracelular	57
3.6 Imunofluorescência	57
3.7 Immunoblotting	58
3.8 Modelo animal e desenho experimental	60
3.8.1 Suplementação com ácidos graxos- ω 3.....	61
3.8.2 Imunofluorescência	62
3.8.3 Imuno-histoquímica	62
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
5. RESULTADOS	65
6. DISCUSSÃO.....	84

7. CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXO 1 – Certificado de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no uso de animais da UNICAMP.	103
ANEXO 2 – Política editorial da Elsevier, concedendo permissão aos autores para reprodução de seus artigos em teses e dissertações sem requisitar permissão.....	105
ANEXO 3 – Artigo original publicado como parte das atividades realizadas durante o doutorado.	106
ANEXO 4 – Capítulo publicado como parte das atividades realizadas durante o doutorado.	116

1. INTRODUÇÃO

As retinopatias isquêmicas (RIs), como a retinopatia da prematuridade (ROP), retinopatia diabética (RD) e a degeneração macular relacionada à idade (DMRI), são as principais causas de alterações visuais severas, podendo levar a perda de visão em crianças, adultos portadores de diabetes e na população idosa, respectivamente. De maneira simplificada, as RIs possuem duas principais características, a degeneração da microvasculatura retiniana preexistentes e a redução na disponibilidade de oxigênio que é capaz de induzir proliferação anormal de novos vasos em direção ao vítreo, podendo resultar em descolamento retiniano e cegueira. Além disso, os eventos isquêmicos decorrentes da perda inicial de vasos podem alterar a homeostase e função dos neurônios retinianos (1,2).

De maneira geral, a retina de recém-nascidos prematuros apresenta maior susceptibilidade a insultos, o que pode levar ao desenvolvimento da ROP. A perda da interação materno-fetal, associada a redução na expressão de fatores de crescimento devido à hiperóxia pode levar ao bloqueio da vascularização retiniana. Posteriormente, a retina se torna metabolicamente ativa, porém pouco vascularizada, tornando-se então hipóxia, o que irá estimular a proliferação de novos vasos pela intensa ativação de fatores de crescimento. Essa proliferação anormal pode levar ao descolamento da retina e perda visual total (3,4).

Em relação a epidemiologia da ROP, na população geral, estima-se que 3 em cada 10.000 nascidos vivos apresentem pelo menos um dos olhos cegos em decorrência da ROP. Entretanto, destaca-se que a avaliação e comparação da sua incidência em diversas populações é dificultada pelas divergências nos delineamentos dos estudos, inclusão pré-termos de diferentes idades gestacionais, taxas de sobrevivência, além dos diferentes tratamentos utilizados nessa população que podem influenciar o desenvolvimento da doença (3).

Em estudo prospectivo realizado na Suécia avaliou a incidência de ROP em 506 bebês nascidos com menos de 27 semanas de gestação, neste estudo ROP em qualquer grau foi observado em 73% e ROP severa foi reportada em 35% dos casos avaliados (5). Além disso, estudo realizado na Austrália e Nova Zelândia, que teve como objetivo avaliar a incidência de ROP em bebês nascidos com menos de 29 semanas de

gestação, demonstrou que 10% dos 2105 avaliados apresentavam a forma severa de retinopatia da prematuridade (6). Desse modo, estudo retrospectivo realizado na Turquia entre os anos de 2012 e 2020, avaliou bebês nascidos com menos de 34 semanas de idade gestacional e com peso menor de 1700g e verificou que 43% da população estudada apresentava algum tipo de ROP (4). Em contrapartida, estudo finlandês teve como proposta avaliar a incidência de ROP em bebês nascidos com menos de 1000g e a forma severa de ROP foi observada em apenas 5-10% da amostra (3).

Por sua vez, a RD é uma complicação microvascular que ocorre em decorrência do diabetes *mellitus* (DM) sendo uma das principais causas de cegueira em indivíduos em idade produtiva (20-74 anos) (7). Nesse sentido, dados epidemiológicos indicaram que no ano de 2021 cerca de 537 milhões de pessoas eram portadores de DM. As estimativas para o ano de 2045 não são nada animadoras e os dados apontam aumento de 46% na prevalência do diabetes, ou seja, no ano de 2045 cerca de 783 milhões de indivíduos serão portadores de diabetes ao redor do mundo (8). Com o aumento da prevalência de DM associado ao aumento da expectativa de vida dos portadores da doença, devido a avanços no tratamento, a tendência é que haja um aumento no número de pessoas com retinopatia diabética e alterações visuais.

Ademais, outros estudos epidemiológicos mostram que incidência anual da retinopatia diabética varia de 2,2-12,7%, podendo progredir para a fase proliferativa da doença em 3,4-12,3% dos casos (9). Nos Estados Unidos (EUA), estima-se que cerca de 40% dos portadores de DM tipo 2 (DM2) e 86% dos portadores de DM tipo 1 (DM1), apresentem algum grau de retinopatia diabética. Além dos EUA, altas prevalências são reportadas em outros países, como a Austrália, por exemplo (7). Na China, cerca de 20% dos portadores de DM apresentam algum grau de retinopatia (10), já na população rural, as taxas de prevalência aumentam para 43%. Por fim, no sudeste Asiático, a prevalência de RD em portadores de DM chega a 34%, sendo que destes, 10% apresentavam risco de perda de visão em decorrência da doença (7).

A RD é classificada de acordo com seus estágios, sendo que os estágios iniciais são definidos pela fase não-proliferativa e o estágio avançado pela fase proliferativa. Clinicamente, a RD não-proliferativa (RDNP) é caracterizada pela presença de micro aneurismas, hemorragias, exsudatos e alterações na circulação da retina. Já a RD

proliferativa (RDP), apresenta como principal característica a neovascularização (11,12).

Por outro lado, a DMRI, é uma doença que afeta a região macular da retina e é responsável pela perda progressiva da visão central. Com a evolução da doença, estágios neovasculares podem resultar em perda severa e permanente da visão, impactando de maneira direta na qualidade de vida do portador da doença. As previsões para 2040 apontam que cerca de 300 milhões de pessoas serão acometidas por essa doença em todo o mundo. A maioria dos casos de DMRI ocorre em indivíduos com 60 anos ou mais. Estudos populacionais mostram que a prevalência de DMRI tardia é de 0,2% em indivíduos entre 55 e 64 anos, aumentando para 13,1% em pessoas com mais de 85 anos (13). Ainda, recente estudo apresentou projeções para prevalência e incidência da doença na Europa, apontando um aumento de 15% na prevalência e 75% na incidência até 2050 (14).

Desse modo, dados epidemiológicos indicam aumento nas projeções para prevalência e incidência das retinopatias isquêmicas. Portanto, se torna essencial a melhor compreensão dos mecanismos relacionados aos eventos isquêmicos para que seja possível a identificação de novos alvos terapêuticos que possam auxiliar no tratamento e/ou na redução da progressão da doença.

1.1 Retina

A parede ocular possui três camadas concêntricas. A camada externa que é composta pela córnea (transparente) e a esclera (opaca), a camada média que inclui a íris e coroide e a retina que constitui a camada mais interna do olho, essa camada é derivada embriologicamente do diencéfalo sendo, portanto, parte do sistema nervoso central (SNC). A parte funcional da retina é encontrada em toda a face posterior do olho, com exceção do disco óptico, que é o espaço em que os axônios do nervo óptico saem da retina. Esse espaço não possui receptores, sendo comumente denominado como “ponto cego” anatômico (15).

A luz entra no olho através da córnea e transpassa fluidos e estruturas transparentes denominados de meios dióptricos. Essas estruturas e fluidos correspondem à córnea, o humor aquoso, a lente e o humor vítreo. Sendo que o humor vítreo e o humor aquoso auxiliam na manutenção da forma do olho. A luz de um alvo visual é focalizada de

maneira nítida na retina pela córnea e o cristalino, que atuam na curvatura ou refração da luz. Além disso, a visão de maneira apropriada da luz na retina necessita não só do cristalino e da córnea, mas também da íris que irá ajustar a quantidade de luz que entra no olho através da pupila (Figura 1). Sobre a estrutura da retina, ela possui cerca de 0,4mm de espessura nas proximidades do nervo óptico e se torna mais fina em direção à periferia, atingindo cerca de 0,14mm. A mácula corresponde a uma área circular de 1,5mm na retina neural com alta densidade de cones, cerca de 4.000-5.000/mm². Em relação ao suprimento metabólico, a retina neural é suprida pela artéria central retiniana, que se divide em quatro arteríolas no disco óptico (16,17).

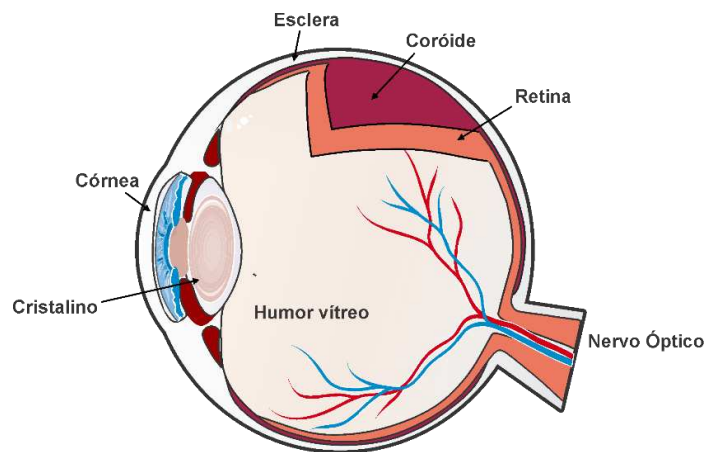


Figura 1. Diagrama das estruturas oculares (18).

Em relação à organização da estrutura da retina, na parte mais externa está localizado o epitélio pigmentar, que se localiza imediatamente dentro da coróide. As células epiteliais pigmentadas se estendem à camada fotorreceptora, envolvendo os segmentos externos dos cones e bastonetes. Essas projeções das células epiteliais atuam como uma barreira, impossibilitando a dispersão transversa da luz entre os fotorreceptores. Além disso, o contato entre a camada epitelial e fotorreceptora é essencial para que o epitélio pigmentar ofereça aporte nutricional e remova resíduos dos fotorreceptores, realize a fagocitose dos segmentos mais externos dos bastonetes que são descamados de maneira contínua, além de atuar na reconversão do pigmento visual metabolizado para que possa ser novamente utilizado e transportado de volta aos fotorreceptores (19–21).

As células gliais da retina como as células de Müller, astrócitos e micróglia apresentam papel relevante na manutenção da geometria interna da retina, vigilância imunológica do tecido, ligação dos neurônios com capilares sanguíneos, além de

exercer papel fundamental no fornecimento de nutrientes para os neurônios retinianos. Ainda, é válido ressaltar que às células de Müller estão organizadas radialmente, em paralelo ao trajeto da luz através da retina. Em relação às principais camadas da retina, a camada plexiforme externa (CPE), contém as sinapses entre os fotorreceptores e os interneurônios retinianos, contendo as células bipolares e horizontais. A camada nuclear interna (CNI), contém os corpos celulares das células bipolares e horizontais além de outros interneurônios retinianos (células amácrinas e interplexiformes) e células de Müller. Já a camada plexiforme interna (CPI) abriga as sinapses entre os neurônios presentes na camada nuclear interna e as células ganglionares, que possuem seus corpos celulares localizados na camada de células ganglionares (CCG). Por fim, a camada mais interna da retina é a membrana limitante interna (MLI) formada pelos pés terminais das células de Müller (Figura 2) (16,19,20).

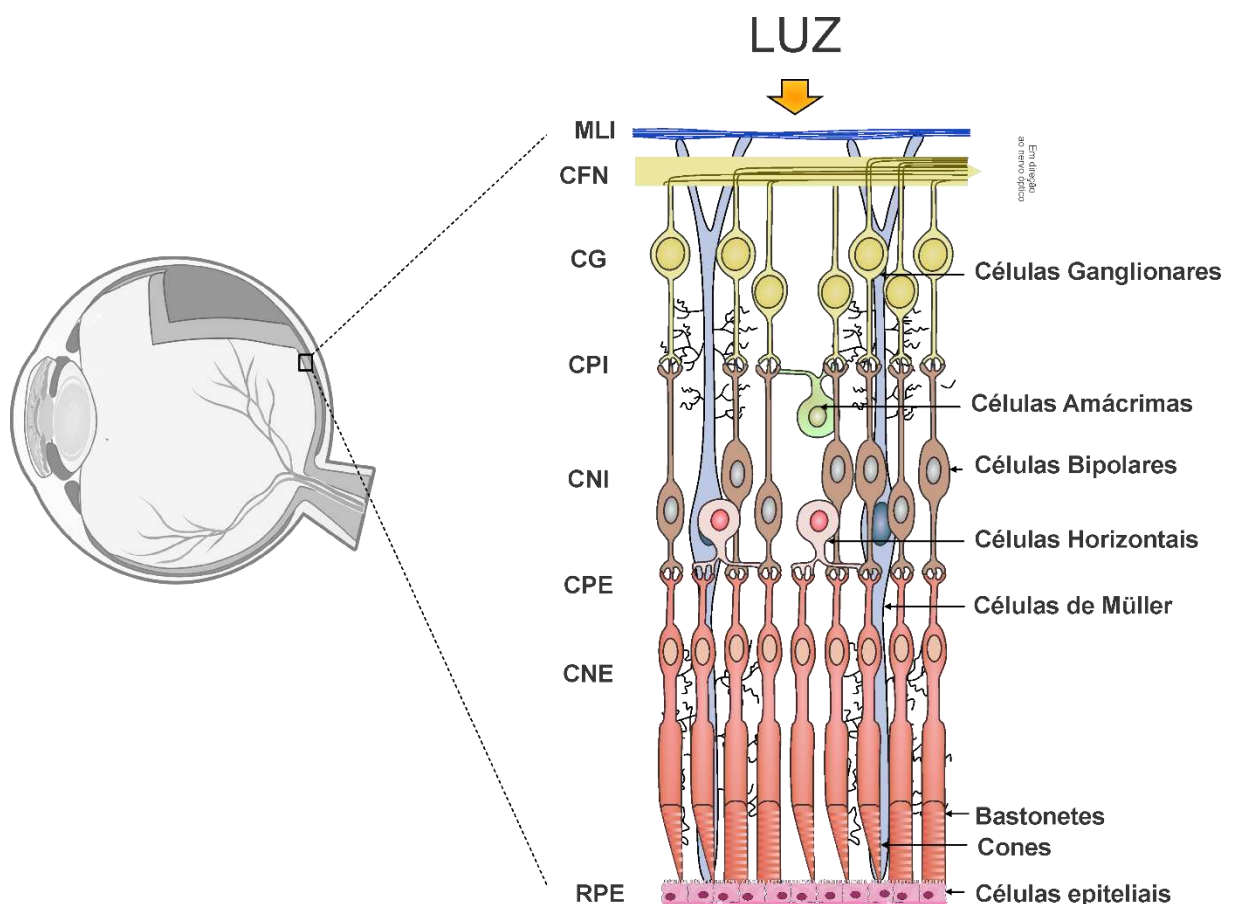


Figura 2. Diagrama do circuito básico da retina. Representação dos sete principais tipos de células neurais retinianas. MLI: membrana limitante interna; CFN: camada de fibras nervosas; CPI: camada plexiforme interna; CNI: camada nuclear interna; CNE: camada nuclear externa; CPE: camada plexiforme externa; RPE: epitélio pigmentado retiniano (19–21) .

A codificação das informações visuais tem início com a conversão da energia luminosa em química, através da excitação dos fotorreceptores. Os fotorreceptores

são divididos em cones e bastonetes. Os cones são sensíveis à luz e responsáveis pela visão em cores. Já os bastonetes, são capazes de detectar a penumbra sendo responsáveis pela visão em preto e branco em condições de baixa luminosidade. Além disso, os cones apresentam sensibilidade cerca de cem vezes menor em comparação aos bastonetes, mas apresentam uma cinética de resposta muito mais rápida durante o processo de fototransdução. Os fotorreceptores utilizam o glutamato como neurotransmissor e realizam sinapses com as células bipolares glutamaérgicas de segunda ordem na CPE. A transmissão das sinapses entre os fotorreceptores e as células bipolares é mediada pelas células horizontais. Sobre as células bipolares, elas podem ser divididas em células bipolares de bastonetes e de cones, sendo que cada tipo realiza sinapses com seu tipo de fotorreceptor específico. Posteriormente, as células bipolares realizam sinapses com as células ganglionares e amácrinas. Cabe destacar que as células ganglionares são as responsáveis pela transmissão das informações ao encéfalo e seus axônios entram no disco óptico, onde deixam o olho como nervo óptico (16,19–22).

1.1.1 Barreira hemato-retiniana

A barreira hemato-retiniana (BHR) é essencial na manutenção e estabelecimento de um microambiente ideal para o correto funcionamento da retina. A BHR, possui função similar à barreira hematoencefálica, tendo como principal característica a seletividade. Atua na regulação do fluxo de íons, água e proteínas entre os leitos vasculares oculares e tecido retiniano, além de ser responsável pela drenagem de produtos residuais do metabolismo da atividade retiniana. Ainda, destaca-se que o correto funcionamento da BHR é capaz de impedir que haja extravasamento de macromoléculas e agente nocivos para a retina (23,24) .

A BHR é composta por dois tipos distintos de barreira, a barreira hemato-retiniana interna (BHRi) e barreira hemato-retiniana externa (BHRe). A BHRe é composta pelas células do epitélio pigmentado retinano (RPE, do inglês *retinal pigmented epithelium*) que se mantém unidas por junções compactas (TJs, do inglês *tight junctions*), e atua na regulação do transporte entre os coriocapilares e a retina. Já a BHRi é composta por células endoteliais da microvasculatura retiana (RMECs, do inglês *retinal microvascular endothelial cells*) unidas por TJs e atua no controle do transporte entre os capilares retinianos. As TJs presentes tanto na BHRi quanto na BHRe são

estruturas complexas e dinâmicas, sendo essenciais na manutenção da integridade da barreira (23,25,26) (Figura 3).

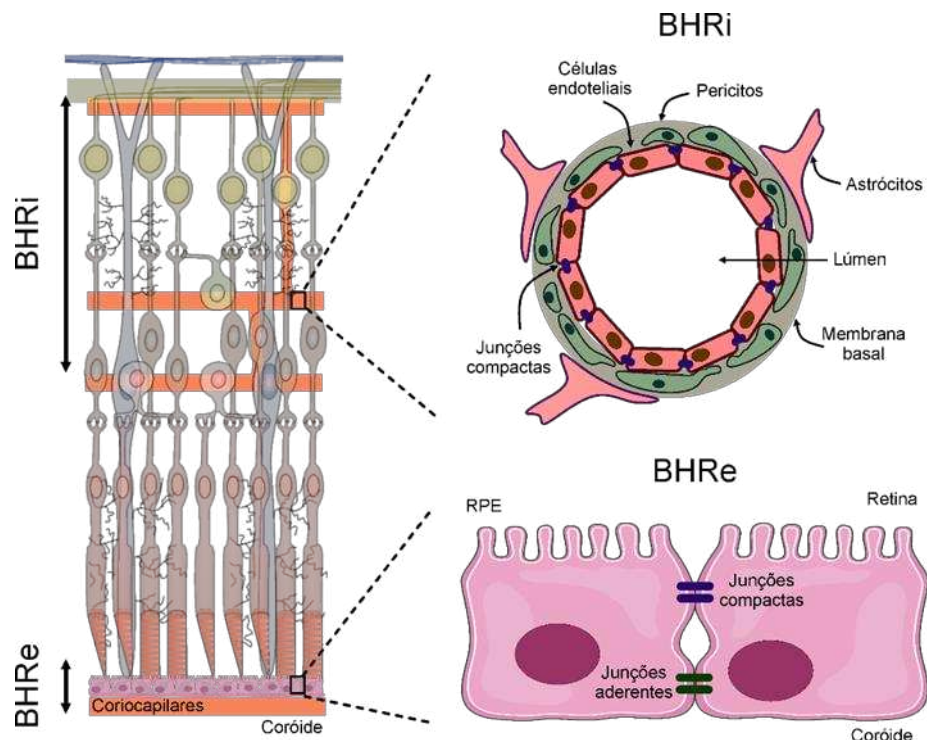


Figura 3. Diagrama das barreiras hemato-retinianas (BHR). Representação da barreira hemato-retiniana interna (BHRi) e barreira hemato-retiniana externa (BHRa). RPE: epitélio pigmentado retiniano. (23,25,26) .

A BHRa é essencial para a sobrevivência dos fotorreceptores, pois desempenha funções essenciais como a filtração, transporte de nutrientes e fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores. Além disso, as células do RPE apresentam outras funções como a absorção da luz, adesão retiniana, transporte e processamento da vitamina A, reisolomerização de trans-retinal para 11-cis-retinal, que são processos fundamentais no ciclo visual (26,27).

O RPE é composto por uma única camada de células unidas por TJs que fazem a união das membranas plasmáticas de células adjacentes. A membrana apical das células do RPE está direcionada para os segmentos externos dos fotorreceptores e a membrana basolateral está direcionada para a membrana de Bruch, separando o RPE da coróide. A porção apical das células epiteliais retinianas é composta por microvilosidades que envolvem os segmentos externos de cones e bastonetes, além de aumentar em 30 vezes a área de superfície das células, o que possibilita uma estreita relação com os fotorreceptores que é essencial para a manutenção da função visual. Por fim, a porção lateral da membrana das células do RPE é o local onde há

comunicação e adesão entre as células. Junções comunicantes, aderentes e TJs são responsáveis pela formação de uma barreira física, que atua na manutenção da polaridade celular e prevenção da difusão intramembranosa entre domínios da membrana basolateral e apical (24,26,27).

As células endoteliais que compõem a BHRi, são responsáveis pela manutenção do correto funcionamento dos capilares retinianos e estão localizadas sobre uma lâmina basal. A BHRi reveste a vasculatura retiniana e tem origem na artéria central da retina, sendo responsável pelo suprimento das camadas internas da retina. A vasculatura retiniana é distribuída em três plexos principais: o superficial, intermediário e profundo que correspondem à camada de fibras nervosas, camada plexiforme interna e camada plexiforme externa, respectivamente. Enquanto a BHRi se refere exclusivamente às propriedades das células endoteliais retinianas, a composição geral da BHRi, é denominada unidade neurovascular (NVU, do inglês *Neurovascular unit*), que apresenta estrutura e função semelhante à barreira hemato-encefálica (BHE). De maneira geral, a NVU compreende as células endoteliais vasculares retinianas, pericitos e células gliais, incluindo células de Müller e astrócitos. Em relação à estrutura da NVU, as células endoteliais vasculares retinianas e são recobertas por prolongamentos de astrócitos e células de Müller. Além destas, os pericitos também estão envoltos na membrana basal e mantem contato com as células endoteliais, entretanto, não apresentam uma camada continua e, sendo assim, não contribuem para a formação da barreira. De maneira geral, os astrócitos, as células de Müller e os pericitos podem influenciar a atividade das células endoteliais retinianas e o funcionamento da BHRi, pois transmitem sinais quando há alteração do microambiente dos circuitos neuronais retinianos.

As células endoteliais retinianas se mantêm conectadas umas às outras através de complexos juncionais, como *tight junctions*, junções aderentes e desmossomos, sendo que as *tight junctions* apresentam um papel central na regulação da barreira celular. De maneira geral, essas estruturas possuem duas principais funções: 1) *gate function*, coordenando a passagem paracelular de moléculas, permitindo a livre passagem de água e moléculas lipossolúveis (O₂ e CO₂) e bloqueando a passagem de eletrólitos, proteínas e moléculas orgânicas hidrofílicas; 2) *fence function*, que conferindo polaridade às células prevenindo o movimento de lipídeos e proteínas entre a membrana apical e basolateral. Além disso, evidências mostram que as *tight*

junctions estão relacionadas a diversos processos de sinalização celular, como por exemplo, na proliferação e diferenciação celular.

A níveis moleculares, as *tight junctions* são constituídas por mais de 40 proteínas que podem ser divididas em: 1) proteínas transmembrana (claudinas, ocludinas e moléculas de adesão juncional (JAMs)); 2) proteínas citoplasmáticas com função andaime (Zônula Ocludens (ZO) e afadina). As claudinas são pequenas proteínas (20-27 kDa) transmembrana e têm papel fundamental no transporte paracelular, formando uma barreira seletiva a íons. As claudinas possuem domínios citoplasmáticos como o NH₂ intracelular e COOH- terminal além de duas alças extracelulares. Ainda, o domínio carboxi-terminal das claudinas são capazes de interagir com a proteína ZO-1, permitindo a conexão entre proteínas transmembrana e a actina do citoesqueleto, coordenando a localização das claudinas nas áreas de contato célula-célula. Já sua porção extracelular, é capaz de interagir com claudinas das células endoteliais adjacentes (28,29).

A ocludina, por sua vez, é uma proteína transmembrana de cerca de 60 kDa que possui duas alças extracelulares e domínios citoplasmáticos NH₂ e COOH terminal. A porção N-terminal da proteína interage com a E3-ubiquitina ligase que coordena a endocitose e degradação de ocludina. Já a sua porção C-terminal se apresenta em uma espécie de espiral que é capaz de se associar à ZO-1, ZO-2 e ZO-3. A expressão de ocludina está diretamente relacionada à função da barreira celular. Já as JAMs, pertencem a superfamília das imunoglobulinas por conterem ao menos um domínio IgG na sua porção N-terminal extracelular. A cauda citoplasmática das JAMs possui uma sequência de ligação ao PDZ que interage com o domínio PDZ de ZO-1 e sua alça extracelular é capaz de interagir com JAMs de células adjacentes ou com JAMs localizadas na própria célula. Além disso, as JAMs atuam principalmente facilitando a estrutura das junções (23,28–32).

Por fim, as ZOs são proteínas de alto peso molecular (>200 kDa) que apresentam função de suporte e conectam as proteínas transmembranas com o citoesqueleto, sendo essenciais para a organização e manutenção da função da barreira das células endoteliais. As ZOs são parte da superfamília MAGUK e possuem três isoformas ZO-1, ZO-2 e ZO-3, sendo a isoforma 1 a mais amplamente estudada. As proteínas ZO possuem três domínios PDZ que permitem a interação com proteínas que possuem o mesmo domínio ou que apresentam em sua estrutura sítios de ligação ao PDZ, como

as claudinas e JAMs. As ZO atuam formando uma conexão entre os complexos juncionais e o citoesqueleto, pois possuem habilidade de se ligar à actina, α -catenina e afadina, dessa forma, promovendo a união das TJ nos locais de contato célula-célula (Figura 4). As ZO apresentam um papel central na formação das *tight junctions* e no correto funcionamento da BHR e BHE, nessa perspectiva, estudos mostram que camundongos deficientes para ZO-1 apresentam letalidade na fase embrionária, além de apresentarem alterações no desenvolvimento da vasculatura e no desenvolvimento do tubo neural. Ainda, estudos que tiveram como objetivo avaliar o surgimento de algumas patologias relacionadas com a disfunção da BHE e BHR demonstraram que a perda ou redução de ZO-1 apresentava correlação com o aumento da permeabilidade paracelular, reforçando a ideia de que ZO-1 é um importante marcador de extravasamento e disfunção das barreiras endoteliais (28,29,33,34) .

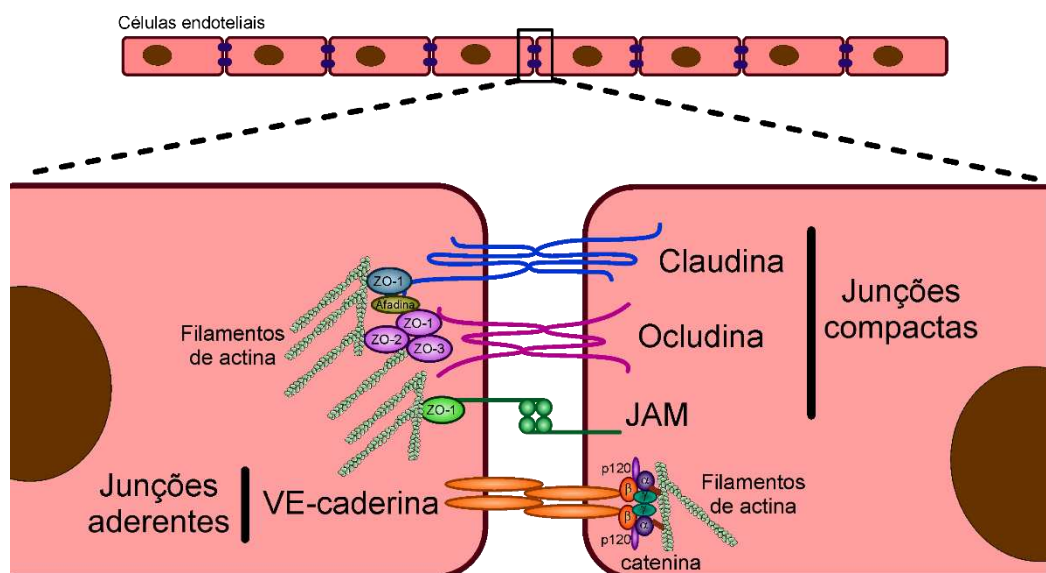


Figura 4. Diagrama dos complexos juncionais. Representação dos principais complexos juncionais responsáveis pela adesão célula-célula e responsáveis pelo correto funcionamento das barreiras hemato-retinianas. JAM: moléculas de adesão juncional; ZO: Zônula occludens (33,34).

1.1.2 Vasculatura retiniana

A vascularização é essencial para o correto funcionamento do organismo como um todo, mas o sistema ocular apresenta duas principais particularidades. Em primeiro lugar, o fato de o olho ser um dos principais órgãos sensoriais do corpo e a retina apresentar uma das maiores taxas metabólicas do organismo. Em segundo lugar, como parte do sistema nervoso central (SNC), a retina é protegida do conteúdo vascular por barreiras hemato-retinianas. Em relação à função e estrutura do sistema

vascular retiniano, ele é composto por artérias e veias de maior calibre (macrovasculatura) e pequenos vasos (microvasculatura). De maneira geral, a macrovasculatura é responsável pela distribuição dos produtos sanguíneos com alta velocidade e pressão, enquanto a microvasculatura são frequentemente especializadas, de acordo com o tecido que suprem. Os vasos sanguíneos que possuem diâmetros maiores que 100-200 μm compõem o sistema macrovascular, enquanto vasos menores de 100 μm compõem a microvasculatura. Ainda, destaca-se que a maioria dos vasos que irrigam o olho são considerados do sistema microvascular (29,35–37) .

Em relação as principais funções do sistema vascular, ele é responsável pelo fornecimento de oxigênio, nutrientes e precursores para a realização de processos metabólicos, transporte de fatores de crescimento e hormônios. Além de ser responsável pela remoção de subprodutos do metabolismo, tem papel essencial na defesa do organismo, através da entrega de células imunes e anticorpos, bem como citocinas e quimiocinas. Por fim, o sistema vascular também é responsável pela regulação do fluxo sanguíneo para os diversos tecidos (29,35–37).

Os vasos sanguíneos são revestidos por células endoteliais e possuem pequenas fendas intercelulares por onde fluidos são capazes de se mover livremente. Essas estruturas abrangem cerca de 1 milésimo da área da superfície endotelial e possibilita a passagem de pequenas moléculas e íons solúveis em água. Além destas fendas, as células endoteliais também apresentam caveolinas que possibilitam a endocitose de moléculas maiores. Além disso, materiais lipossolúveis como o oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2) também são capazes de se difundir através da membrana celular, sendo a taxa de difusão destes materiais é muito mais rápida quando comparada a substâncias solúveis em água, como por exemplo, a glicose. Por fim, as células endoteliais se mantem conectadas por *tight junctions*, que apresentam função primordial no controle da permeabilidade da barreira retiniana (29,36).

Especificamente sobre a vasculatura retiniana, ela possui a função de sustentar metabolicamente a retina interna através de uma malha laminar de capilares que permeia o tecido neural. Em contrapartida a retina externa é avascular e seu suprimento é fornecido pela vasculatura da coroide, sendo o RPE responsável pela separação dessa vasculatura da retina neural. Existem diversas particularidades em relação a vasculatura retiniana, sendo a principal o fato de que os vasos sanguíneos

são altamente dispersivos e se localizam no caminho da passagem de luz, podendo interferir no processo visual, sendo assim, é geralmente aceita a teoria de que os primatas desenvolveram uma zona foveal avascular (ZFA) que age minimizando a dispersão vascular e concentração dessa dispersão em direção à maior acuidade da retina. Nesse sentido, a vasculatura retiniana é criticamente organizada, ocorrendo poda de vasos durante a fase de desenvolvimento, para que seja possível minimizar o número de vasos e manter as altas demandas metabólicas do tecido. Essa vantagem do menor número de vasos para auxiliar o processo visual em conjunto com as altas taxas metabólicas da retina, pode ser a razão pela qual a retina é altamente sensível à insultos vasculares (29,33,35–37).

1.1.2.1 Desenvolvimento da vasculatura retiniana

A vascularização retiniana se inicia durante o desenvolvimento embrionário, nesse período novos vasos se originam a partir do nervo óptico, esses novos vasos inicialmente formam um plexo primário na camada de fibras nervosas que, posteriormente irá formar brotamentos na retina, estabelecendo um plexo secundário, mais profundo. Em seres humanos, a formação da vasculatura hialoide e a maioria do desenvolvimento da vasculatura retiniana se dá na fase intrauterina. A vasculatura hialoide tem origem na artéria hialoide central, que dá origem a uma vesícula óptica durante o fechamento da fissura óptica, que ocorre por volta da sexta semana de gestação. Ela é formada pela artéria hialoide (AH), *vasculosa hyaloidea propria* (VHP), *tunica vasculosa lentis* (TVL) e pela membrana pupilar (MP). A ramificação da artéria hialoide sobre a superfície posterior da lente forma a TVL. Em seguida, há a expansão da TVL na porção inferior da lente, dando origem a MP. A VHP, por sua vez, também se deriva da AH (38–40).

Posteriormente, por volta da 13ª semana de gestação os vasos hialoides começam a regredir e, de maneira concomitante, se inicia a formação do plexo primário, que se origina de um anel de capilares presente no nervo óptico, se espalhando pela superfície interna da retina, em quatro principais lobos. O plexo primário atinge a periferia da retina nasalmente na 36ª de gestação e temporalmente por volta da 40ª de gestação. Ainda, nas semanas gestacionais 25-26, os componentes mais profundos dos plexos se formam através de brotamento e esses brotos penetram a retina e estabelecem duas redes laminares em ambos os lados da camada nuclear

interna. Por fim, o crescimento mais profundo dos vasos ocorre do centro para a periferia e que a zona foveal permanece desprovida de vasculatura durante todo o desenvolvimento. A vascularização retiniana se completa por volta da 38-40ª semana, neste momento os vasos hialóides já regrediram totalmente (Figura 5). Por essa razão, nascidos pré-termos apresentam a vasculatura retiniana incompleta, com áreas avasculares (38–41).

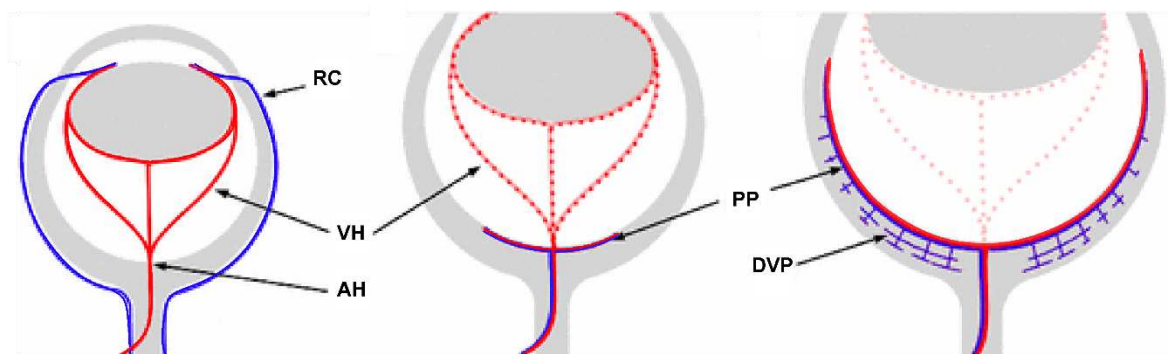


Figura 5. Diagrama representativo do desenvolvimento da vasculatura retiniana. A VH é suprida pela AH e a drenada para a RC localizada na parte externa do olho. Posteriormente, ocorre a regressão da VH, originando o plexo primário da vasculatura retiniana (destaca-se o plexo primário é composto por artérias e veias). Em seguida, ocorre o desenvolvimento dos plexos mais profundos da retina, a partir do plexo primário. VH: Vasculatura hialóide; AH: artéria hialóide; RC: Rede coroidal venosa; PP: Plexo primário; DVP: Plexo profundo. Adaptada de Fruttiger M, 2007(40).

O desenvolvimento vascular se dá em duas fases, a fase vasculogênica e angiogênica. De maneira geral, a fase vasculogênica está relacionada no surgimento de novos vasos a partir de angioblastos derivados da medula óssea que ocorre durante a embriogênese. Já a fase angiogênica, mecanismos fisiológicos de hipóxia são ativados culminando no desenvolvimento de novos vasos a partir de vasos pré-existentes. Na fase de desenvolvimento fetal, a hipóxia tecidual é capaz de estimular a atividade do fator induzido por hipóxia (HIF-1 α , do inglês *hypoxia inducible factor 1*), que atua aumentando a expressão de diversos fatores de crescimento como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), o fator de crescimento placentário (PLGF, do inglês *placental growth factor*) e eritropoetina (EPO). Na fase de desenvolvimento, a hipóxia é um fator essencial para a estimulação da angiogênese e do correto desenvolvimento tecidual e que a interação materno-fetal uterina é capaz de estimular e promover as condições necessárias de oxigênio para estimular o crescimento e desenvolvimento da vasculatura retiniana. Após o seu desenvolvimento, a artéria central retiniana e seus principais ramos possuem mais de 100 μm de diâmetro, de maneira similar à veia

central da retina e seus principais constituintes. As artérias e veias coroides, por sua vez, variam seu tamanho para mais de 200 μm de diâmetro (23,25,30,38–41).

Em camundongos, o desenvolvimento da vasculatura retiniana se dá de maneira similar aos humanos, entretanto, se inicia após o nascimento. Sendo que os primeiros vasos retinianos se originam da cabeça do nervo óptico formando o plexo primário que atinge a periferia por volta do dia pós-natal 7 (P7). No P7, o plexo mais profundo começa a crescer a partir das veias do plexo primário, penetrando a retina e estabelecendo uma rede laminar em torno da membrana limitante interna. A regressão dos vasos hialoides também ocorre no período pós-natal, com acentuada regressão da VHP e TVL entre o P4 e P8 (25,40) (Figura 6).

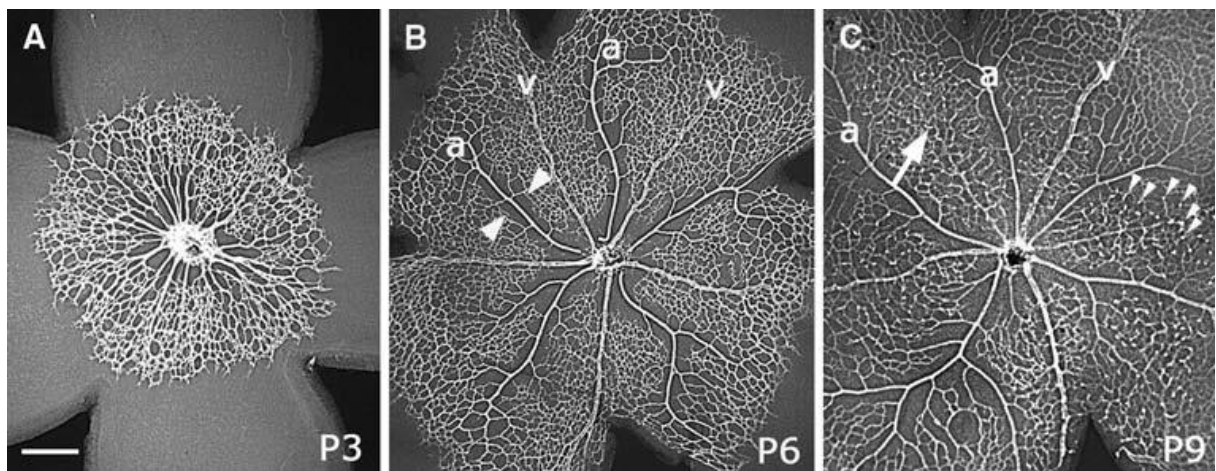


Figura 6. Desenvolvimento da vasculatura retiniana de camundongos (40). Retinas inteiras foram marcadas com anticorpo anti-Colágeno IV. Barra de escala - 200 μm . A: artérias; V: veias; pontas de setas (B): zonas livre de capilares indicando artérias; ponta de seta (C): brotamento de vasos; seta: veias desaparecem do plexo primário e se realocam nos plexos mais profundos.

1.1.2.2 Plexos retinianos

No interior da retina existem até quatro leitos capilares principais, sendo que o número e localização desses leitos irá variar de acordo com a anatomia retiniana local. Os leitos capilares localizados perto da fóvea são reduzidos a uma única camada, sendo que a maioria dos indivíduos não possuem capilares na fóvea, criando a ZFA. Os três leitos capilares intrarretinianos se localizam dentro da retina, próximo ou dentro das camadas nucleares, suprimindo os corpos celulares. O plexo vascular superficial (SVP) se localiza na camada ganglionar da retina. Abaixo do SVP, estão os dois plexos mais profundos, o plexo vascular intermediário (IVP) que se localiza próximo ao topo da camada nuclear interna e o plexo vascular profundo (DVP), localizado na porção inferior da camada nuclear interna. A disposição desses plexos se dá de acordo com

a espessura total da retina, e na periferia, onde as camadas retinianas são mais finas, existe um único plexo capilar. Sendo assim, cada plexo está localizado de maneira estratégica para fornecer suprimento às camadas retinianas com maiores demandas metabólicas. Além disso, cada plexo apresenta um diferente padrão vascular, o SVP apresenta projeções mais lineares da arteríola em direção à vênula e o DVP possui uma estrutura mais tortuosa. Ainda, um quarto plexo de capilares radiais corre paralelamente aos feixes de axônios das células ganglionares para atender a alta demanda metabólica dos axônios não mielinizados. Essa camada de capilares é mais proeminente perto do nervo óptico, onde os axônios são mais numerosos (Figura 7) (38,40).

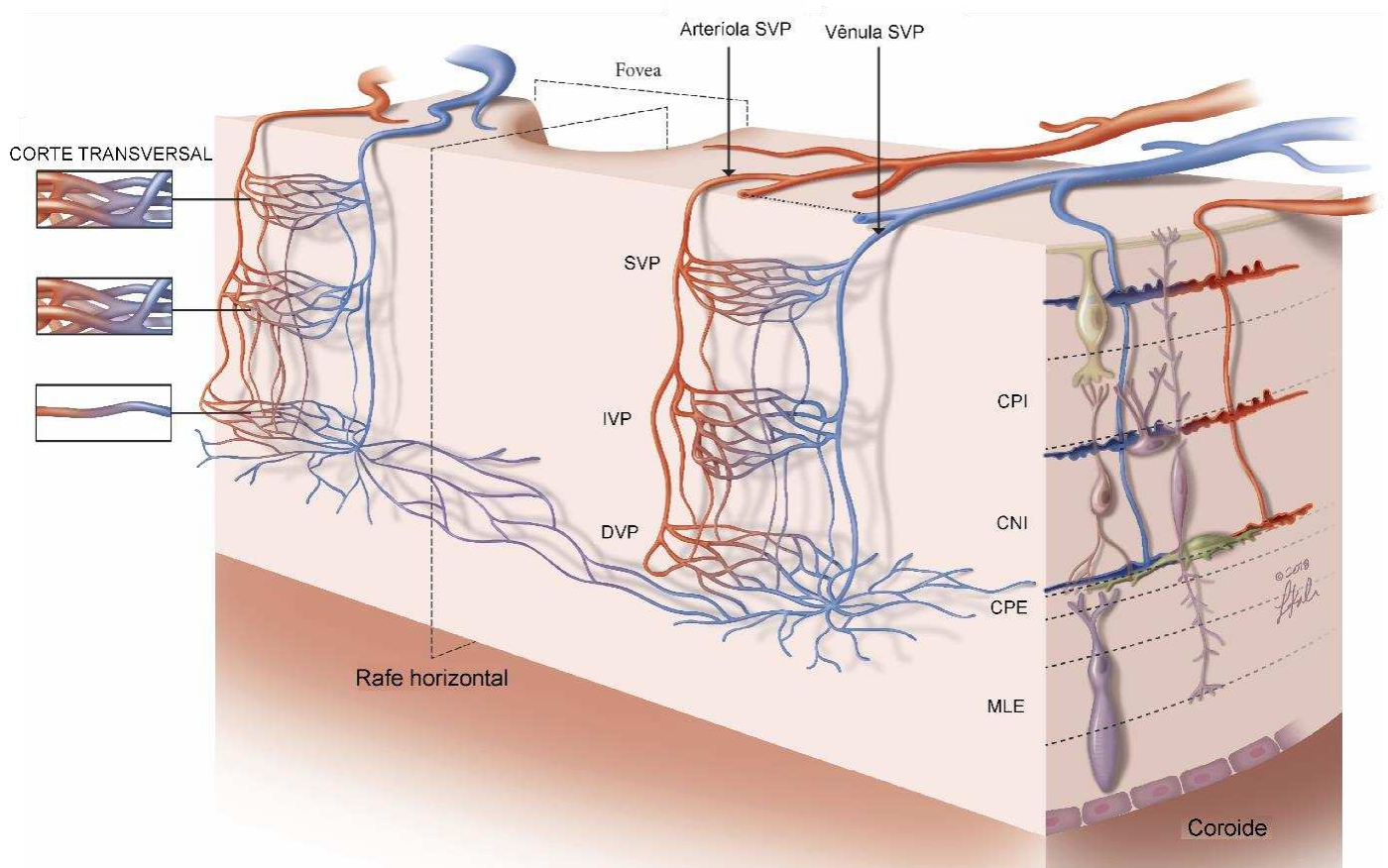


Figura 7. Representação dos plexos retinianos. Representação tridimensional das conectividades dos plexos vasculares da retina. CPI: camada plexiforme interna; CNI: camada nuclear interna; CNE: camada nuclear externa; CPE: camada plexiforme externa; MLE: membrana limitante externa; SVP: Plexo vascular superficial; IVP: Plexo vascular intermediário; DVP: Plexo vascular profundo. Adaptada de Nesper e Fawzi, 2018 (42).

1.2 Fisiopatologia das retinopatias isquêmicas

1.2.1 Retinopatia da prematuridade (ROP)

A ROP é uma doença multifatorial, que afeta o sistema vascular retiniano imaturo, sendo assim ocorre em nascidos pré-termos que não possuem a retina completamente vascularizada. Os fatores de risco para o seu desenvolvimento são o baixo peso ao nascer e a idade gestacional, além destes, a hiperóxia é um dos fatores frequentemente associados ao desenvolvimento da doença. A patogênese da ROP tem sido amplamente estudada tanto em seres humanos, quanto em modelos animais (3,43).

Como já abordado anteriormente, o desenvolvimento da vasculatura retiniana se inicia por volta da 13^a semana de gestação e é finalizada na 40^a semana. Sendo assim, bebês prematuros apresentam o desenvolvimento incompleto da vasculatura retiniana, além de uma zona avascular periférica. Ainda, o aumento na biodisponibilidade de oxigênio expõe os bebês prematuros a um ambiente relativamente hiperóxico, que em conjunto com o sistema antioxidante imaturo, leva ao aumento do estresse oxidativo e inflamação. Além disso, o aumento na disponibilidade de oxigênio também é capaz de inibir a expressão HIF-1 α e de VEGF, interrompendo o crescimento dos vasos sanguíneos retinianos (4,43,44).

O desenvolvimento da ROP se dá em duas fases. A fase 1 é conhecida como vaso-obliterativa. Essa fase se caracteriza pela interrupção e atraso no crescimento da vasculatura retiniana, associada à degeneração da microvasculatura. Essas alterações ocorrem, pois, os bebês prematuros são expostos a maiores tensões de oxigênio após o nascimento quando comparado ao útero, o que diminui os mecanismos fisiológicos de ativação da hipóxia. Nesse sentido, a hiperóxia atua reduzindo a expressão e atividade de HIF-1, VEGF e EPO, além de aumentar a vaso-obliteração dos capilares retinianos imaturos pelo aumento do estresse oxidativo e inflamação (2,4,45).

Já na fase 2, com a perda de vasos sanguíneos e o aumento da demanda metabólica faz com que a retina se torne gradualmente hipóxica, o que leva a intensa liberação de fatores de crescimento, especialmente o VEGF, que induzem o crescimento,

diferenciação e migração das células endoteliais. Essas alterações induzem o crescimento anormal de novos vasos. Interessantemente, esses novos vasos falham em reperfundir a retina avascular, uma vez que ao invés de crescer em áreas de necessidades, eles crescem de maneira desordenada em direção ao vítreo, podendo levar ao desenvolvimento de fibrose que pode causar o descolamento da retina e levar à perda da visão (1–3).

De acordo com a classificação internacional de ROP a doença pode ser dividida em 5 estágios. Inicialmente ocorre a demarcação da retina vascular e avascular por uma fina linha (estágio 1). Após isso, com a progressão da doença surge uma crista elevada entre a retina vascular e avascular (estágio 2). Os dois estágios iniciais são considerados leves e a doença é capaz de regredir de maneira espontânea. Entretanto, a vasculatura pode continuar a crescer para fora do plano retiniano, levando ao estágio de proliferação fibrovascular a partir da crista elevada (estágio 3). Esses novos vasos, são extremamente frágeis e podem sangrar no vítreo, causando tração e fibrose o que pode levar aos últimos estágios, 4 e 5. Sendo o estágio 4 marcado pelo descolamento parcial da retina e o estágio 5, pelo descolamento total do tecido retiniano, levando à cegueira permanente (3,43) (Figura 8).

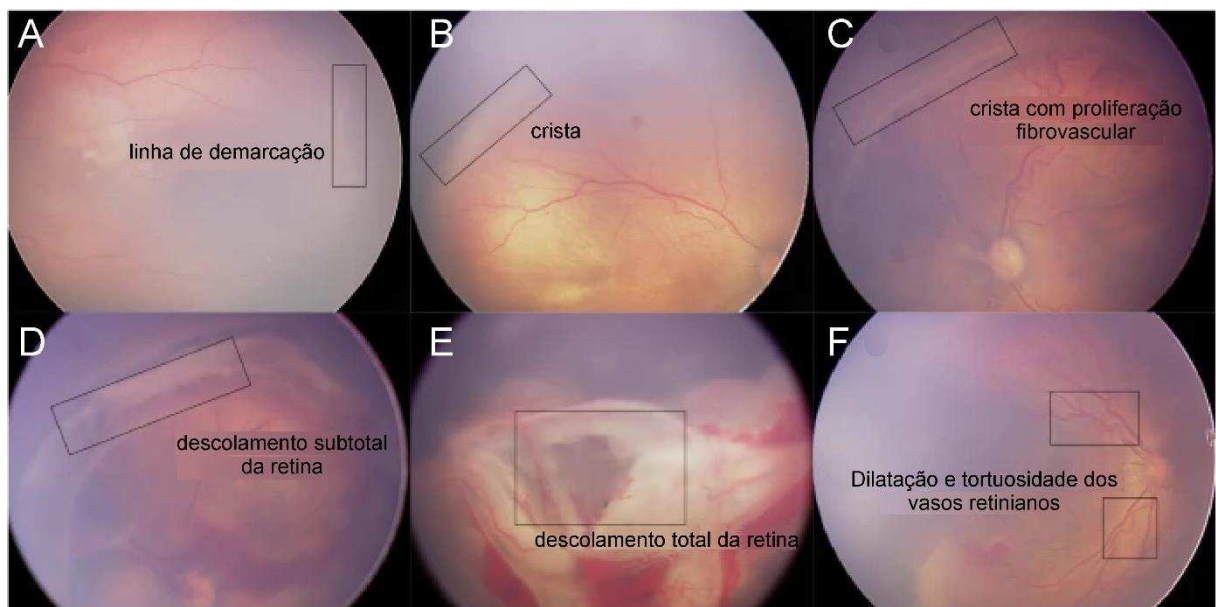


Figura 8. Imagens representativas dos estágios da retinopatia da prematuridade (ROP). Caixas indicam os locais das lesões. A) Estágio 1: linha de demarcação. B) Estágio 2: Crista elevada. C) Estágio 3: Proliferação fibrovascular a partir da crista elevada. D) Estágio 4: Descolamento parcial da retina. E) Estágio 5: Descolamento total da retina. F) Doença plus: dilatação e tortuosidade dos vasos retinianos. Adaptada de Tong et al. 2020 (46).

Como um dos fatores de risco é a adoção da terapia de oxigênio em bebês prematuros, diversos ensaios clínicos foram realizados na tentativa de encontrar uma faixa ideal de saturação de oxigênio que seja capaz de proteger contra as alterações da ROP na fase 1 sem que haja o aumento na morbidade e mortalidade desses bebês. Além disso, outros estudos com foco em realizar tratamentos com altos níveis de oxigênios em bebês com ROP na fase 2 não apresentaram nenhum efeito na remissão da doença. Apesar de a faixa ideal não ter sido encontrada, estes estudos sugerem que a faixa de saturação de oxigênio de 90 a 95 % parece ser mais segura em comparação a de 85 a 89%, um outro fator que parece ser importante em relação ao surgimento da ROP são as alterações na flutuação de oxigênio, sendo assim, recomenda-se estrito monitoramento para que tais alterações sejam prevenidas. Por fim, mais estudos se fazem necessários para que seja possível otimizar a terapia de oxigênio para que seja possível prevenir a ROP (3,4,43).

1.2.2 Retinopatia diabética (RD)

A RD é uma complicação microvascular associada ao diabetes e é considerada a principal causa de cegueira em indivíduos em idade produtiva ao redor do mundo. Nesse sentido, diversos fatores de risco estão associados com o surgimento e progressão da RD, como o tempo de duração do diabetes, a hiperglicemia, hipertensão, entre outros. Sua evolução é marcada pelo aumento na permeabilidade vascular, isquemia e proliferação anormal de novos vasos. Clinicamente a doença é definida por alterações microvasculares retinianas em pacientes diabéticos. A RD tem sua fase inicial denominada como retinopatia diabética não proliferativa (RDNP) e pode evoluir para a fase proliferativa (RDP) (7) (Figura 9).

A RDNP é caracterizada pela alteração na microvasculatura retiniana. No início da RD, ocorre uma diminuição da perfusão retiniana causada pela constrição da vasculatura arterial retiniana. Além disso, alterações na expressão de proteínas de junção, apoptose de pericitos e células endoteliais induzem o espessamento da membrana basal. Posteriormente, pacientes diabéticos apresentam um aumento no calibre das arteríolas da retina. A dilatação atua como precursor de disfunção microvascular, indicando deficiência na autorregulação arteriolar. Essa dilatação leva ao aumento da pressão do capilar podendo gerar microaneurismas, extravasamento de exsudatos e hemorragia. Além disso, nesse estágio também há a disfunção da

barreira hemato-retiniana, isquemia e aumento da permeabilidade vascular (7,9,11,47,48) (Figura 9).

A neovascularização distingue a fase não-proliferativa da fase proliferativa. Com o surgimento de novos vasos, pode haver hemorragia vítrea ou descolamento da retina, levando o indivíduo à perda total da visão (Figura 9). Em relação às alterações moleculares, diversos mecanismos estão relacionados com a patogênese da doença. A formação de produtos de glicação avançada (AGEs, do inglês *advanced glycation end-products*), o aumento do estresse oxidativo, a ativação da proteína quinase C (PKC), aumento de processos inflamatórios e na expressão e atividade de VEGF estão intimamente relacionados com o desenvolvimento da doença, sendo a intensa ativação de VEGF o fator mais relevante na progressão da RD (7,49,50).

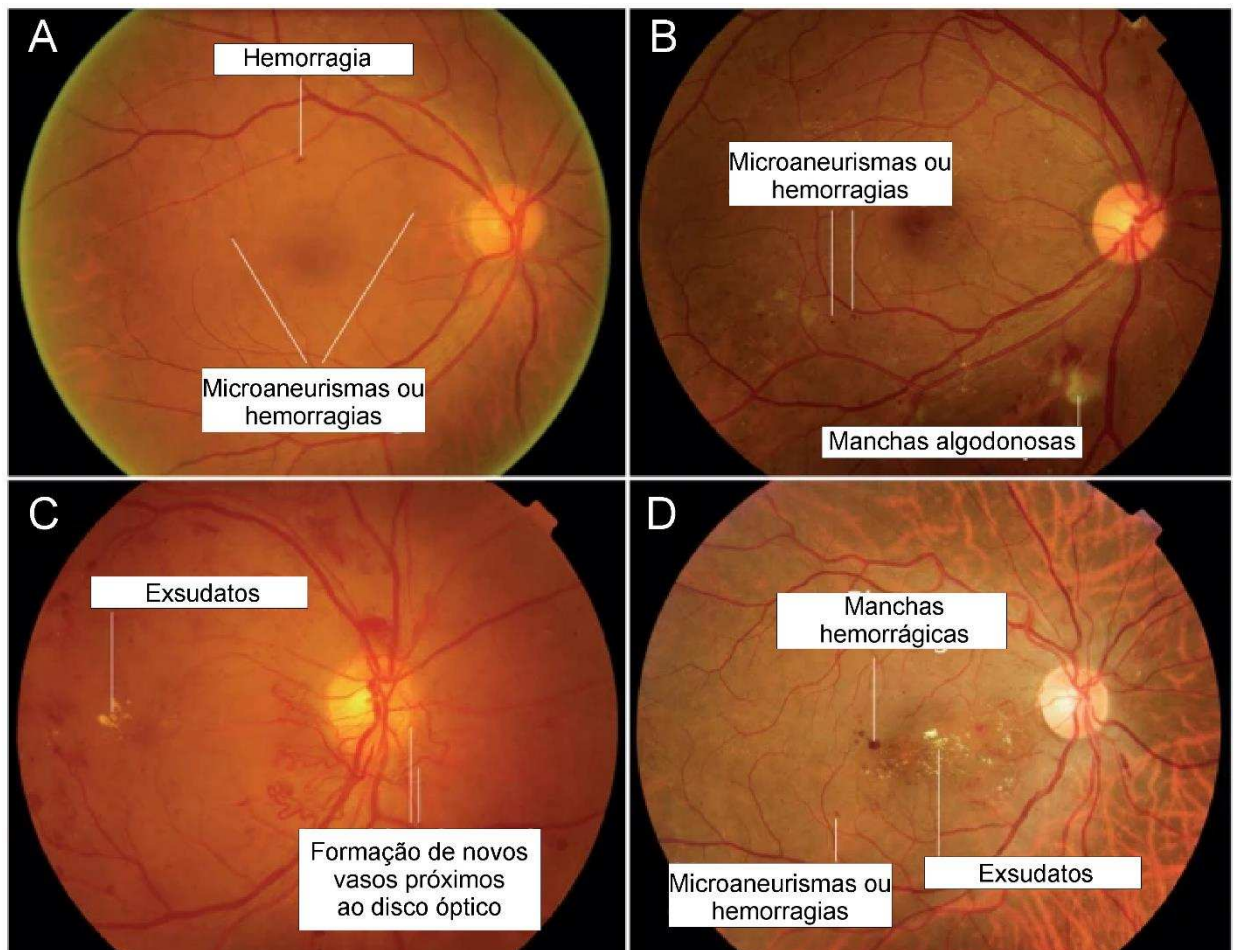


Figura 9. Imagens representativas dos estágios da Retinopatia Diabética (RD). A) RD não proliferativa (RDNP) leve com a presença de microaneurisma e hemorragia. B) RDNP moderada com microaneurismas, hemorragias e manchas algodonosas. C) RD proliferativa (RDP) evidenciando novos vasos sanguíneos no disco óptico. D) Edema macular diabético com a presença de exsudatos no centro da fóvea. Adaptada de Wong et al. 2016 (47).

1.2.3 RD e ROP

Em patologias como a RD e a ROP, ocorre o comprometimento da vasculatura retiniana e apesar de as alterações iniciais diferirem os estágios finais apresentam semelhanças. No caso da RD, o diabetes expõe o tecido retiniano a AGEs, altas concentrações de citocinas de caráter pró-inflamatório como a interleucina-1 β (IL-1 β) e TNF- α e aumento do estresse oxidativo alteram a homeostase do tecido e podem induzir a apoptose de células retinianas. Além disso, a resistência à insulina também pode levar a alterações capilares, levando à prejuízos na vasculatura do tecido. Já na ROP, os leitos vasculares não se formam de maneira adequada devido a altas tensões de oxigênio associado a redução na expressão de VEGF (2,43,51,52).

Em resposta às alterações vasculares que ocorrem nas fases iniciais, o tecido retiniano aciona mecanismos de crescimento na tentativa de garantir níveis adequados de perfusão para a retina isquêmica. Durante as fases proliferativas da RD e ROP, neurônios, astrócitos e outras células retinianas se tornam hipóxicas devido à perda da vasculatura. Posteriormente, ocorre um aumento na expressão de fatores angiogênicos, em especial o VEGF, que induz o crescimento desordenado de novos vasos em direção ao vítreo. Deste modo, os dados obtidos em estudos experimentais são essenciais para compreender os mecanismos relacionados com o desenvolvimento da fase proliferativa das doenças e dados obtidos em modelos animais de ROP podem ser extrapolados e aplicados à ROP (2,51).

Durante a hipoxia ou episódios isquêmicos, ocorre degeneração capilar e isso pode alterar o metabolismo e a homeostase de diversos tipos celulares, contribuindo para a progressão das retinopatias. Alguns metabólitos como o succinato e a adenosina, podem gerar uma resposta angiogênica. A adenosina é gerada durante o metabolismo do ATP e o succinato é produzido como um intermediário do ciclo de Krebs durante a respiração celular. Esses metabólitos, além de seu papel descrito na produção de energia, apresentam outras funções. De maneira geral, em condição de oxigenação adequada, o ciclo de Krebs produz energia o que eleva os níveis de ATP e mantém os níveis de adenosina baixos. Entretanto, em casos de baixa disponibilidade de oxigênio, os intermediários do ciclo de Krebs, como o succinato, se acumulam além de aumentar os níveis de adenosina. Com esse aumento, o succinato e a adenosina são capazes de atuar como mediadores pró-angiogênicos na tentativa de

reestabelecer o suprimento sanguíneo e o fornecimento de oxigênio para as células. Ainda, além das células endoteliais esse mecanismo pode ser ativado em monócitos e neurônios retinianos, evidenciando o papel orquestrado de diversos tipos celulares retinianos na tentativa de restaurar o equilíbrio energético em situação de estresse (1,2,43,44,48,52–56).

1.2.4 Fator induzido por hipóxia (HIF)

A hipóxia é definida pela redução na disponibilidade de O₂ em determinada célula, tecido ou órgão. A redução nos níveis de O₂ pode causar alteração na transcrição genica ou levar a alterações pós-transcricionais, levando a alterações no metabolismo celular. Os principais reguladores da homeostase de oxigênio são os fatores induzíveis por hipóxia (HIFs), sendo sua expressão e atividade relacionada não apenas ao desenvolvimento fisiológico, mas também ao surgimento de diversas doenças, dentre elas as retinopatias isquêmicas (57,58).

HIF é um fator de transcrição composto por um complexo heterodimerico com duas subunidades: uma subunidade dependente de oxigênio (HIF- α) e uma subunidade nuclear expressa de maneira constitutiva (HIF-1 β) também denominada como translocador nuclear receptor aril hidrocarboneto (ARNT, do inglês *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*). Existem três isoformas da subunidade α (HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α), sendo as isoformas HIF-1 α , HIF-2 α essenciais para a resposta à hipóxia e capazes de formar um complexo com HIF-1 β (59).

Em condições normais de oxigênio (normóxia), a subunidade α de HIF ainda no citosol sofre hidroxilação pelas enzimas prolil-hidroxilase (PHDs). As PHDs são parte de uma pequena família de proteínas e nos seres humanos se apresentam em três isoformas (PHD1, PHD2 e PHD3). A hidroxilação de HIF pelas PHDs leva ao recrutamento da proteína Von-Hippel-Lindau (VHL) e outros cofatores que permitem a ubiquitinação e HIF pelo complexo CRL2^{VHL} E3 e degradação pelo proteassoma 26S. Uma vez que as PHDs utilizam como cofatores oxigênio e íons de ferro, com baixa disponibilidade de oxigênio (hipóxia) há uma redução na atividade das PHDs o que leva a estabilização de HIF- α e subsequente translocação ao núcleo celular. Posteriormente a proteína forma um dímero com a isoforma constitutiva (HIF-1 β) formando o complexo HIF-1 que se liga aos elementos de resposta à hipóxia em regiões

promotoras específicas do genoma. Uma vez no núcleo, HIF é capaz de ativar a expressão de diversos genes relacionados com o processo de angiogênese como VEGF, EPO, PDGF, genes relacionados ao metabolismo de glicose, sobrevivência e proliferação celular (Figura 10) (57–59).

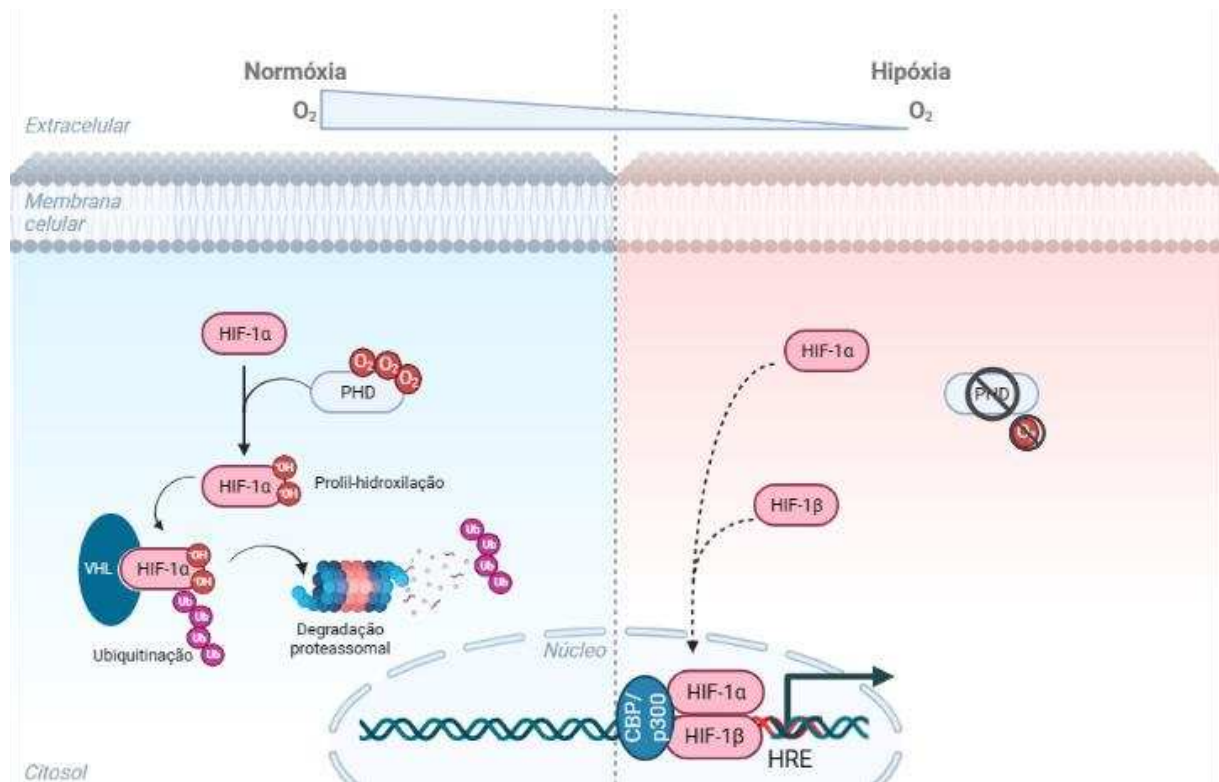


Figura 10. Sinalização do fator induzível por hipóxia (HIF) (58,60). Em condições normais de oxigênio (O_2) as enzimas prolil-hidroxilases (PHDs) coordenam a hidroxilação de HIF-1 α no citosol. Posteriormente, há o recrutamento da proteína Von-Hippel-Lindau e ubiquitinação de HIF-1 α , marcando a proteína para degradação proteassomal. Em contrapartida, em baixas concentrações de oxigênio (hipóxia), há redução da atividade das PHDs, estabilizando HIF-1 α no citosol e possibilitando a migração ao núcleo e ligação aos elementos de resposta à hipóxia (HRE), ativando a transcrição de diversos genes responsivos à hipóxia. Imagem criada com biorender.

1.2.5 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) apresenta papel central na fisiopatologia das retinopatias isquêmicas. O VEGF é reconhecido pelo seu receptor localizado na membrana plasmática das células e há três isoformas dos receptores de VEGF em humanos, o VEGFR1 (FLT1), VEGFR2 (FLK1) e VEGFR3 (FLT4). Todos os receptores possuem um domínio extracelular de interação ao ligante composto por sete loops, um domínio justamembranar, um domínio TK intracelular e uma cauda C-terminal. As isoformas apresentam diferentes propriedades de interação ao ligante e

funções biológicas distintas. Os receptores são capazes de reconhecer a família do VEGF (VEGF-A, -B, C, -D e PLGF). Sendo o VEGF-A, mais relevante nos processos relacionados as alterações nas células endoteliais retinianas e no processo de angiogênese (61–63).

Em relação à afinidade, o VEGF-A se liga ao VEGFR1 e VEGFR2, enquanto o VEGF-B e PLGF são capazes de interagir apenas com o VEGFR-1. Já o VEGF-C e VEGF-D possuem maior capacidade de se ligar ao VEGFR3. Entretanto, as vias desencadeadas pela interação VEGF-C/VEGF-D/VEGFR3, culminam na formação dos vasos linfáticos, que não estão presentes na retina, sendo assim não apresentam relevância na fisiopatologia das retinopatias isquêmicas. Já a expressão de VEGFR1 foi encontrada em diversos tipos celulares retinianos, como as células endoteliais da retina e coroide, pericitos, células do sistema imunológico residentes na retina, células de Müller, fotorreceptores e células do RPE, sendo que a expressão varia de acordo com o microambiente retiniano em diferentes fases como o desenvolvimento, doenças e até mesmo na homeostase do tecido. Cabe ressaltar que dois processos são capazes de influenciar a expressão do VEGFR1, redução na concentração de oxigênio e processos inflamatórios (61,64,65).

Em relação à hipóxia, mecanismos transcricionais e pós-transcricionais são capazes de modular a expressão de VEGF-A, sendo o principal regulador da expressão de VEGF-A a ligação de HIF-1 e HIF-2 na região promotora ou em regiões regulatórias no genoma. Além disso, em hipóxia há a estabilização do mRNA de VEGF-A, aumentando a sua meia vida de cerca de 45 minutos para mais de 8 horas, gerando grande impacto na produção da proteína VEGF-A. Ainda, HIF também é capaz de aumentar a expressão de outros membros da família do VEGF, bem como seus receptores (61,66).

A respeito da sinalização mediada pela ligação de VEGF-A a seu receptor, após a interação com o ligante alterações conformacionais no receptor induzem a autofosforilação nos resíduos de tirosina intracelular. Após a ativação do receptor, diversas vias de sinalização são ativadas, como a proteína quinase regulada por estímulos extracelulares (ERK – do inglês *Extracellular Signal-Regulated Kinase*) / proteína ativada por mitógeno quinase (MAPK), fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K)/AKT e p38. Ainda, a sinalização à jusante do receptor, converge para regular a transcrição de diversos genes relacionados à proliferação e migração celular, regulando o contato

célula-célula, expressão de moléculas de adesão e rearranjo do citoesqueleto (Figura 11) (67,68).

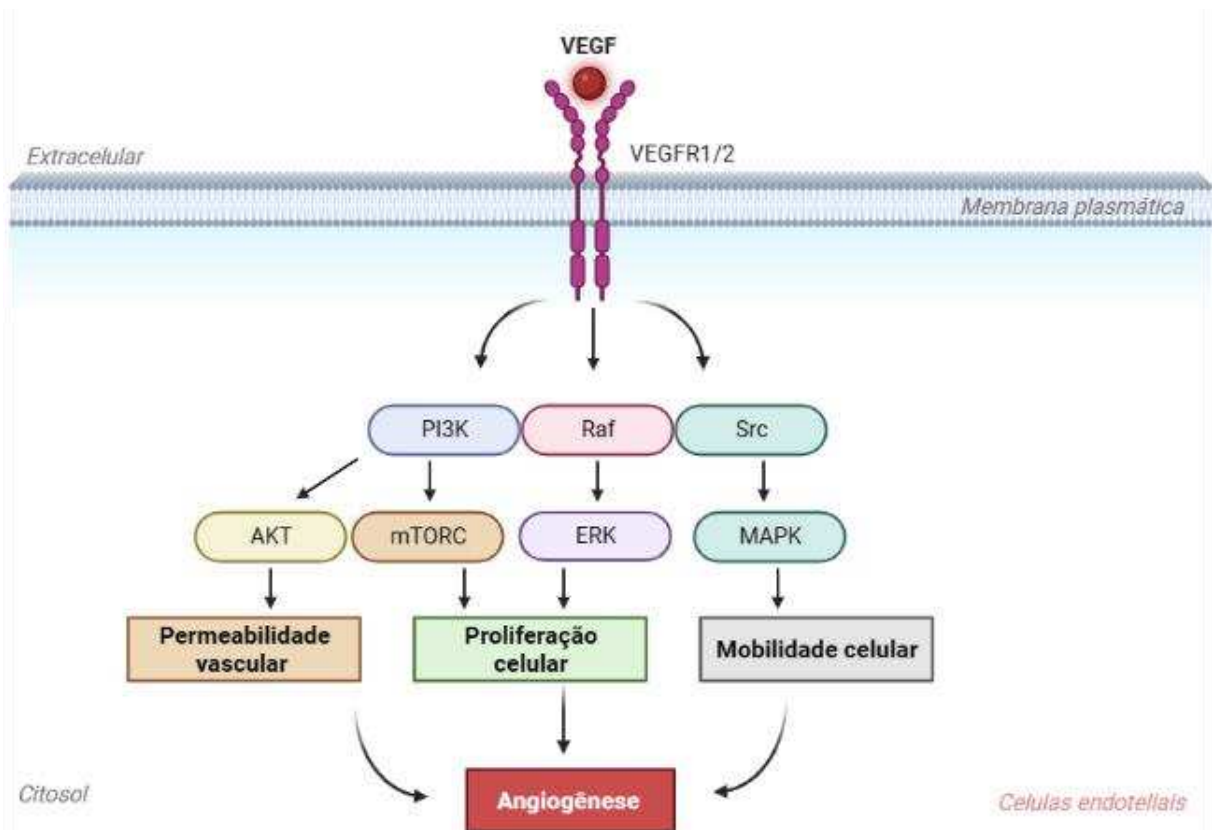


Figura 11. Sinalização mediada pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (61,66,67). Após a ligação do VEGF ao seu receptor localizado na membrana plasmática de células endoteliais, alterações conformacionais levam à autofosforilação do receptor, culminando na fosforilação de proteínas e ativação de vias que levam ao aumento da permeabilidade vascular, proliferação celular e aumento da mobilidade, aumentando a angiogênese. Imagem criada com biorender.

1.3 Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK)

A proteína AMPK é conhecida como um sensor energético celular que é ativado em condições de baixa disponibilidade de energia, sendo a via clássica de ativação da AMPK responsável pela restauração da homeostase energética através da ativação de vias catabólicas e bloqueio de vias anabólicas ou processos que consomem ATP. A AMPK é uma proteína heterotrimérica que possui uma subunidade catalítica (α) e duas subunidades regulatórias (β e γ). Os genes responsáveis pela codificação da proteína estão presentes em praticamente todas as células eucariotas e nos mamíferos múltiplas isoformas são expressas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ e $\gamma 3$). A ativação da AMPK ocorre através de dois principais mecanismos, quando há aumento nos

níveis de AMP:ATP ou ADP/ATP, o AMP ou ADP é capaz de se ligar à subunidade γ regulatória da AMPK, promovendo alterações conformacionais que expõem a subunidade α , possibilitando a fosforilação no resíduo Thr172, além de proteger contra a ação de fosfatases que atuam inativando a AMPK. Ainda, destaca-se que a fosforilação no resíduo Thr172 é essencial para a máxima atividade da AMPK. Esse sítio de fosforilação é alvo das proteínas quinases *Liver kinase B1* (LKB1) e Ca^{2+} /quinase dependente de calmodulina (CaMKK β) (69–73).

A AMPK foi originalmente definida como uma proteína quinase à montante da enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), cuja função está relacionada à síntese de ácidos graxos. Logo, ao ser fosforilada no resíduo serina 79 pela proteína AMPK, a ACC é inibida, reduzindo processos celulares anabólicos. Além disso, em condições de depleção de nutrientes a AMPK atua como um sensor metabólico, inibindo o crescimento celular. O mecanismo clássico pelo qual a proteína exerce tal efeito é através de inibição da proteína alvo mamífero do complexo 1 de rapamicina (mTORC1), sendo que a AMPK é capaz de controlar a mTORC1 através de dois mecanismos principais: 1) coordenando a fosforilação de TSC2 no resíduo serina 1387 (proteína à montante de mTORC1); e 2) através da fosforilação direta da subunidade RAPTOR de mTORC1. Além de coordenar o crescimento celular, a ativação de AMPK também é capaz de ativar mecanismos autofágicos, através da fosforilação de ULK1. Por fim, estudos recentes também têm evidenciado o papel da AMPK na coordenação da polaridade, migração e organização do citoesqueleto (Figura 12) (69,70,73).

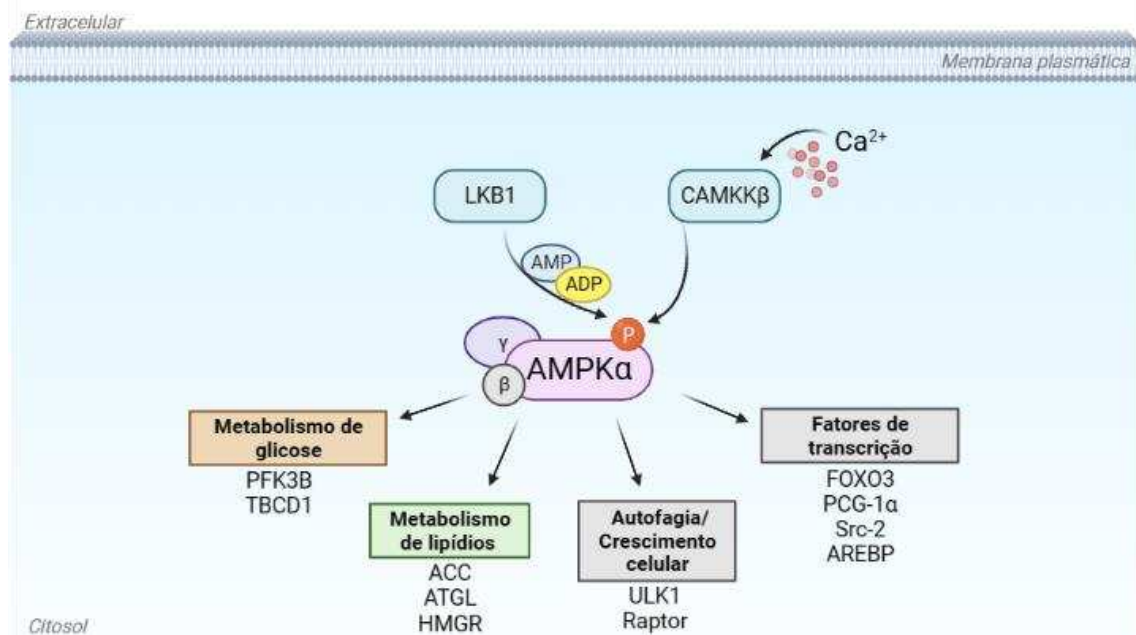


Figura 12. Ativação e sinalização da proteína AMPK (70,71,74). A AMPK é ativada quando há um aumento nos níveis de AMP e ADP intracelular, por estresse fisiológico ou através da utilização de indutores farmacológicos. LKB1 é uma quinase à montante de AMPK, coordenando a fosforilação e ativação da proteína em resposta ao aumento de AMP ou ADP. Já a CAMKKβ, outra proteína à montante de AMPK, ativa AMPK em resposta ao aumento de cálcio. A AMPK ativada fosforila diretamente vários substratos alterando o metabolismo e o crescimento, bem como a reprogramação metabólica de longo prazo. Imagem criada com biorender.

1.3.1 AMPK e angiogênese

A angiogênese possui funções essenciais em diversos processos, tanto fisiológicos quanto patológicos, sendo ativada sob hipóxia, nos processos de contração muscular e na cicatrização de feridas. De maneira geral, quando há um aumento na demanda de oxigênio, processos angiogênicos são ativados para compensar a deficiência de O_2 . Durante esse processo, há a ruptura da barreira dos vasos sanguíneos existentes, aumento da proliferação e migração de células endoteliais. Esses processos iniciais são coordenados pelo aumento na expressão de citocinas e fatores de crescimento, como o VEGF. Em situações patológicas, como o caso das retinopatias isquêmicas e no câncer, a superprodução de VEGF altera a permeabilidade da vasculatura, reduzindo a estabilidade dos novos vasos e aumentando processos hemorrágicos (69,75,76).

Em relação a AMPK, sua ativação é um alvo terapêutico bem estabelecido no tratamento de doenças metabólicas, uma vez que ativadores farmacológicos da proteína são amplamente utilizados na prática clínica para o tratamento da obesidade

e DM2 (77–79). Já no processo de angiogênese, não há um consenso sobre o papel da proteína. Sendo que a AMPK parece exercer um duplo papel, coordenando tanto efeitos positivos quanto negativos. Sobre os efeitos positivos da AMPK na angiogênese, estudos mostram que a ativação de AMPK é capaz de estimular a diferenciação de células progenitoras endoteliais, induzindo sua proliferação e migração, auxiliando na vasculogênese, além de atuar como quinase a montante de óxido nítrico endotelial (eNOS) induzindo a produção de NO, resultando no aumento da vasodilatação e angiogênese (80,81). Ainda, a ativação da AMPK em modelo de desnaturação dérmica é capaz de aumentar a autofagia e angiogênese em HUVECs (82). Deste modo, estudo *in vivo* demonstrou que a ativação da via LKB1/AMPK atua na regulação da angiogênese em membros posteriores (83). Por fim, diversos estudos na literatura demonstram o papel benéfico da AMPK na angiogênese em condições de isquemia, auxiliando na recuperação e regeneração tecidual (80–88) .

Em contrapartida, diversos estudos também demonstram o efeito negativo da AMPK na angiogênese. Alguns estudos mostram que o tratamento com metformina ou sinvastatina é capaz de levar a ativação da AMPK e essa ativação bloqueia a atividade de HIF-1 α , inibindo a angiogênese em modelos de câncer de mama (89,90). Especificamente em relação às doenças retinianas, estudo demonstrou que o tratamento com metformina (ativador farmacológico de AMPK) foi capaz de prevenir a degeneração de fotorreceptores e do RPE, através da redução do estresse oxidativo, redução do dano ao DNA e aumento da produção de energia (91). Em modelos *in vitro* e *in vivo* de diabetes, a ativação da AMPK foi associada com o aumento da autofagia, redução de apoptose e aumento da biogênese mitocondrial (92,93). Entretanto, o papel da AMPK em modelo de retinopatia isquêmica ainda não é bem estabelecido.

1.4 Ácidos graxos ômega-3 (ω 3)

Os ácidos graxos poli-insaturados ω 3 (ω 3-PUFAs) foram inicialmente descritos e amplamente estudados por suas propriedades antitrombóticas e anti-inflamatórias (94). Os ω 3-PUFAs, são ácidos graxos essenciais, ou seja, devem ser ingeridos a partir da dieta e não são sintetizados no organismo. Os principais representantes dessa classe de ácidos graxos são ácido alfa linolênico (ALA, C18:3), o ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5) e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6) (95). Ao

longo dos anos diversos estudos demonstraram que os ω 3-PUFAs eram capazes de interferir em diversos pontos da cascata de sinalização inflamatória, culminando na redução da expressão de citocinas inflamatórias como, por exemplo, o TNF- α (96–100). Após cerca de três décadas de investigação, foi possível identificar um receptor capaz de reconhecer o ω 3, o receptor acoplado à proteína G 120 (GPR120), e foi atribuído a este receptor os efeitos bloqueadores da cascata de sinalização inflamatória (101,102).

O GPR120 ou FFAR4 (do inglês - *free fatty acid receptor 4*) pertence à família dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e é amplamente expresso em diversos tecidos. Estudos mostram que a ação do receptor é capaz de impactar na homeostase do organismo, alterando diversos mecanismos como a sensibilidade à insulina, a secreção hormonal em células endócrinas, a função de macrófagos, captação de glicose, entre outros (96,97,102–106). De maneira geral, há dois tipos de sinalização à jusante do GPR120 que são responsáveis pelas funções citadas acima, a via de sinalização mediada por $G\alpha_q$ e a via dependente de β -arrestina2 (95,104,107).

Em relação à via de sinalização mediada por $G\alpha_q$, após a interação com o ligante, alterações conformacionais no receptor o tornam ativo. Com isso ocorre a dissociação da subunidade $G\alpha_q$ que ativa a fosfolipase C (PLC), que atua hidrolisando o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 se associa a receptores presentes no retículo endoplasmático aumentando a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, levando ao aumento das concentrações de cálcio no citosol. Em paralelo a ativação do GPR120 é capaz de recrutar a proteína β -arrestina2, o complexo GPR120- β -arrestina2 é então internalizado e atrai para si proteínas TAB1/2, que são necessárias para sinalização de vias pró-inflamatórias disparadas pelos receptores TNFR e TLR-4. Com isso, há a desarticulação dessas vias e redução do tônus inflamatório (Figura 13) (107,108).

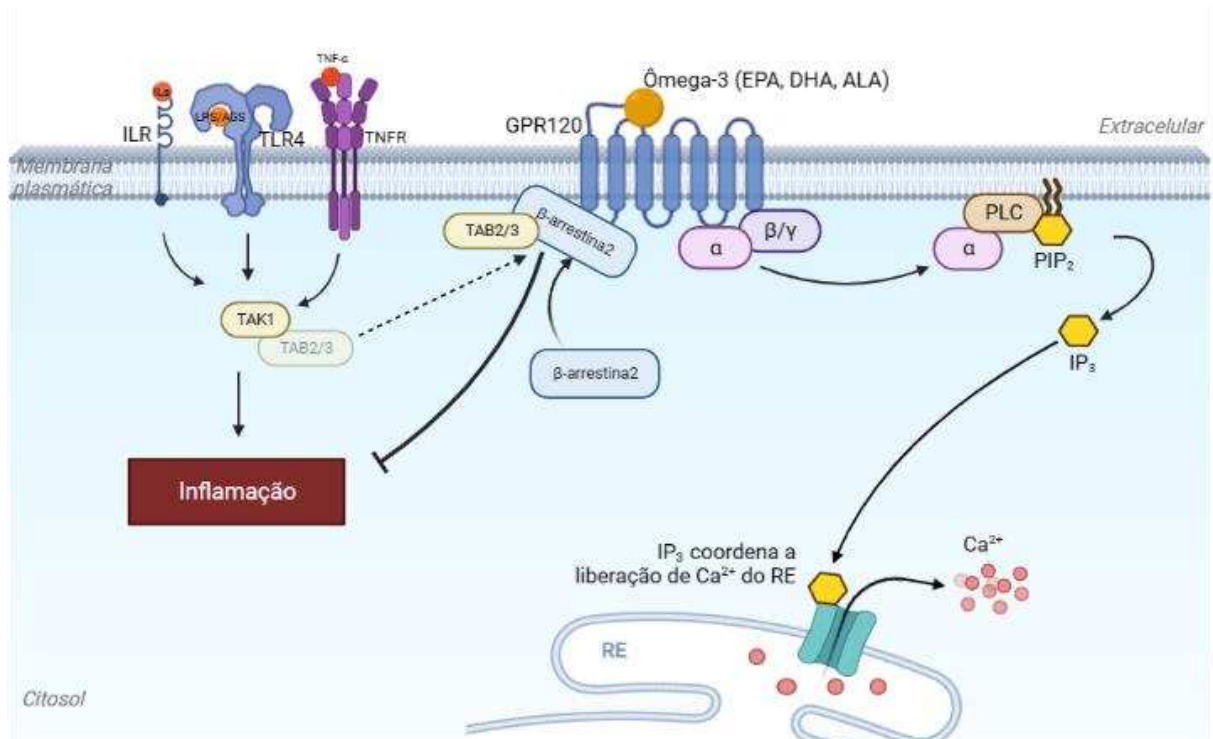


Figura 13. Ativação e sinalização anti-inflamatória de GPR120 (107,108). A ligação dos ácidos graxos da família do ômega-3 ao GPR120 induz o aumento na concentração de cálcio intracelular. Em paralelo, a internalização do receptor recruta à proteína TAB2/3 (comum às vias de sinalização inflamatórias) desarticulando a cascata de sinalização, reduzindo a inflamação. A Imagem criada com biorender.

Além da desarticulação da cascata inflamatória, a ativação do GPR120 apresenta outros efeitos no metabolismo celular. Evidência recente mostrou que o aumento de cálcio promovido pela ativação do receptor é capaz de ativar proteínas como a CamKK β , culminando na fosforilação e ativação da proteína AMPK em células do músculo esquelético, levando ao aumento da captação de glicose por essas células (109). Entretanto, a relação entre os ω 3-PUFAs, GPR120 e AMPK na retina permanece desconhecido.

Em relação à função dos ácidos graxos ω 3 na retina, o ω 3 é um dos principais constituintes do tecido e estudos clínicos recentes mostraram os efeitos protetores da suplementação no desenvolvimento de ROP, onde a suplementação com ácido araquidônico e DHA no período pós-natal foi capaz de reduzir a incidência de ROP severa em 50% (110,111). Além disso, em portadores de DM2, a ingestão de 500mg/dia de ω 3-PUFAs reduziu em 46% o risco de perda de visão por RD (112). Nesta perspectiva, estudos na literatura visam descrever os mecanismos relacionados a esse potencial benefício dos ω 3-PUFAs no desenvolvimento e progressão das doenças retinianas(113–118). Recentemente, foi descrito a expressão de GPR120 no

tecido retiniano de camundongos e estudos *in vivo*, também evidenciaram que a ingestão ou suplementação com $\omega 3$ é capaz de reduzir a inflamação e angiogênese de retinopatia (115,119,120). Entretanto, os mecanismos pelos quais os ácidos graxos $\omega 3$ exercem tais efeitos ainda não estão completamente compreendidos.

Sendo assim, nosso grupo de pesquisa acredita que a investigação dos mecanismos relacionados com o desenvolvimento da retinopatia isquêmica, bem como do papel do receptor GPR120/ ω -PUFAs e da proteína AMPK como potenciais alvos são essenciais para fortalecer os instrumentos terapêuticos contra o avanço da doença.

2. OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos benéficos do ômega-3 em modelo de retinopatia isquêmica e se tais efeitos podem ser dependentes da ativação da proteína AMPK.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de células e tratamentos

Células endoteliais primárias da microvasculares da retina humana ou hRMEC (células ACBRI 181) foram adquiridas da *Cell Systems Corporation*® (Kirkland, WA, EUA) e cultivadas em meio de crescimento de células endoteliais (do inglês *Endothelial Cell Growth Medium-2* - EGM-2, Lonza®, Suíça) contendo 10% de soro fetal bovino (do inglês *fetal bovine serum* – FBS), 100 U/mL de penicilina e 100mg/mL de estreptomicina a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Foram utilizadas no presente estudo células na passagem 4-6. Ao atingirem 70% de confluência as células foram divididas nos seguintes grupos experimentais: Controle (CT), mantidas em meio EGM-2; DMOG, células expostas a 400µM de DMOG (Dimetiloxalilglicina; *Tocris Bioscience*, Bristol, Reino Unido); DMOG+DHA, células expostas a 400 µM de DMOG e suplementadas com 50µM de ácido docosaenoico (DHA, do inglês – *Docosahexaenoic acid*; *Cayman Chemical*, MI, EUA); siAMPKα+DMOG+DHA, células foram silenciadas para AMPKα e, posteriormente, expostas ao DMOG (400µM) e suplementadas com DHA (50µM). O DMOG é um composto pró-angiogênico que atua inibindo a atividade da enzima prolil-4-hidroxilase (PHD), que em condições normais atua hidroxilando HIF-1α e marcando a proteína para degradação proteossomal. Sendo assim, evidências mostram que o tratamento com DMOG, culmina na ativação de HIF-1α, mimetizando quimicamente um ambiente isquêmico (28). Após os tratamentos, as células foram coletadas para análises posteriores.

3.1.1 Ensaio de viabilidade celular

Para avaliação da viabilidade celular, citotoxicidade dos compostos utilizados e escolha das doses de tratamento foi realizado o ensaio de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 brometo de difenil tetrazólio) (121,122). Para a realização do ensaio, 1x10³ hRMEC foram semeadas em placas de 96 poços e, posteriormente, expostas a diferentes concentrações de DMOG (100µM, 200µM, 400µM, 600µM, 800µM, 1mM e 1,2mM) ou DMOG+DHA com diferentes concentrações de DHA (10µM, 50µM, 100µM, 150µM e 200µM) por 24 horas a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Ao final do período, foi adicionado 20µL de solução de MTT (5mg/mL; M2128-1, Sigma, MI, EUA) por 4 horas a 37 °C em incubadoras de CO₂. Durante esse período de incubação o MTT é convertido em cristais de formazan pelas mitocôndrias, que em células viáveis apresentam atividade

constante, porém, com a diminuição do número de células viáveis, há redução na atividade mitocondrial e, conseqüentemente, diminuição na conversão do MTT em cristais de formazan. Dessa forma, qualquer aumento ou redução no número de células viáveis pode ser detectada após a dissolução dos cristais de formazan e leitura da absorbância. Ao final das 4 horas de incubação com MTT, para a dissolução dos cristais, foi removido o meio de cultura contendo e adicionando 150µL de solvente, DMSO (Dimetilsulfóxido), por 5 minutos. Posteriormente, a densidade óptica em 540nm foi medida com o auxílio de um espectrofotômetro Power Wave XS2 (BioTeK, VT, EUA). Em todos esses ensaios, 5 a 7 poços replicados foram utilizados na determinação de cada ponto. A dose selecionada foi a que apresentou toxicidade menor que 25%.

3.1.2 Silenciamento da proteína AMPK α

hRMEC na passagem 5 ou 6 foram cultivadas, como descrito anteriormente, em placas de 60mm e ao atingirem 80% de confluência foram transfectadas por 6 horas com 40nm de siRNA para AMPK $\alpha_{1/2}$ (sc-45312, Santa Cruz Biotechnology, Tx, EUA) ou controle negativo do siRNA (sc-37007, Santa Cruz Biotechnology, Tx, EUA) utilizando 5µL/mL de reagente de transfecção lipofectamina (Lipofectamine™ 3000, Invitrogen, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após 6 horas de transfecção, o meio de cultura foi removido e adicionado meio completo contendo os respectivos tratamentos.

3.2 Ensaio de migração celular

Para avaliar a migração celular, foi realizado o ensaio de *scratch wound healing* (123,124). As células foram cultivadas em placas de 60mm até formarem uma monocamada confluenta. Quando esse estágio foi atingido, foi realizada uma ranhura em linha reta na placa, criando uma fenda sem células. Essa ranhura foi realizada com o auxílio de ponteira de micropipeta de 1000µL estéril sob ângulo de 90 graus, para que fosse mantida a largura uniforme da fenda. Após isso, o meio foi removido e as placas foram lavadas com solução balanceada de Hanks (Cultilab, Campinas, Brasil) para a que as células sobrenadantes fossem removidas. Após isso, as células foram submetidas aos respectivos tratamentos por 24h. Para a quantificação da área de migração, a área livre foi fotografada digitalmente utilizando um microscópio invertido (Axio Observer A.1, Carl Zeiss Microscopy, NY, EUA) e o software AxioVision (Carl Zeiss Microscopy, NY, EUA) antes do início dos tratamentos (tempo 0), bem como após 24h de tratamento. Ao menos cinco imagens de cada placa foram obtidas em cada ponto, utilizando um

aumento de 100x. A migração celular foi calculada subtraindo a área livre inicial da área livre final, sendo essa área calculada com o auxílio do software ImageJ (Software 1.48q, *Rayne Rasband National Institutes of Health*, EUA). Os resultados estão expressos em pixels² (px²). Os experimentos foram repetidos três vezes.

3.3 Ensaio de tubulogênese

O ensaio de tubulogênese foi utilizado para avaliar o efeito dos tratamentos na angiogênese *in vitro* (124). Em resumo, foi adicionado a placas de 96 poços previamente resfriadas 50µL de ECM Gel, com fator de crescimento reduzido (E6909, Sigma Aldrich®, MO, EUA) e gelificadas a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente as células foram semeadas a uma densidade de 2x10⁵ células/mL e mantidas por 6h a 37 °C numa atmosfera umidificada contendo 5% CO₂ em meio contendo os respectivos tratamentos. No grupo siAMPK α +DMOG+DHA, o silenciamento ocorreu previamente ao início do ensaio de tubulogênese. Ao final do período, os túbulos vasculares foram observados em microscópio invertido e quatro campos diferentes por poço foram selecionados aleatoriamente e fotografados usando o software AxioVision (Carl Zeiss Microscopy, NY, EUA). A quantificação da rede tubular foi realizada com o auxílio do analisador de angiogênese do software ImageJ (Software 1.48q, *Rayne Rasband National Institutes of Health*, EUA).

3.4 Avaliação resistência elétrica transendotelial

A avaliação da resistência elétrica transendotelial (TEER, do inglês *transendothelial electrical resistance*) é um método amplamente utilizado para avaliação da integridade da barreira celular (125,126). Para esse ensaio, hRMEC foram semeadas em uma densidade de 8x10⁴ no compartimento superior em placas de 24 *inserts* de membrana de poliéster (área do *insert* 0,33 cm², tamanho do poro 0,4 µm; 3470, Corning® Brand Products, NY, EUA), no compartimento inferior foi adicionado 800µL de meio de cultura. As células foram cultivadas por sete dias a 37 °C numa atmosfera umidificada contendo 5% CO₂. Posteriormente, deu-se início aos tratamentos, conforme descrito anteriormente. A TEER foi medida com o auxílio de um voltímetro (Millicell-ERS; Millipore, MA, EUA). A TEER foi medida no tempo 0 (início do tratamento), após 24h e 48h. Os valores apresentados são a média de três medições consecutivas. Cada grupo é composto por três amostras. Os valores são apresentados em ohms/cm². Para que os valores reais da resistência elétrica das hRMEC fossem demonstrados, subtraiu-se os

valores de TEER dos *inserts* que continham células dos *inserts* brancos (*inserts* com meio sem células).

3.5 Avaliação da concentração de Cálcio intracelular

A avaliação da concentração de cálcio foi realizada através da marcação de Fluo-3 AM (73881; Sigma Aldrich, MO, EUA), como descrito anteriormente (109). De maneira simplificada, hRMEC na densidade de 1×10^5 foram semeadas em placas de 24 poços. 24h horas antes do início do experimento os grupos DMOG e DMOG+DHA foram expostos a $400 \mu\text{M}$ de DMOG. Após 24h de exposição ao DMOG, as células foram expostas a $5 \mu\text{M}$ de Fluo-3 AM por 30 minutos a 37°C , sob abrigo de luz. Após o período de incubação as células foram lavadas suavemente com solução balanceada de Hank's, para a remoção do excesso de reagente. Após a lavagem as células foram submetidas imediatamente à experimentação através da microscopia de fluorescência, sendo a variação na concentração de cálcio avaliada através em filtros de 488 nm de excitação, ampliadas 400x. As imagens foram capturadas do tempo zero (T0) até o tempo de 45 (T45) segundos com software AxioVision. A intensidade de fluorescência emitida pelas hRMEC foi analisada pelo do software ImageJ (Software 1.48q, *Rayne Rasband National Institutes of Health*, EUA). Para a observação da concentração de cálcio intracelular em hMREC sob condição mimética de hipóxia e tratadas com DHA (DMOG+DHA), o DHA ($50 \mu\text{M}$) foi adicionado ao meio após a captura da primeira imagem.

3.6 Imunofluorescência

Células foram fixadas com metanol gelado por 15 minutos. Após isso, as células foram permeabilizadas com Triton 0,05% em solução de PBS 1x. Posteriormente, foram incubadas em solução bloqueadora (1 x PBS contendo 5% BSA, 0,3M glicina, 0,1% Tween) por 1 hora em temperatura ambiente. Após isso, as placas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários de interesse: anti-HIF-1 α (NB100-105; Novus Biologicals, CO, EUA), anti-HIF-2 α (NB100-22; Novus Biologicals, CO, EUA), anti-VEGF α (ab1316; Abcam, Reino Unido), anti-Vimentina (ab92547; Abcam, Reino Unido), anti-ZO-1 (33-9100; Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos secundários conjugados ao Alexa Fluor® 488 (Abcam, Reino Unido). Por fim, as placas foram montadas com *Vectashield Mounting Medium* com DAPI (#H-1200; Vector Laboratories, CA, EUA), responsável pela coloração em azul dos núcleos celulares. As imagens foram avaliadas em microscópio de fluorescência e

capturadas com o software AxioVision. Cinco polos diferentes por placa foram selecionados aleatoriamente e fotografados com um aumento de 400x. Ao menos três experimentos independentes foram realizados. A intensidade de fluorescência emitida pelas hRMEC foi analisada pelo software ImageJ (Software 1.48q, *Rayne Rasband National Institutes of Health*, EUA).

3.7 Immunoblotting

As células e tecidos foram homogeneizadas com tampão RIPA contendo 100 mM de Tris (pH 7,4), 100 mM de pirofosfato de sódio, 10 mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de ortovanadato de sódio, 2 mM de fluoreto de fenilmetanossulfonil e suplementado com um coquetel inibidor de proteases e fosfatases (Complete, Boehringer-Mannheim®, IN, EUA) a 4 °C, com o auxílio de um sonicador *vibra-cell* VCX 130 (Sonics®, CT, EUA). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14.000 RPM (Eppendorf®, 5424 R) e o sobrenadante coletado. Após isso, a análise da concentração de proteínas foi realizada através do método de Bradford (127) e as amostras foram concentradas entre 40 e 60µg para a realização da técnica. Em seguida, tampão Laemmli (128) foi adicionado às amostras e foram incubados por 5 minutos a 95 °C.

Após a preparação das amostras, os lisados foram aplicados em gel de poliacrilamida (6 a 15%) para a separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas contidas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, sendo a eficiência da transferência avaliada através de corante sintético vermelho específico para tal finalidade (*Ponceau*). Após isso, as membranas foram incubadas com solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado ou BSA; 10 mmol/L de Tris; 150 mmol/L de NaCl e 02% de Tween 20) para a diminuição de ligações inespecíficas por 1 hora em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpo primário específico *overnight*, a 4 °C sob agitação constante, e posteriormente, com incubadas por uma hora a temperatura ambiente com seus respectivos anticorpos secundários. Por fim, as bandas imunorreativas foram detectadas através do método de quimioluminescência aprimorada (Super Signal CL-HRP Substrate System, Pierce®, IL, EUA) e documentadas com o auxílio de um *fotodocumentador* (ImageQuant LAS 500; GE Healthcare, IL, EUA). O carregamento de proteínas e a eficácia da transferência foi avaliada através da hibridização das membranas com anticorpos anti-Vinculina e anti-

GAPDH (Cell Signaling Technology®, BOS, EUA). A quantificação das bandas ocorreu com o auxílio do *software* ImageJ (Software 1.48q, *Rayne Rasband National Institutes of Health*, EUA). Para a análise de cada proteína foram realizados três experimentos independentes. As imagens obtidas apresentadas neste trabalho são originais, não foram cortadas, giradas, invertidas ou emendadas. Os anticorpos utilizados nos experimentos estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Anticorpos utilizados

Anticorpo	Diluição	Técnica	Fabricante	Código
Anti-rabbit phospho-AMPK α Thr172	1:1000	IB	Cell Signaling Technology	Cat. #2535
Anti-rabbit AMPK α	1:1000	IB	Cell Signaling Technology	Cat. #5831
Anti-rabbit ACC	1:1000	IB	Cell Signaling Technology	Cat. #3676
Anti-rabbit phospho-ACC Ser79	1:1000	IB	Cell Signaling Technology	Cat. #11818
Anti-rabbit vinculin	1:1000	IB	Cell Signaling Technology	Cat. #13901
Anti-rabbit GAPDH	1:1000	IB	Cell Signaling Technology	Cat. #5174
Anti-mouse GPR120	1:100	IB	Santa Cruz Biotechnology	sc-390752
Anti-Goat Camkk β	1:400	IB	Santa Cruz Biotechnology	sc-9629
Anti-Mouse ZO-1	1:25	IF	Invitrogen	Cat. #33-9100
Anti-Rabbit Vimentin	1:200	IF	Abcam	ab92547
Anti-Mouse VEGFA	1:25/1:200	IF/IH	Abcam	ab1316
Anti-Mouse HIF-1 α	1:25/1:200	IF/IH	Novus Biologicals	NB-100-105
Anti-Rabbit HIF-2 α	1:50	IF	Novus Biologicals	NB100-22

Isolectin GS-IB4	1:100	IF	Thermo Fisher Scientific	I21413
Anti-goat HRP-linked	1:2000	IB	Santa Cruz Biotechnology	sc-2354
Anti-rabbit HRP-linked	1:2000	IB	Cell Signaling Technology	Cat. # 7074S
Biotinylated anti-mouse H+L	1:200	IH	Vector Laboratories	Cat. # BA-200
Anti-mouse HRP-linked	1:2000	IB	Thermo Fisher Scientific	Cat. # 31430

Anticorpos utilizados durante o desenvolvimento do projeto. IB: *Immunoblotting*; IF: Imunofluorescência; IH: Imuno-histoquímica.

3.8 Modelo animal e desenho experimental

Foram utilizados animais neonatais deficientes para a proteína AMPK α_2 (B6.129-Prkaa2tm1.1Vio/Orl) (129–131) adquiridos do EMMA (*European Mouse Mutant Archive*, Alemanha) e mantidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os controles genéticos (C57BL/6J) também foram obtidos do CEMIB-UNICAMP. Após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA – UNICAMP), sob o número de protocolo 5710-1/2021, deu-se início aos protocolos experimentais. Ainda, todo o estudo também estava de acordo com as normas estabelecidas pela ARVO (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*) para o Uso de Animais em Pesquisa Oftálmica e da Visão. Cada fêmea com sua prole foi alocada em gaiolas individuais e colocadas em estantes ventiladas, acondicionados em ambiente com temperatura (22 °C $\pm$ 2) e alternância de 12/12 horas do ciclo claro/escuro, com livre acesso à água e dieta padrão comercial (Nuvilab®). Os animais divididos nos seguintes grupos experimentais: Grupo controle (CT), onde fêmeas selvagens (WT) e deficientes para proteína AMPK α_2 (AMPK $\alpha_2^{-/-}$) e suas respectivas proles não foram submetidas a nenhum tipo de tratamento; Grupo OIR, fêmeas CT e AMPK $\alpha_2^{-/-}$ não foram suplementadas, porém os suas proles foram submetidas ao modelo de retinopatia induzida por oxigênio; Grupo OIR+ ω 3, fêmeas CT e AMPK $\alpha_2^{-/-}$ foram suplementadas diariamente com óleo rico em ácidos graxos ω 3 e prole submetida ao modelo de retinopatia induzida por oxigênio.

O modelo de retinopatia induzida por oxigênio (OIR – do inglês *Oxygen Induced Retinopathy*) foi realizado de acordo com proposto por Smith e colaboradores (132). De maneira simplificada, os animais neonatais foram mantidos em condição de hiperóxia (75% de O₂) por cinco dias consecutivos, do dia 7 (P7) ao dia 12 (P12) pós nascimento. Os altos níveis de oxigênio, diminuem a expressão de VEGF, reduzindo o processo de neovascularização retiniana dos neonatos além de reduzir o número de capilares na área central da retina dos animais. Após retornarem ao ar ambiente (21% de O₂) no P12, os vasos remanescentes não são capazes de prover de maneira suficiente oxigênio que são demandados dos fotorreceptores. Sendo assim, o tecido retiniano se encontra em isquemia, sendo capaz de ativar de maneira anormal vias que culminam no aumento da expressão de VEGF e levam à neovascularização, atingindo o nível máximo de neovascularização no dia 17 pós nascimento, quando então os animais foram eutanasiados. Em relação aos animais controle (CT), eles foram mantidos em ar ambiente do durante todo o período experimental.

Ao final do período experimental, os animais foram eutanasiados por asfixia em câmara de dióxido de carbono (CO₂). Os procedimentos anestésicos foram utilizados integralmente e todos os cuidados foram tomados para garantir que os animais não sofressem indevidamente durante e após o procedimento experimental. Posteriormente, os dois globos oculares foram removidos por completo, sendo utilizados para análises histológicas e morfológicas. Já, para a realização da técnica de *immunoblotting*, a retina foi removida com o auxílio de uma lupa (Leica Wild®, Alemanha), bisturi oftálmico. Em seguida, foi feita uma incisão, onde a íris e as estruturas internas oculares como o vítreo e cristalino foram retiradas. Por fim, a retina foi removida com o auxílio de uma pinça. e armazenada a -80 °C até o início das análises.

3.8.1 Suplementação com ácidos graxos- ω 3

As fêmeas foram alimentadas com ração comercial padrão *ad libitum* e receberam suplementação via gavagem com 50 μ L de ácidos graxos- ω 3 (240mg/g de DHA e 360mg/g de EPA, Essentia Pharma, SC, Brasil) diariamente, do dia 1 após nascimento dos filhotes até o dia 17. A dose suplementada corresponde a 2% da fração lipídica ingerida diariamente (120). Em relação ao grupo CT, as fêmeas receberam gavagem diária contendo 50 μ L de solução salina, com forma de mimetizar o estresse gerado pela

manipulação do animal. A ingestão alimentar foi avaliada diariamente. Para cada grupo experimental, ao menos duas fêmeas e dez filhotes foram utilizados.

3.8.2 Imunofluorescência

Para as análises de Imunofluorescência, o globo ocular foi extraído e imediatamente fixado em solução de glutraldeído e formaldeído à 2,5% e 2%, respectivamente, por 1 hora a 4 °C. Após isso, a solução fixadora foi removida e substituída por uma solução crioprotetora, para isso os tecidos foram expostos à solução de sacarose (30%) por 24 horas a 4 °C. Em seguida, os globos oculares foram congelados em meio de montagem específico, Tissue-Tek® O.C.T. *Compound*. Os globos oculares foram então seccionados a 12 µm com o auxílio de um criostato (Leica CM1850®). As lâminas foram lavadas com solução de borohidreto de sódio (1mg/mL) e, posteriormente, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas através da exposição à solução de PBS1x contendo Triton x100 0,3%, BSA 0,2% e soro de cabra 5% por 1 hora a temperatura ambiente. Após isso, as lâminas foram incubadas *overnight* a 4 °C com anticorpo anti-Isolectina GS-IB4 conjugado ao Alexa Fluor 594 (1:100; I21413, Thermo Fisher Scientific, AS, EUA) em solução de PBS1x contendo BSA 0,2% e Triton 0,3%. Por fim, lâminas foram montadas com *Vectashield Mounting Medium* com DAPI (#H-1200; Vector Laboratories, CA, EUA), responsável pela coloração em azul dos núcleos celulares. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss®, Alemanha) sob um aumento de 420x e as imagens digitais capturadas com o auxílio de um software AxioVision® (Carl Zeiss Microscopy, NY, EUA). A quantificação da intensidade de fluorescência de células positivas para IB4 foi realizada com o auxílio do software ImageJ. Ao menos cinco imagens de cada retina foram capturadas de ao menos cinco cortes não consecutivos de cada animal.

3.8.3 Imuno-histoquímica

Para as análises de imuno-histoquímica, os globos oculares foram fixados em solução de Davidson por 24 horas a 4 °C (133,134). Posteriormente, os globos oculares foram incluídos em parafina e seccionados a 4 µm de espessura montados em lâminas de vidro pré-revestidas com silano. Em seguida, os cortes foram desparafinizados e reidratados usando técnicas convencionais, aquecidos em tampão citrato por 10 minutos para recuperação de antígenos e, posteriormente, tratados com peróxido de hidrogênio a 10% em metanol. Após isso, os tecidos foram incubados com solução de bloqueio contendo

soro de cabra 5% diluído em PBS1x. Em seguida, as lâminas foram incubadas *overnight* a 4 °C com anticorpo primário anti-HIF-1 α (1:200; NB100-105; Novus Biologicals, CO, EUA) ou anti-VEGF α (1:200; ab1316; Abcam, Reino Unido), ambos diluídos em solução contendo BSA 1%, soro de cabra 1,5% e Triton x100 0,3%. Para os controles negativos, o anticorpo primário foi omitido. Após isso, os tecidos foram incubados por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpos secundários conjugados à enzima peroxidase (HRP) (1:200; Dako®, Dinamarca). Em seguida, os cortes foram incubados com o Complexo Estreptavidina-Biotina-Peroxidase (ABC Kit, PK4000; Vector laboratories, CA, EUA) por 30 minutos a temperatura ambiente. Por fim, os tecidos foram expostos a solução cromogênica substrato de 3,3'-diamino-benzidina (DAB; Dako®, Glostrup, Dinamarca). As imagens foram analisadas em microscópio óptico (Leica® – DMLB 100S) em um aumento de 420x e as imagens digitais capturadas com o auxílio de um software AxioVision® (Carl Zeiss Microscopy, NY, EUA). A quantificação das densidades proteicas foi realizada com o auxílio do software ImageJ. Ao menos cinco imagens de cada retina foi capturada de ao menos cinco cortes não consecutivos de cada animal.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP). Para a comparação entre dois grupos experimentais foi utilizado o teste T de Student. Para comparação entre 3 ou mais grupos a análise de variância (ANOVA) unidirecional com comparações pós-teste pareadas de acordo com o método de Fisher, foi utilizado. Os testes foram realizados com o auxílio do software GraphPad Prism versão 6. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

Antes do início dos experimentos foi realizado ensaio para a verificação morfológica das células endoteliais por meio da avaliação da expressão de VE-caderina, marcador de células endoteliais maduras, utilizando a técnica de imunofluorescência nas hRMECs. Com isso, foi possível observar a marcação da VE-caderina delimitando as junções intercelulares e apresentando pouca marcação citoplasmática em condições normais de oxigênio (Figura 14a). Após o ensaio de caracterização, foi realizado o ensaio de viabilidade celular para avaliação da toxicidade e seleção da melhor dose de tratamento em hRMECs exposta ao DMOG por 24h. Foram utilizados no tratamento doses entre 100 μ M e 1,2mM e foi possível observar que o tratamento com doses maiores de 400 μ M de DMOG foi tóxico para células primárias da microvasculatura retiniana, apresentando taxas viabilidade celular menores que 75% (Figura 14b). Sendo assim, foi selecionada a dose de 400 μ M para as análises posteriores.

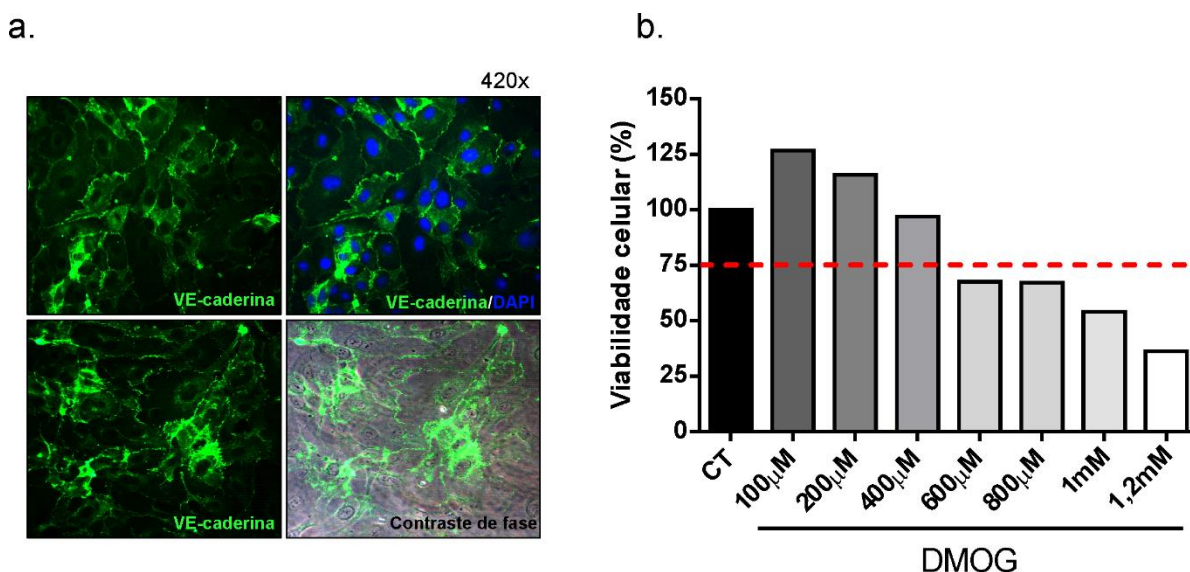


Figura 14. Caracterização de hRMECs e avaliação da viabilidade celular em exposição ao DMOG. a. Localização de VE-caderina (Verde - Alexa fluor 488) em hRMECs. As fotografias foram obtidas com aumento de 420x. b. Ensaio de viabilidade celular em hRMECs na passagem 7, expostas a diferentes concentrações de DMOG (100 μ M e 1,2mM) por 24 horas. Linha tracejada indica toxicidade máxima adotada no estudo.

Após a seleção da dose, foi avaliado se 400 μ M de DMOG seria capaz de modular a expressão de marcadores clássicos de hipóxia, para isso avaliamos a expressão dos fatores de transcrição α induzíveis por hipóxia (HIF- α), nas isoformas 1 e 2, além da expressão de VEGF, proteína de caráter pró-angiogênico que tem sua expressão controlada pela ação dos HIFs. Observamos que 24h de estímulo com DMOG resultou

aumento da expressão e translocação ao núcleo HIF-1 α quando comparado ao grupo controle ($p < 0.05$). Além disso, o DMOG apesar de não aumentar a expressão de HIF-2 α , foi capaz de promover a translocação nuclear da proteína, indicando um aumento de sua atividade. O aumento na translocação nuclear de HIFs (HIF-1 α e HIF-2 α) promovido pela exposição ao DMOG culminou no aumento significativo na expressão de VEGF quando comparado ao grupo CT ($p < 0.0001$), confirmando a ação de DMOG como um agente isquêmico em nosso modelo *in vitro* (Figura 15).

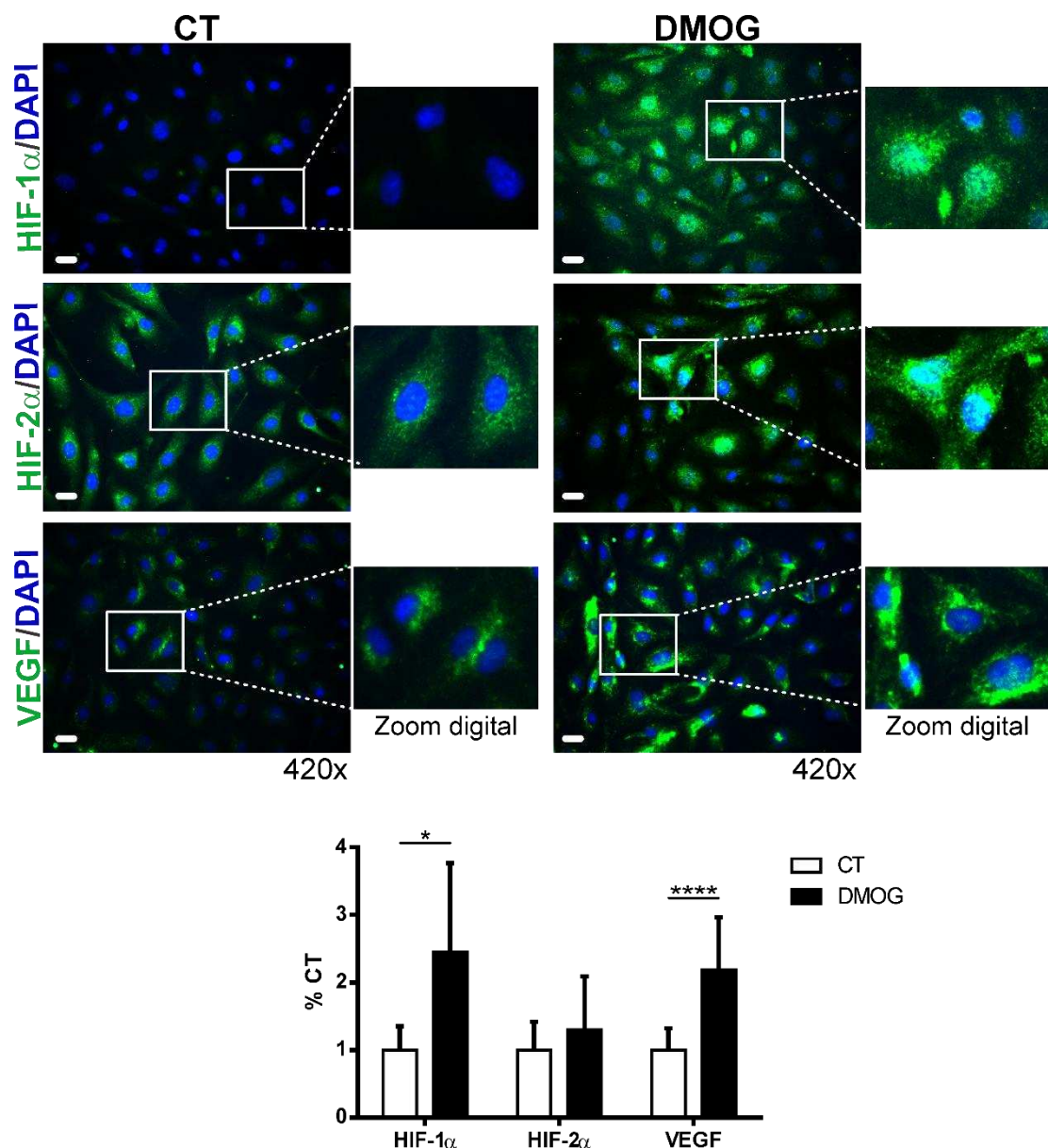


Figura 15. DMOG induz isquemia em hMRECs. Imagens representativas de fotomicrografias e análise semiquantitativa da intensidade de fluorescência de HIF-1 α , HIF-2 α e VEGF (Verde - Alexa fluor 488) em hMRECs expostas por 24 horas a 400 μ M de DMOG. As fotografias foram obtidas com aumento de 420x. Barra de escalas = 20 μ m. As barras representam a média $\pm$ DP de células positivas corrigidas pelo número total de células em cada campo. Os dados estão expressos como a porcentagem de variação em relação ao grupo CT. 5 campos diferentes foram fotografados cada placa. * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$ pelo teste T de Student.

Posteriormente, avaliamos o fenótipo das hRMECs após a exposição ao DMOG por 24 horas e verificamos que as células endoteliais da microvasculatura retiniana em ambiente mimético de hipóxia apresentaram maior capacidade migratória quando comparadas ao grupo CT ($p<0.05$) (Figura 16a). Além disso, o grupo DMOG também apresentou aumento na expressão da proteína vimentina ($p<0.0001$) (Figura 16b), marcador de transição mesenquimal, além de desarranjo na expressão de ZO-1 (*tight junction*) na barreira intercelular em comparação ao grupo CT (Figura 16b). Com isso foi possível constatar que a mimetização de ambiente isquêmico promovido pelo DMOG foi capaz de promover o fenômeno de transição endotélio-mesenquimal (EndMT, do inglês *endothelial to mesenchymal transition*), que se trata de um processo biológico onde células endoteliais apresentem características de células mesenquimais, apresentando alterações morfológicas, aumentando sua capacidade migratória e rompendo a barreira entre as células, indicando alterações estruturais na microvasculatura.

Após isso, iniciamos as investigações a respeito do possível papel da AMPK nesse fenômeno e verificamos que células tratadas com DMOG, apresentaram redução fosforilação de AMPK no sítio Treonina 172 ($p<0.05$) (Figura 17) e a fosforilação de sua proteína a jusante, ACC no sítio Serina 79 ($p<0.001$) (Figura 17) quando comparado ao grupo CT, indicando redução na atividade da AMPK após 24 horas de exposição ao mimético de hipóxia. Sendo assim, é possível inferir que a condição de hipóxia promovida pela exposição ao DMOG induz aumento de fatores isquêmicos e EndMT, associado à uma diminuição na atividade da AMPK.

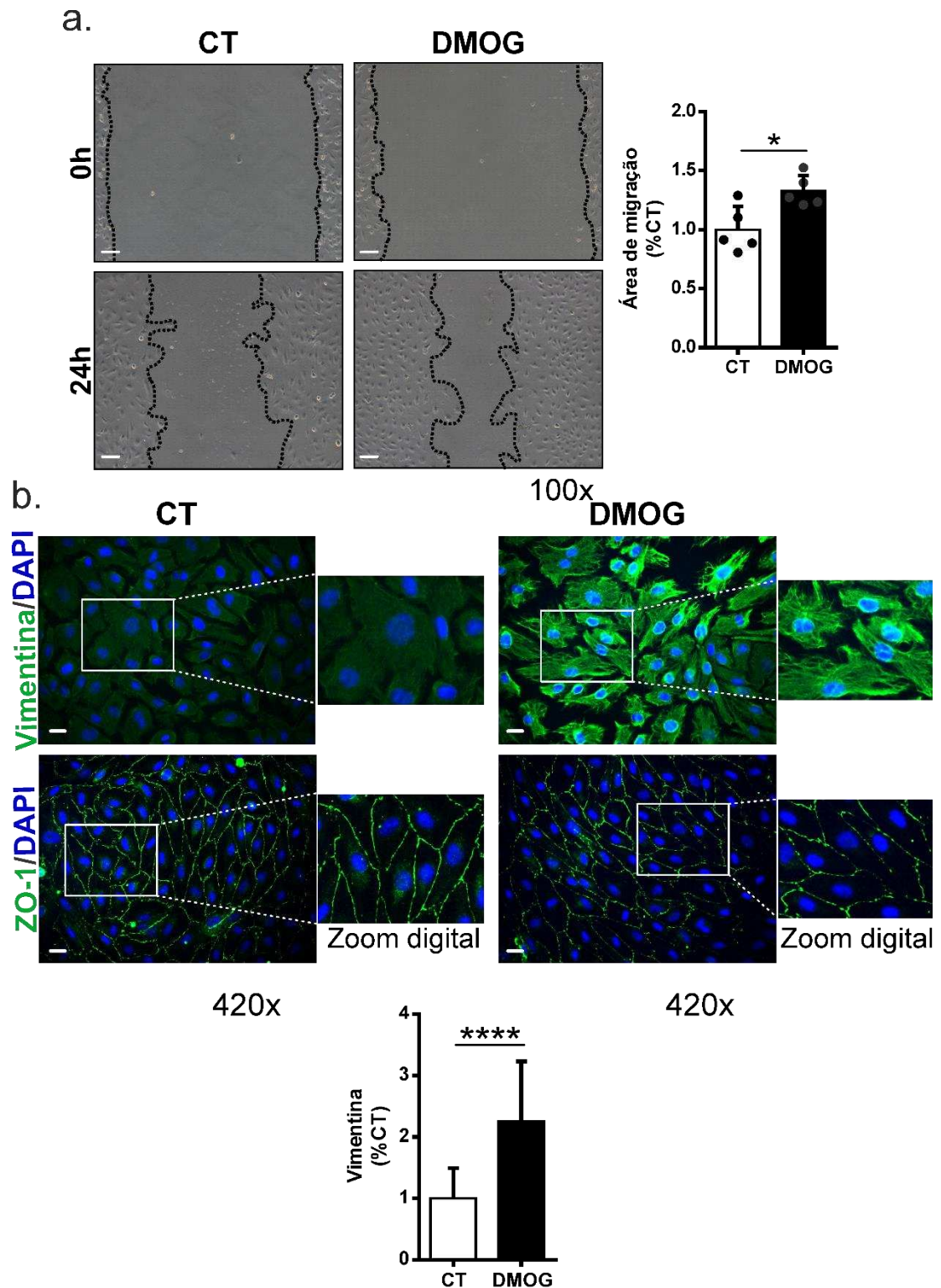


Figura 16. DMOG induz EndMT em hMRECs. **a.** Imagens representativas de fotomicrografias e quantificação da área de migração de células endoteliais expostas por 24 horas a 400 μ M de DMOG. As fotografias foram obtidas com aumento de 100x. Barra de escalas = 100 μ m. As barras representam a média $\pm$ SD da variação da área migratória em relação ao controle em pelo menos três experimentos. 5 campos diferentes foram fotografados em cada placa para o cálculo da área de migração **b.** Imagens representativas de fotomicrografias e análise semiquantitativa da intensidade de fluorescência de Vimentina e ZO-1 (Verde - Alexa fluor 488) em hMRECs expostas por 24 horas a 400 μ M de DMOG. As fotografias foram obtidas com aumento de 420x. Barra de escalas = 20 μ m. As barras representam a média $\pm$ DP de células positivas corrigidas pelo número total de células em cada campo. Os dados estão expressos como a porcentagem de variação em relação ao grupo CT. 5 campos diferentes foram fotografados cada placa. * p < 0.05; **** p < 0.0001 pelo teste T de Student.

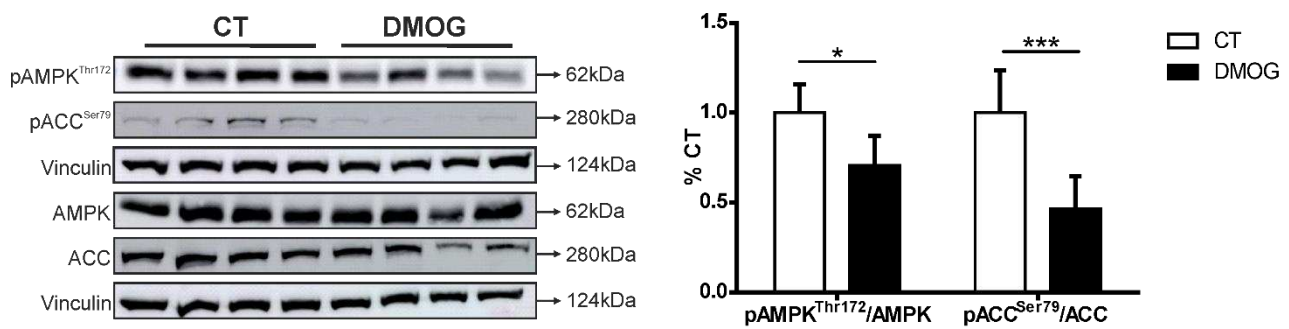


Figura 17. DMOG reduz atividade de AMPK em hRMECs. Expressões de proteínas representativas avaliadas por *Imunoblotting* e análises densitométricas de AMPK^{Thr172}/AMPK e pACC^{Ser79}/ACC, ambos normalizado pelo controle interno Vinculina em hRMECs expostas a DMOG por 24 horas. As barras representam a média $\pm$ DP das densidades das bandas expressas em unidades arbitrárias como a porcentagem de variação em relação ao controle. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; pelo teste T de *Student*.

Para nos aprofundarmos na participação da AMPK nas alterações promovidas pela hipóxia, a restauração da atividade da proteína se faz necessária. Neste sentido, deu-se início ao tratamento das hRMECs com DHA em condição de hipóxia. Como já mencionado anteriormente, tal ácido graxo foi proposto na literatura como um possível ativador de AMPK. Inicialmente, foi realizado o ensaio de toxicidade para a definição da melhor dose para o tratamento. Em sequência, as hRMECs foram submetidas a diferentes concentrações de DHA, sob 400 μ M de DMOG por 24 horas. Foram utilizados no tratamento doses entre 10 μ M e 250 μ M de DHA, com isso foi possível observar que o tratamento com doses maiores de 100 μ M de DHA sob DMOG foi tóxico para células primárias da microvasculatura retiniana, apresentando taxas viabilidade celular menores que 75% (Figura 18). Sendo assim, foi selecionada a dose de 50 μ M para as análises posteriores.

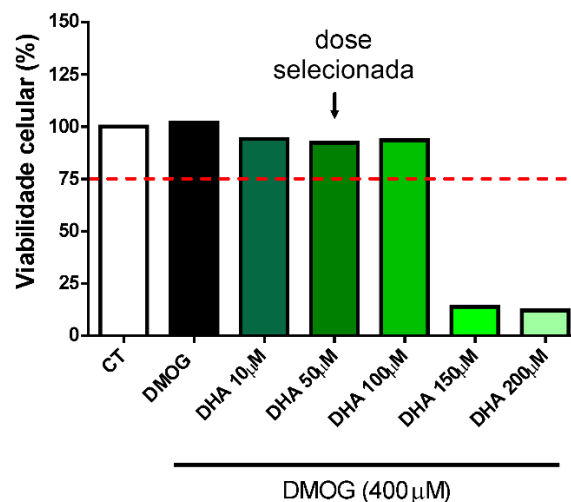


Figura 18. Ensaio de viabilidade celular em exposição ao DHA em condição de hipóxia química. Ensaio de viabilidade celular em hRMECs na passagem 7, expostas a diferentes concentrações de DHA (10 μ M e 250 μ M) por 24 horas, sob tratamento com 400 μ M de DMOG. Linha tracejada indica toxicidade máxima adotada no estudo.

Em nosso modelo de estudo, o tratamento com 50 μ M de DHA em células submetidas à hipóxia, foi capaz de aumentar a fosforilação de AMPK no resíduo Thr172 em comparação ao grupo DMOG ($p<0.05$). Além disso, o tratamento com DHA foi capaz de aumentar a expressão do receptor de ômega-3, GPR120, em comparação aos demais grupos experimentais ($p<0.05$ vs CT; $p<0.001$ vs DMOG) (Figura 19).

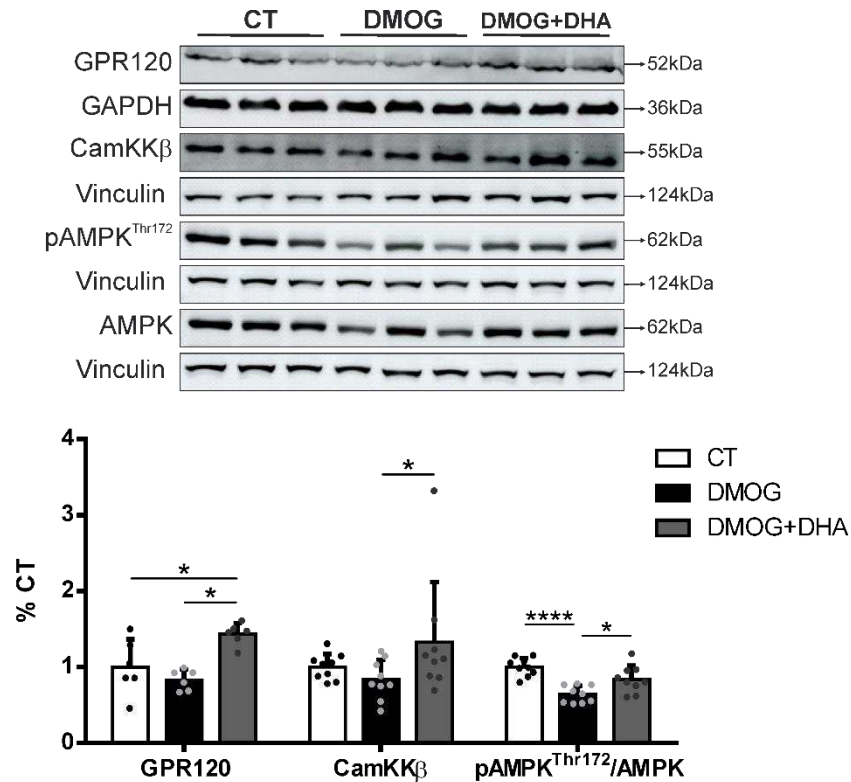


Figura 19. DHA restaura fosforilação de AMPK em hRMECs sob condição de hipóxia química. Imagem representativa da expressão de proteínas avaliadas por *Imunoblotting* e análises densitométricas de GPR120, CamKKβ e AMPK^{Thr172}/AMPK, normalizados pelos respectivos controles internos, Vinculina ou GAPDH, em hRMECs expostas à situação CT, DMOG ou DMOG+DHA por 24 horas. As barras representam a média $\pm$ SD das densidades das bandas expressas em unidades arbitrárias como a porcentagem de variação em relação ao controle. * $p<0.05$; **** $p<0.0001$ através do teste de ANOVA, seguido do pós teste de Fisher.

Ainda, o DHA também foi capaz de aumentar a expressão da proteína a montante da AMPK, CamKKβ em relação ao grupo DMOG ($p<0.05$). Em seguida, foi avaliado a $[Ca^{2+}]_i$ após o tratamento com DHA em condição de hipóxia foi observado aumento na concentração de cálcio intracelular em comparação aos demais grupos experimentais ($p<0.001$ vs CT; $p<0.05$ vs DMOG) (Figura 20). Tais achados indicam que o DHA é capaz de se associar ao GPR120, levando a produção de segundos mensageiros, que resultam no aumento da concentração intracelular de cálcio. O aumento da $[Ca^{2+}]_i$, promove a atividade de CamKKβ, sendo esta responsável pela fosforilação da proteína AMPK no resíduo Thr172.

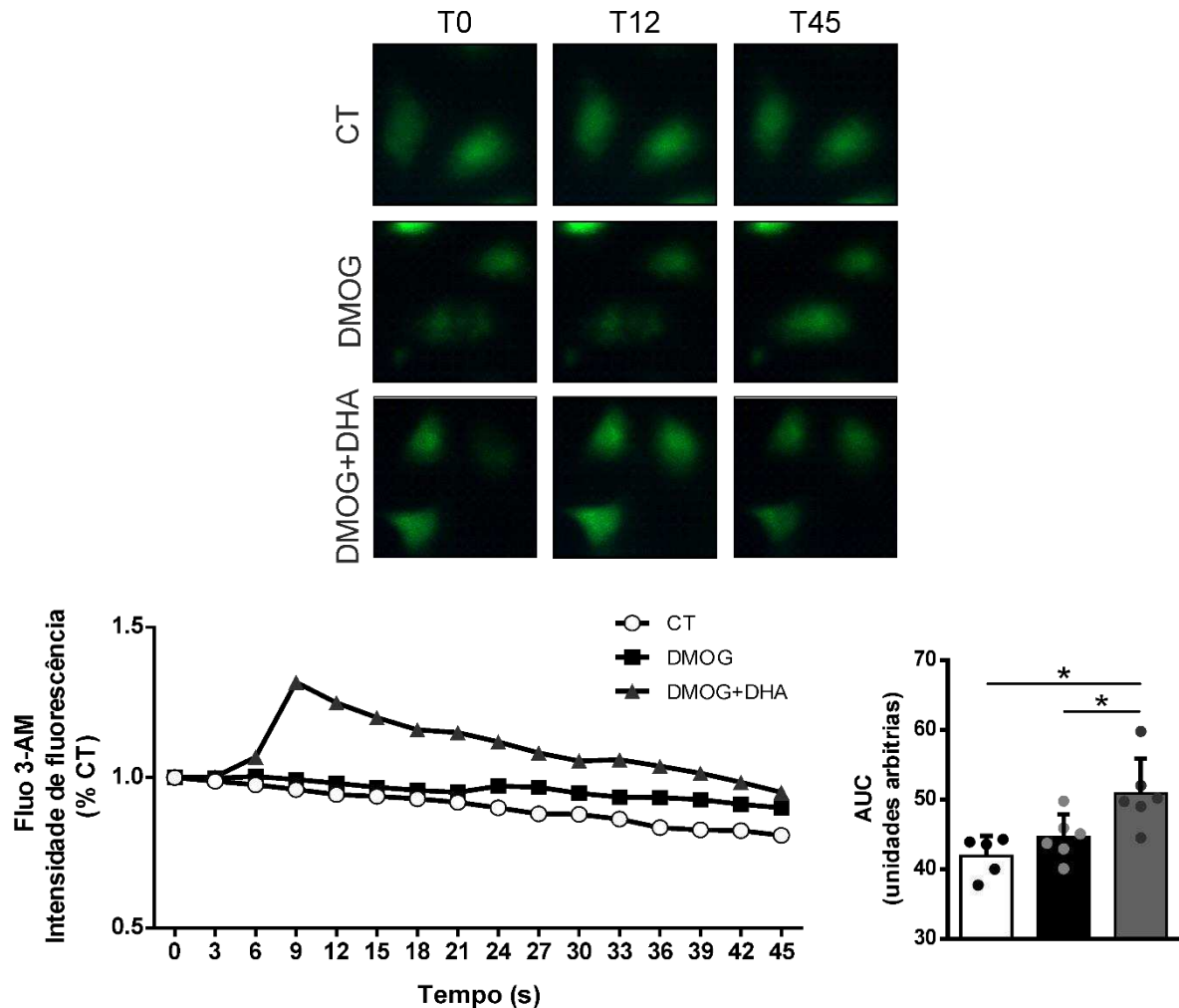


Figura 20. DHA aumenta níveis de cálcio intracelular hRMECs sob condição de hipóxia química. Imagens representativas da fluorescência de Fluo-3 AM em hRMECs expostas a situação CT e DMOG por 24 horas. O tratamento com DHA (50 μ M) foi realizado após a captura da primeira imagem do *time course*. As imagens foram capturadas do T0 ao T45, sob aumento de x420. A área sob a curva (AUC) da intensidade de fluorescência emitida por Fluo-3 AM foi calculada para avaliar a alteração no influxo de cálcio nos diferentes grupos experimentais. As barras representam a média $\pm$ DP expressas em unidades arbitrias. * $p < 0.05$ através do teste de ANOVA, seguido do pós teste de Fisher.

Posteriormente, para avaliarmos se: 1) a ativação de AMPK promovida pelo DHA seria capaz de promover efeitos benéficos nas hRMECs em condição miméticas de hipóxia, e 2) se os possíveis efeitos promovidos pelo DHA seriam dependentes da ação da proteína AMPK, foi adicionado um quarto grupo de investigação, células silenciadas para AMPK $\alpha_{1/2}$ e submetidas ao tratamento com DMOG+DHA (siAMPK α +DMOG+DHA). Inicialmente, foi realizada a otimização e confirmação da eficiência do silenciamento. Com isso, foi possível selecionar a melhor dose (40nM), no qual obtivemos uma redução de 55% na expressão de AMPK α (Figura 21a). Após isso, as células foram expostas sob silenciamento ao tratamento com DMOG+DHA. O grupo siAMPK α +DMOG+DHA apresentou redução significativa na expressão de AMPK α em comparação aos demais

grupos experimentais ($p < 0.0001$). O silenciamento gênico da proteína AMPK α impediu o aumento na atividade da AMPK promovida pelo DHA em condição de hipóxia, reduzindo a fosforilação no sítio Ser79 da proteína a jusante da AMPK, a ACC (**= $p < 0.001$ DMOG+DHA vs siAMPK α +DMOG+DHA) (Figura 21b).

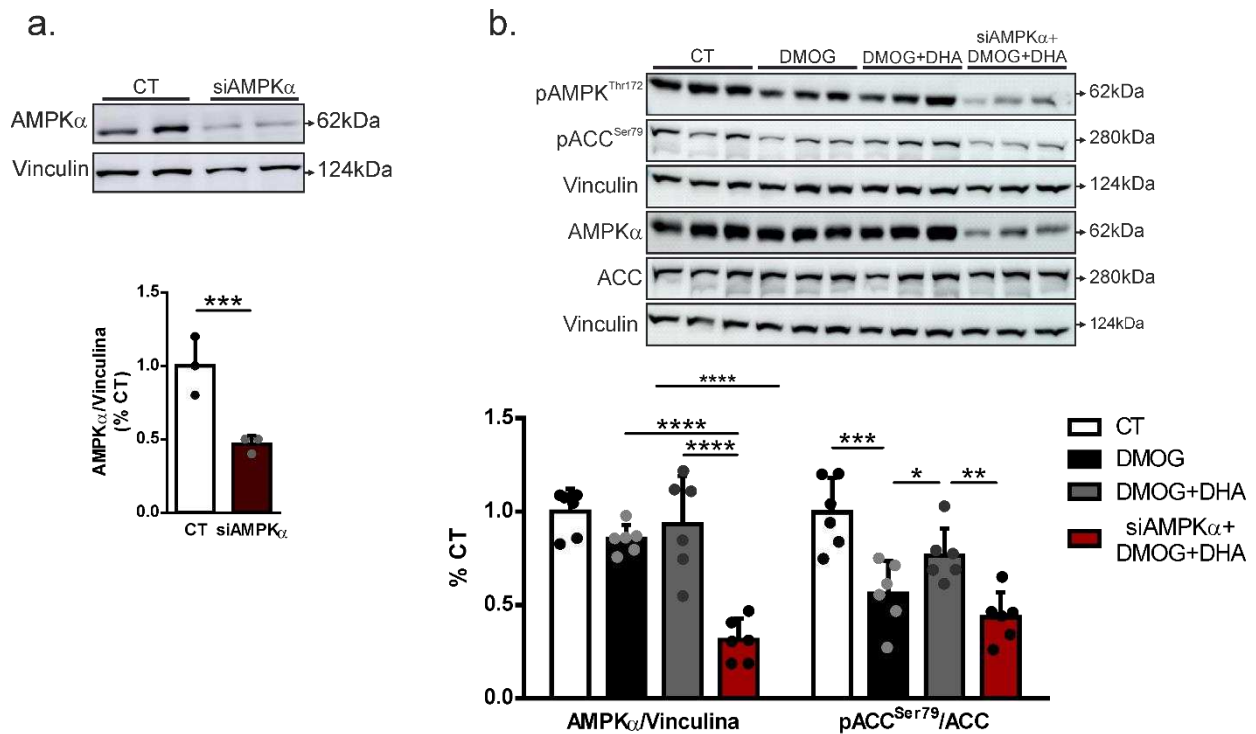


Figura 21. Conteúdo proteico e atividade de AMPK em células endoteliais silenciadas para AMPK α .

a) Imagem representativa da expressão da proteína AMPK α avaliada por *Imunoblotting* e análise densitométrica da AMPK, normalizada pelo controle interno, Vinculina, em hRMECs expostas à situação CT ou siAMPK α (40nm) por 24 horas. As barras representam a média $\pm$ SD das densidades das bandas expressas em unidades arbitrárias como a porcentagem de variação em relação ao controle. *** $p < 0.001$ pelo teste T de *Student*. **b)** Imagem representativa da expressão de proteínas avaliadas por *Imunoblotting* e análises densitométricas de AMPK α e pACC^{Ser79}/ACC normalizados pelos respectivos controles internos, Vinculina, em hRMECs expostas à situação CT, DMOG, DMOG+DHA ou siAMPK α +DMOG+DHA por 24 horas. As barras representam a média $\pm$ DP das densidades das bandas expressas em unidades arbitrárias como a porcentagem de variação em relação ao controle. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ através do teste de ANOVA, seguido do pós teste de Fisher.

Em seguida, foi avaliado a expressão de marcadores clássicos de hipóxia (HIF-1 α , HIF-2 α e VEGF) em hMRECs expostas ao DMOG e tratadas com DHA sob silenciamento gênico ou não para AMPK α . O grupo DMOG+DHA apresentou redução significativa na expressão e translocação ao núcleo HIF-1 α quando comparado ao grupo DMOG ($p < 0.0001$). Além disso, apesar de não haver alteração significativa na expressão de HIF-2 α , o tratamento com DHA foi capaz de diminuir a atividade desse fator de transcrição, através da redução da translocação nuclear da proteína em condição de hipóxia. Por fim, a redução da translocação nuclear de HIFs (HIF-1 α e HIF-2 α) promovido pelo tratamento com DHA, resultou na redução significativa na expressão de VEGF em comparação ao

grupo DMOG ($p < 0.0001$). Em contrapartida, os efeitos benéficos promovidos pelo DHA sob tratamento com DMOG foram perdidos em condição de silenciamento para AMPK α . O grupo siAMPK α +DMOG+DHA apresentou aumento significativo na expressão e translocação ao núcleo de HIF-1 α ($p < 0.001$), aumento na localização nuclear de HIF-2 α e aumento na expressão de VEGF, quando comparado ao grupo DMOG+DHA ($p < 0.001$) (Figura 22a-b).

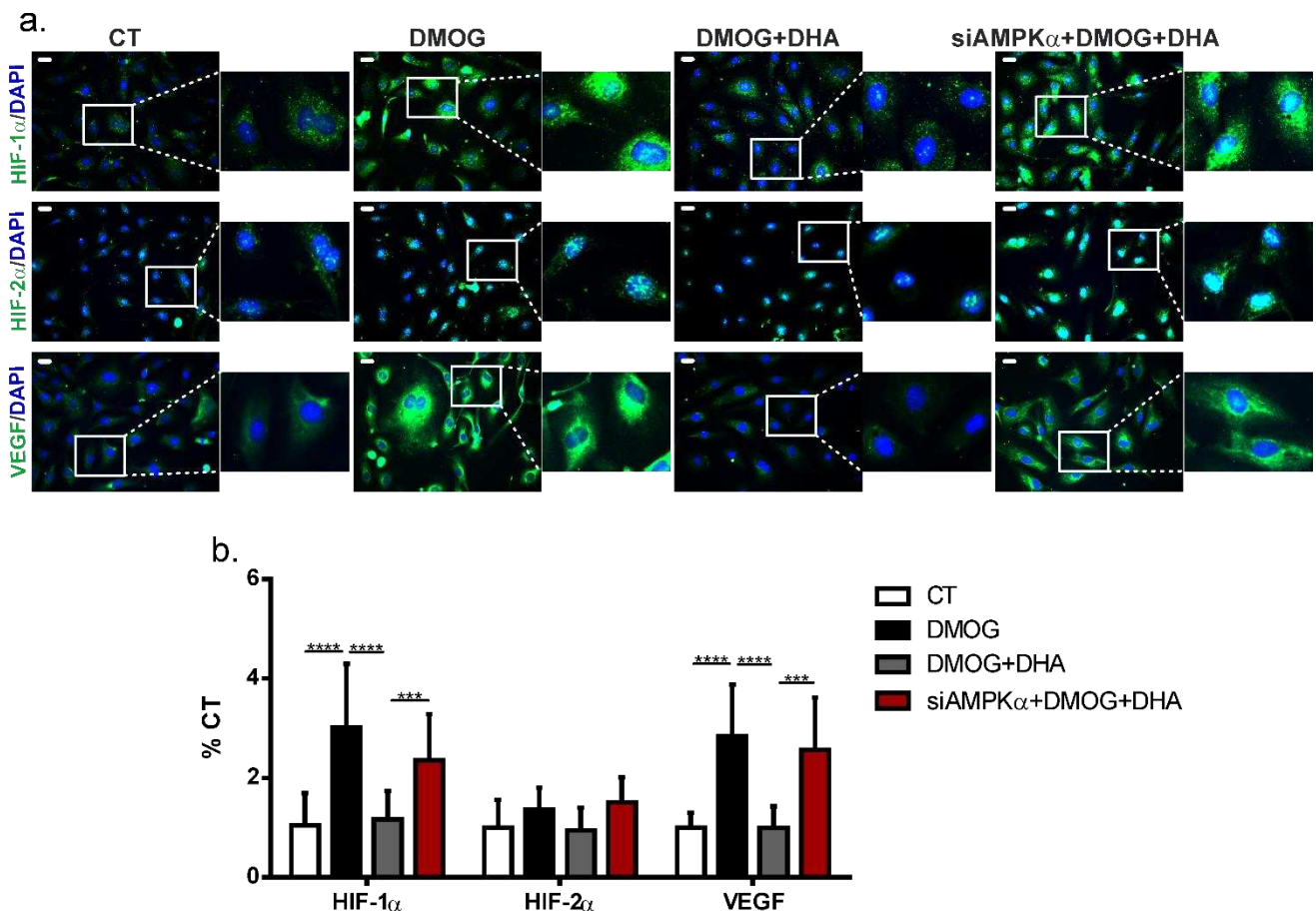


Figura 22. Efeitos benéficos promovidos pelo DHA em condição mimética de hipóxia nas hRMECs são dependentes de AMPK. **a)** Imagens representativas de fotomicrografias e **b)** análise semiquantitativa da intensidade de fluorescência de HIF-1 α , HIF-2 α e VEGF (Verde - Alexa fluor 488) em hRMECs expostas por 24 horas à situação CT, DMOG, DMOG+DHA ou siAMPK α +DMOG+DHA. As fotografias foram obtidas com aumento de 420x. Barra de escalas = 20 μ m. As barras representam a média $\pm$ DP de células positivas corrigidas pelo número total de células em cada campo. Os dados estão expressos como a porcentagem de variação em relação ao grupo CT. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ através do teste de ANOVA, seguido do pós teste de Fisher.

Posteriormente, foi realizado o ensaio de tubulogênese *in vitro*. Com isso, foi possível observar que o tratamento com DMOG foi capaz de induzir a formação de uma rede tubular similar a vasos endoteliais *in vitro*, quando comparado ao grupo CT (Figura 23a-b). Em contrapartida, o tratamento com DHA em condição de hipóxia, foi capaz de afetar a estruturação tubular, reduzindo a formação da trama tubular, diminuindo a quantidade

de tubos e aumentando o espaçamento entre eles (Figura 23c). Por outro lado, em condição de silenciamento, os efeitos promovidos pelo DHA na redução da trama tubular promovido pelo DMOG foi parcialmente abolido (Figura 23d).

Em seguida, três parâmetros relacionados à tubulogênese foram analisados com o intuito de avaliar o potencial antiangiogênico do DHA: comprimento dos túbulos, número de junções e a malha tubular. O tratamento com DMOG apresentou aumento na angiogênese, aumentando o comprimento tubular ($p < 0.05$), número de junções ($p < 0.05$) e a malha tubular ($p < 0.05$) em comparação ao grupo CT. Já o tratamento com DHA em condição de hipóxia inibiu todos os parâmetros testados (comprimento tubular, número de junções e malha tubular = *** $p < 0.001$) em comparação ao DMOG, apresentando um importante potencial antioangionênico em condição de isquemia. De maneira interessante, em condição de silenciamento de AMPK α , os efeitos antioangionênicos promovidos pelo DHA em condição de isquemia foram parcialmente perdidos. Sendo que o grupo siAMPK α +DMOG+DHA, apresentou aumento no comprimento tubular ($p < 0.05$), número de junções ($p < 0.05$) e malha tubular ($p < 0.05$) em comparação ao grupo DMOG+DHA (Figura 23m).

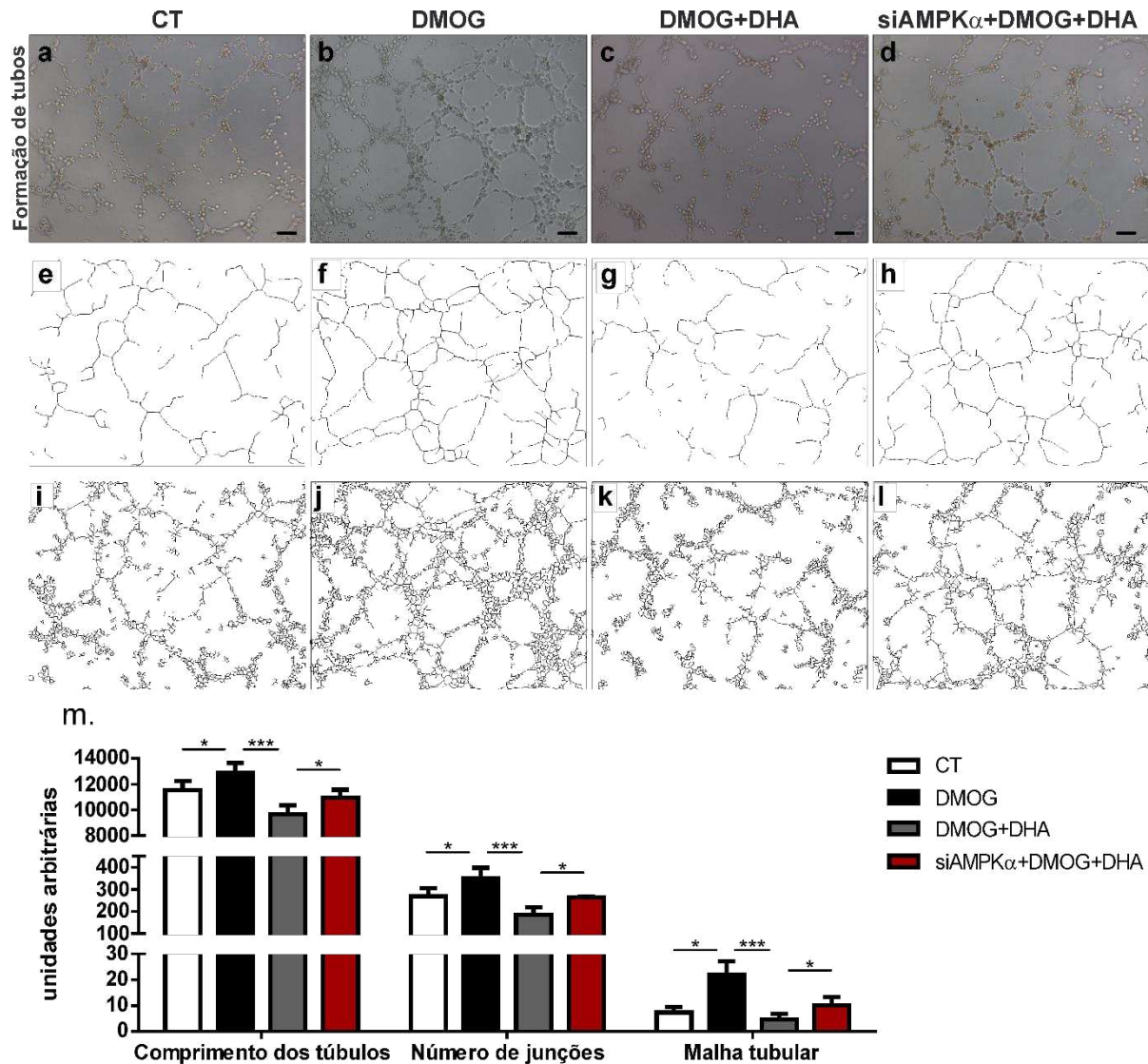


Figura 23. Avaliação do potencial antiangiogênico do DHA em condição mimética de hipóxia isquemia em células silenciadas ou não para AMPK. Ensaio de tubulogênese realizado em hMRECs na passagem 5 expostas por 6 horas à situação CT, DMOG, DMOG+DHA ou siAMPK α +DMOG+DHA. **a-d)** Fotomicrografia representativa da rede tubular formada após exposição ao CT, DMOG, DMOG+DHA ou siAMPK α +DMOG+DHA. As fotografias foram obtidas com aumento de 100x. Barra de escalas = 100 μ m. **e-h)** Imagens representativas da rede tubular transformada em imagem binária através do software AngioAnalyzer. **i-l)** Imagens representativas da malha tubular com células individuais transformadas em imagem binária através do software AngioAnalyzer. **m)** quantificação do comprimento tubular, número de junções e malha tubular nos diferentes grupos experimentais. As barras representam a média $\pm$ DP expressas em unidades arbitrárias. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ através do teste de ANOVA, seguido do pós teste de Fisher.

Posteriormente, avaliamos se o tratamento com DHA em condição de hipóxia seria capaz de reverter o fenômeno de transição mesenquimal promovido pela hipóxia e se tal efeito seria ou não dependente da ação da proteína AMPK. Para isso, foi avaliado o fenômeno de EndMT, através do ensaio de migração celular e análise da barreira celular. Como já evidenciado anteriormente, a hipóxia química foi capaz de aumentar a expressão de

Vimentina (marcador de transição mesenquimal) e junto com isso, ocorreu um aumento na migração e uma alteração na estruturação da barreira celular, através do desarranjo de ZO-1 na membrana celular. De maneira interessante, o tratamento com DHA em condição de hipóxia foi capaz de reduzir a migração celular quando comparado ao grupo DMOG ($p<0.01$) (Figura 24).

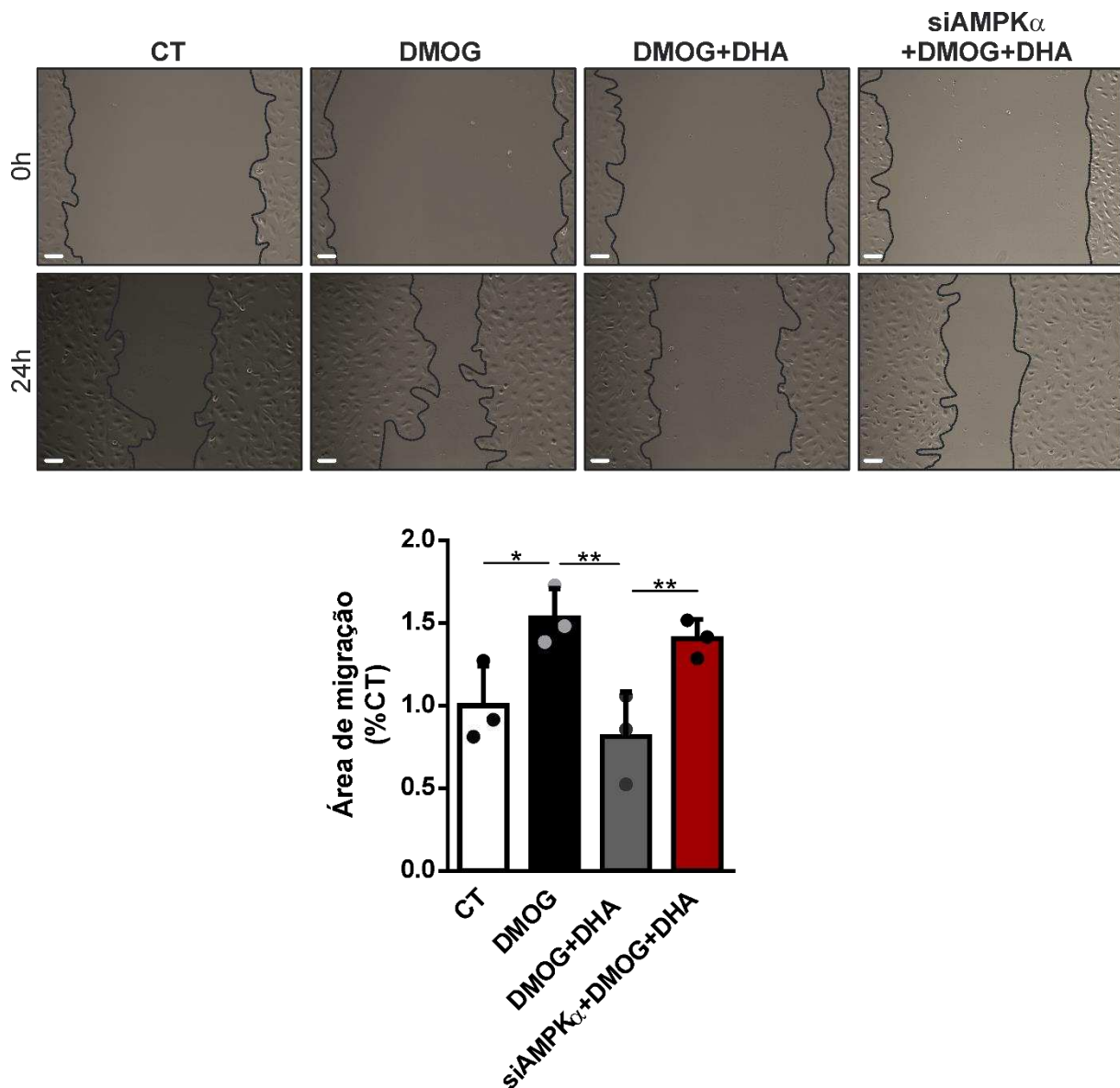


Figura 24. Os efeitos benéficos do DHA sobre a migração celular em hRMECs são dependentes da ação de AMPK α . Imagens representativas de fotomicrografias e quantificação da área de migração de células endoteliais expostas por 24 horas à situação CT, DMOG, DMOG+DHA ou siAMPK α +DMOG+DHA. As fotografias foram obtidas com aumento de 100x. Barra de escalas = 100 μ m. Área de migração celular nos diferentes grupos experimentais. As barras representam a média $\pm$ SD da variação da área migratória em relação ao controle em pelo menos três experimentos. 5 campos diferentes foram fotografados em cada placa para o cálculo da área de migração. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; através do teste de ANOVA, seguido do pós teste de Fisher.

Além disso, o grupo DMOG+DHA também apresentou redução na expressão de vimentina ($p<0.0001$), marcador de transição mesenquimal, além de restaurar a expressão de ZO-1 na barreira intercelular das hRMECs quando comparados ao grupo DMOG (Figura 25a). Além disso, destaca-se que os efeitos protetores do DHA em condição de hipóxia no fenômeno de EndMT foi perdido em células silenciadas para AMPK α (Figura 24a-c; 25).

Após isso, realizamos um teste funcional com a finalidade de avaliar a integridade da barreira celular através da análise da resistência elétrica da barreira transendotelial (*Transendothelial electrical resistance* – TEER) e após 24h horas de tratamento todos os grupos tratados com DMOG apresentaram redução na resistência quando comparados ao grupo CT ($p<0.0001$), sendo que o grupo silenciado para AMPK α apresentou uma redução ainda mais acentuada em comparação aos demais. Tendo em vista que as alterações moleculares precedem as funcionais, continuamos o acompanhamento por mais 24h, totalizando 48h de tratamento, e com isso continuamos observando uma redução em comparação com o grupo CT ($p<0.001$). Entretanto, o tratamento com DHA, em condição de hipóxia, foi capaz de impedir a redução mais acentuada na resistência da barreira após 48h quando comparado ao grupo apenas com DMOG ($p<0.05$). Em contrapartida, ao silenciarmos AMPK α , o efeito protetor do DHA foi perdido ($p<0.05$) (Figura 25c). Sendo assim, foi possível demonstrar o papel protetor do DHA na manutenção da barreira endotelial e no fenômeno de transição mesenquimal, além de confirmar que tais efeitos são dependentes da ação da proteína AMPK α .

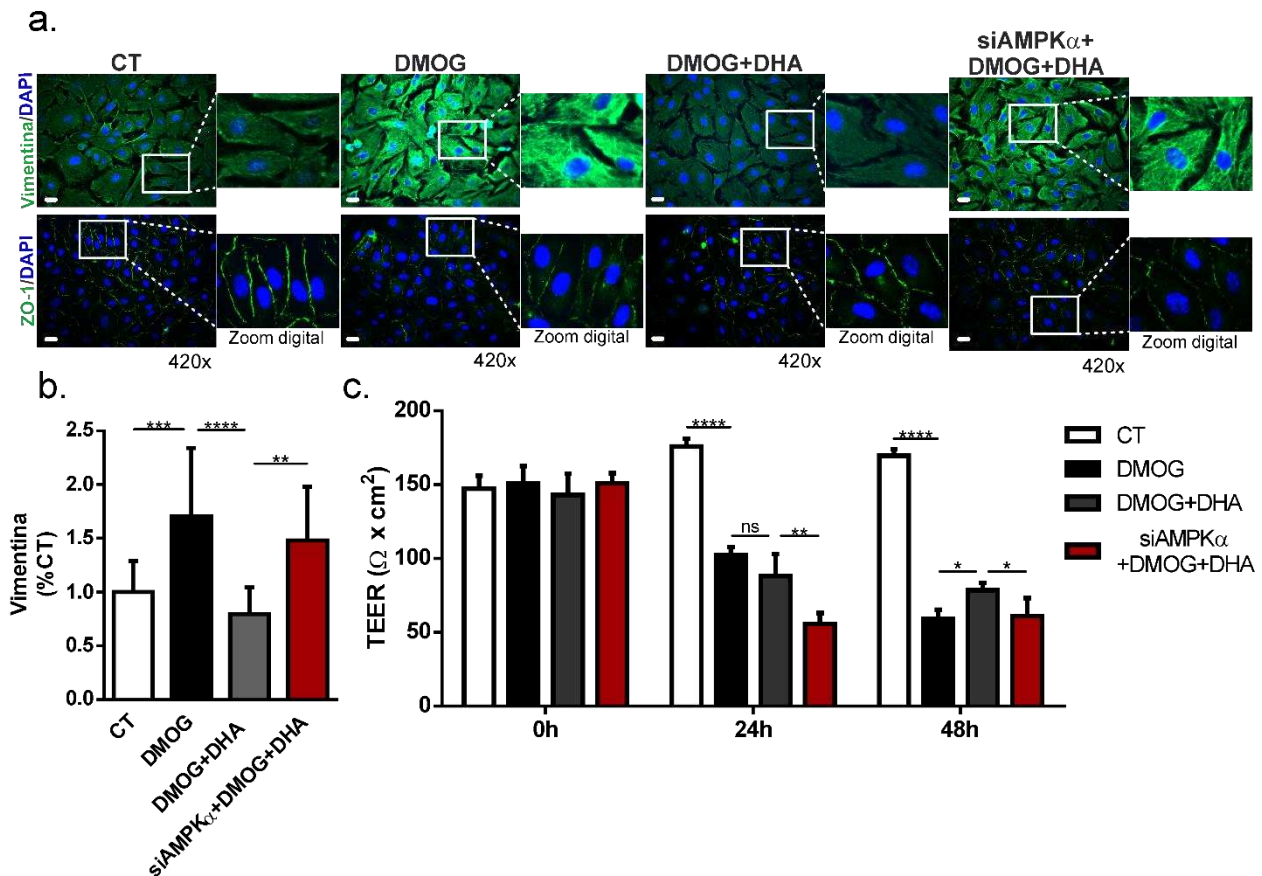


Figura 25. Os efeitos benéficos do DHA na transição mesenquimal e na função de barreira em hRMECs são dependentes da ação de AMPK α . **a.** Imagens representativas de fotomicrografias e análise semiquantitativa da intensidade de fluorescência de Vimentina e ZO-1 (Verde - Alexa fluor 488) em hRMECs expostas por 24 horas à situação CT, DMOG, DMOG+DHA ou siAMPK α +DMOG+DHA. As fotografias foram obtidas com aumento de 420x. Barra de escalas = 20 μ m **b.** Análise semi-quantitativa da expressão de Vimentina. As barras representam a média $\pm$ DP de células positivas corrigidas pelo número total de células em cada campo. Os dados estão expressos como a porcentagem de variação em relação ao grupo CT. 5 campos diferentes foram fotografados cada placa. **c.** TEER expressa em $\Omega \times \text{cm}^2$. As barras representam a média $\pm$ DP da resistência obtida nos tempos 0, 24, e 48 horas em cada condição experimental. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns = não significativa através do teste de ANOVA, seguido do pós teste de Fisher.

Posteriormente, deu-se início às análises *in vivo*. Inicialmente, com o objetivo de avaliar se o ômega-3 possui papel protetor na retinopatia isquêmica, grupos *wild type* (WT – C57BL/6), foram submetidos a diferentes intervenções. Sendo o grupo WT-CT, composto por filhotes que permaneceram em ar atmosférico durante todo o período experimental (p1-p17) e grupo WT-OIR, no qual os filhotes foram submetidos ao protocolo de retinopatia induzida por oxigênio descrito anteriormente. Por fim, o grupo WT-OIR+ ω 3, no qual fêmeas foram suplementadas diariamente via gavagem com 2% da fração lipídica com óleo rico em ômega-3 (EPA e DHA). A suplementação das fêmeas ocorreu a partir do dia 1 (p1) após o nascimento dos filhotes e se deu durante todo o

período experimental (p17). Em paralelo, fêmeas nocautes para AMPK α_2 foram submetidas ao mesmo protocolo e alocadas nos três grupos experimentais, com a finalidade de avaliar se os possíveis benefícios do ômega-3 seriam dependentes da proteína AMPK e se a deleção da AMPK teria algum impacto no desenvolvimento da doença, uma vez que não foram encontrados dados sobre a deleção da proteína nesse modelo animal (Figura 26a).

Inicialmente, foi confirmado a deleção da AMPK α_2 através da análise do conteúdo proteico no fígado e na retina dos animais experimentais, evidenciando que os animais nocautes para AMPK α_2 não expressavam a proteína em ambos os tecidos, quando comparados aos animais WT (C57BL/6) (Figura 26b). Posteriormente, foi avaliado por meio da coloração em Hematoxilina-eosina (HE) a estrutura da retina dos animais submetidos ao modelo de retinopatia isquêmica. Com isso, foi possível verificar que os animais WT-OIR apresentaram maior marcação de núcleos na membrana limitante interna e presença de vasos na camada plexiforme interna quando comparados ao grupo WT-CT. Além disso, os animais que foram submetidos à suplementação com óleo rico em ômega-3 apresentaram marcações nucleares na membrana limitante interna e formação de novos vasos na camada plexiforme. Entretanto, essas alterações apesar de presentes foram atenuadas quando comparados com o grupo que não recebeu suplementação. Em relação aos animais nocautes para AMPK α_2 , a deleção da proteína não alterou o desenvolvimento do tecido retiniano e não gerou um fenótipo mais severo de retinopatia isquêmica. De maneira interessante, animais suplementados com ômega-3 apresentaram o mesmo padrão de neovascularização que o grupo não suplementado em animais nocautes (Figura 26c).

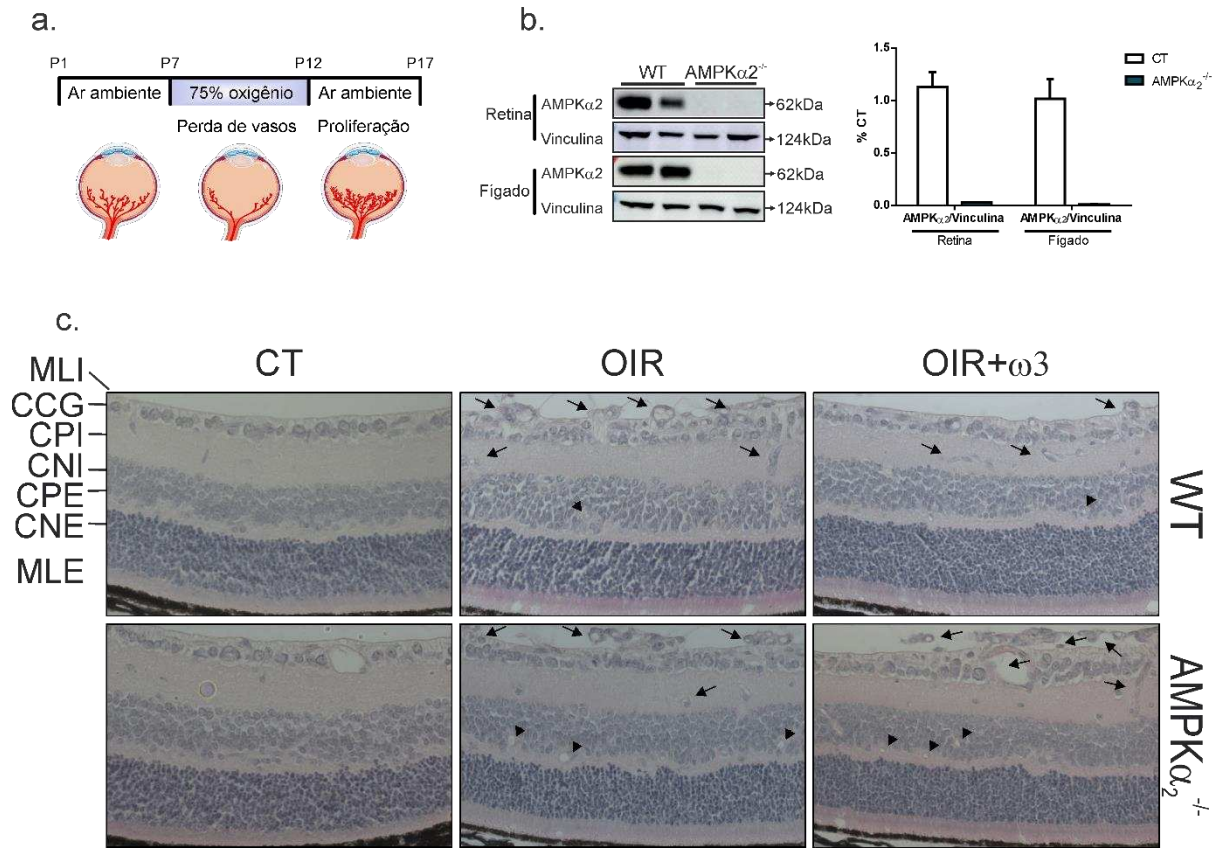


Figura 26. Benefícios promovidos pelo ômega-3 no desenvolvimento retinopatia isquêmica proliferativa são dependentes de AMPK. Globos oculares em parafina foram cortados em seções de 5 μ m. **a.** modelo de retinopatia isquêmica induzida por oxigênio. **b.** conteúdo proteico de AMPK α_2 na retina e fígado de camundongos WT e AMPK α_2 ^{-/-}. As barras representam a média $\pm$ DP das densidades das bandas expressas em unidades arbitrárias como a porcentagem de variação em relação ao controle. **c.** Imagens representativas da coloração com eosina-hematoxilina. Setas indicam marcações nucleares nos grupos submetidos ao modelo de retinopatia induzida por oxigênio. Ponta de setas indicam vasos presentes nas camadas mais internas da retina. Setas indicam a presença de núcleo na MLI e vasos na CPI. MLI: membrana limitante interna; CPI: camada plexiforme interna; CNI: camada nuclear interna; CNE: camada nuclear externa; CPE: camada plexiforme externa; MLE: membrana limitante externa.

Em relação ao marcador clássico de hipóxia (HIF-1 α) avaliado por meio de imunohistoquímica, animais OIR, em ambas as condições – nocaute e *wild type*, apresentaram maior expressão nuclear de HIF-1 α na camada nuclear interna, plexiforme externa e membrana limitante, indicando maior atividade do fator de transcrição em modelo de retinopatia isquêmica em comparação aos seus respectivos controles (WT-CT vs WT-OIR = $p < 0,01$. AMPK α_2 ^{-/-}-CT vs AMPK α_2 ^{-/-}-OIR = $p < 0,001$). Em contrapartida, animais CT-OIR+ ω_3 apresentaram redução na localização nuclear e expressão global de HIF-1 α quando comparado ao grupo CT-OIR ($p < 0,05$) e a deleção da AMPK α_2 foi capaz de abolir os efeitos benéficos promovidos pela suplementação de ômega-3, aumentando novamente a expressão e localização nuclear de HIF-1 α aos níveis observados em animais não suplementados (Figura 27).

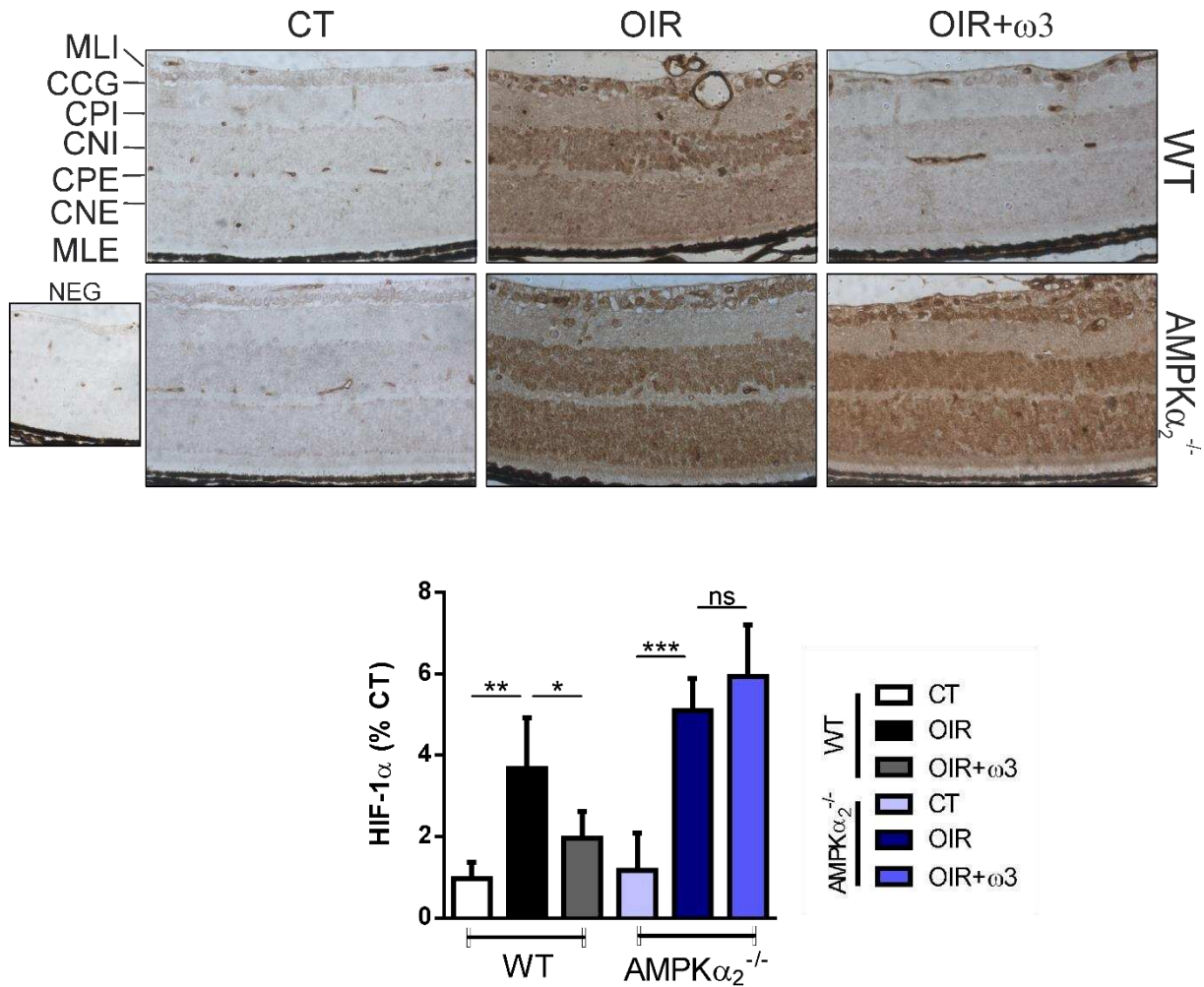


Figura 27. Efeitos benéficos do ômega-3 na expressão de HIF-1 α em modelo de retinopatia induzida por oxigênio são dependentes de AMPK α . Globos oculares em parafina foram cortados em seções de 5 μ m. Imagens representativas de análises de imuno-histoquímica para HIF-1 α e análises semi-quantitativas da expressão de HIF-1 α . As barras representam a média $\pm$ DP da positividade de HIF em unidades arbitrárias como a porcentagem de variação em relação ao controle. MLI: membrana limitante interna; CPI: camada plexiforme interna; CNI: camada nuclear interna; CNE: camada nuclear externa; CPE: camada plexiforme externa; MLE: membrana limitante externa. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001; ns = não significante através do teste de ANOVA, seguido do pós teste de Fisher. (n $\geq$ 3/grupo).

Em relação ao fator de crescimento endotelial (VEGF), molécula chave no processo de angiogênese e proliferação, animais OIR, em ambas as condições – nocaute e *wild type*, apresentaram um aumento na expressão de VEGF especialmente na camada plexiforme interna e externa e membrana limitante externa, quando comparados aos seus respectivos controles (WT-CT vs WT-OIR = p <0,001. AMPK α_2 ^{-/-}-CT vs AMPK α_2 ^{-/-}-OIR = p <0,01). Já animais WT-OIR suplementados com ômega-3 apresentaram uma redução na expressão de VEGF, quando comparados aos animais não suplementados (p <0,0001) e de maneira similar ao seu fator de transcrição (HIF-1 α), a deleção da AMPK α_2 anulou os efeitos benéficos promovidos pela suplementação com ômega-3.

Evidenciando que o papel protetor do ômega-3 na retinopatia isquêmica proliferativa é dependente da participação da proteína AMPK (Figura 28).

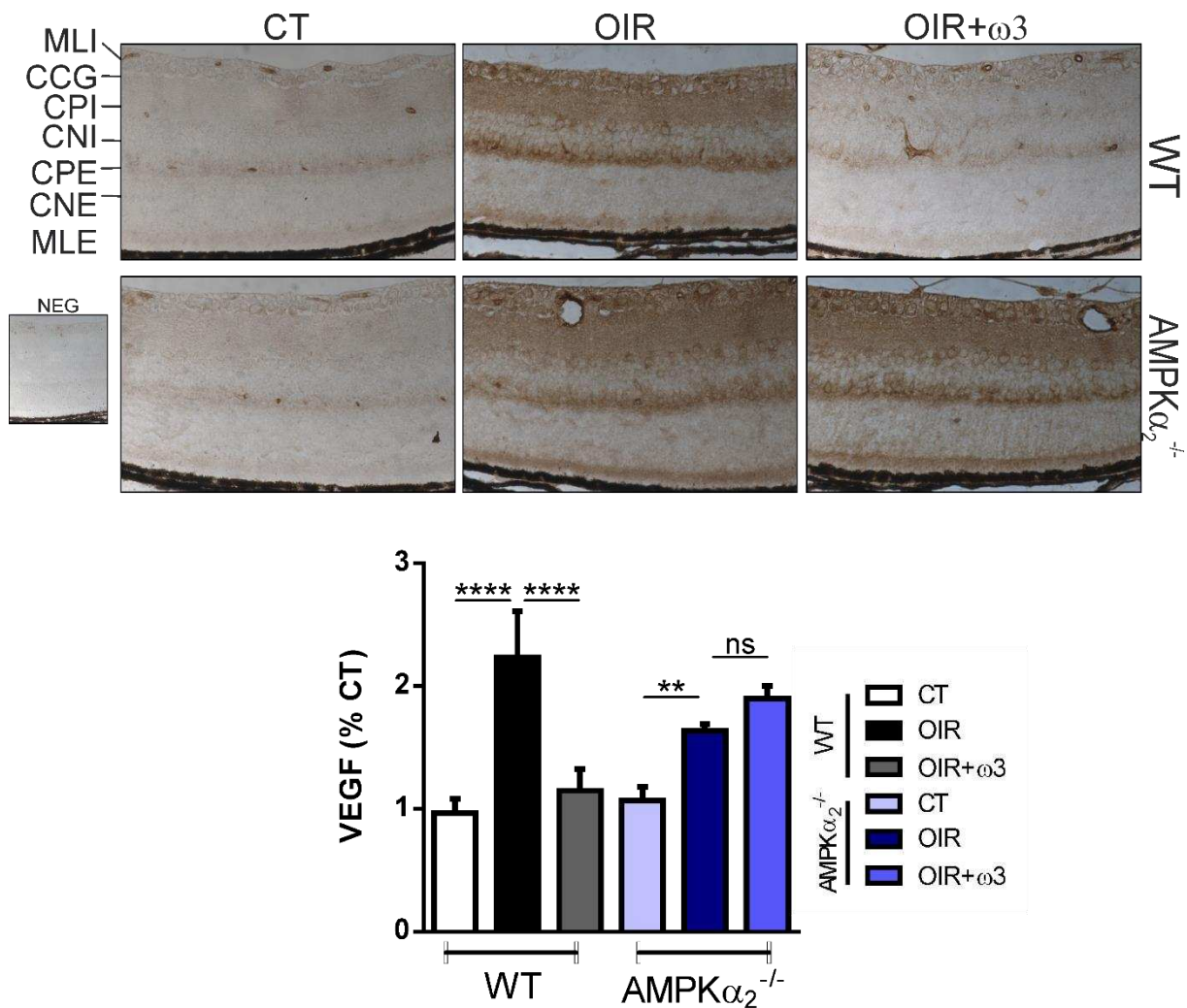


Figura 28. Efeitos benéficos do ômega-3 na expressão de VEGF em modelo de retinopatia induzida por oxigênio são dependentes de AMPK α . Globos oculares em parafina foram cortados em seções de 5 μ m. Imagens representativas de análises de imuno-histoquímica para VEGF e análises semi-quantitativas da expressão de VEGF. As barras representam a média $\pm$ DP da positividade de VEGF em unidades arbitrárias como a porcentagem de variação em relação ao controle. MLI: membrana limitante interna; CPI: camada plexiforme interna; CNI: camada nuclear interna; CNE: camada nuclear externa; CPE: camada plexiforme externa; MLE: membrana limitante externa. ** p <0.01; **** p <0.0001; ns = não significativo através do teste de ANOVA, seguido do pós teste de Fisher. ($n \geq 3$ /grupo).

Por fim, foi avaliado a expressão do marcador de células endoteliais, a isolectina B4 (IB4), em condição controle as retinas de animais WT e AMPK α_2 ^{-/-} apresentaram leve coloração de células positivas para IB4 na camada limitante interna (CLI), que corresponde a densidade vascular do plexo capilar superficial. Em ambas as linhagens submetidas ao modelo OIR (WT e AMPK α_2 ^{-/-}), grande número de células positivas para IB4 foram observadas na CLI, na camada plexiforme interna (CPI) e na camada

plexiforme externa (CPE), que correspondem aos plexos capilares superficial, intermediário e profundo, indicando maior proliferação e neovascularização retiniana nos animais submetidos ao modelo de retinopatia induzida por oxigênio. Em filhotes WT-OIR+ ω 3 WT, as células IB4+ foram restritas a camada limitante interna, mesmo padrão observado na condição CT, indicando redução no processo de neovascularização. Entretanto, os efeitos do ômega-3 não foram observados no grupo AMPK α_2 ^{-/-}-OIR+ ω 3, evidenciando a participação da AMPK no efeito benéfico do ω 3-PUFA no tecido retiniano (Figura 29).

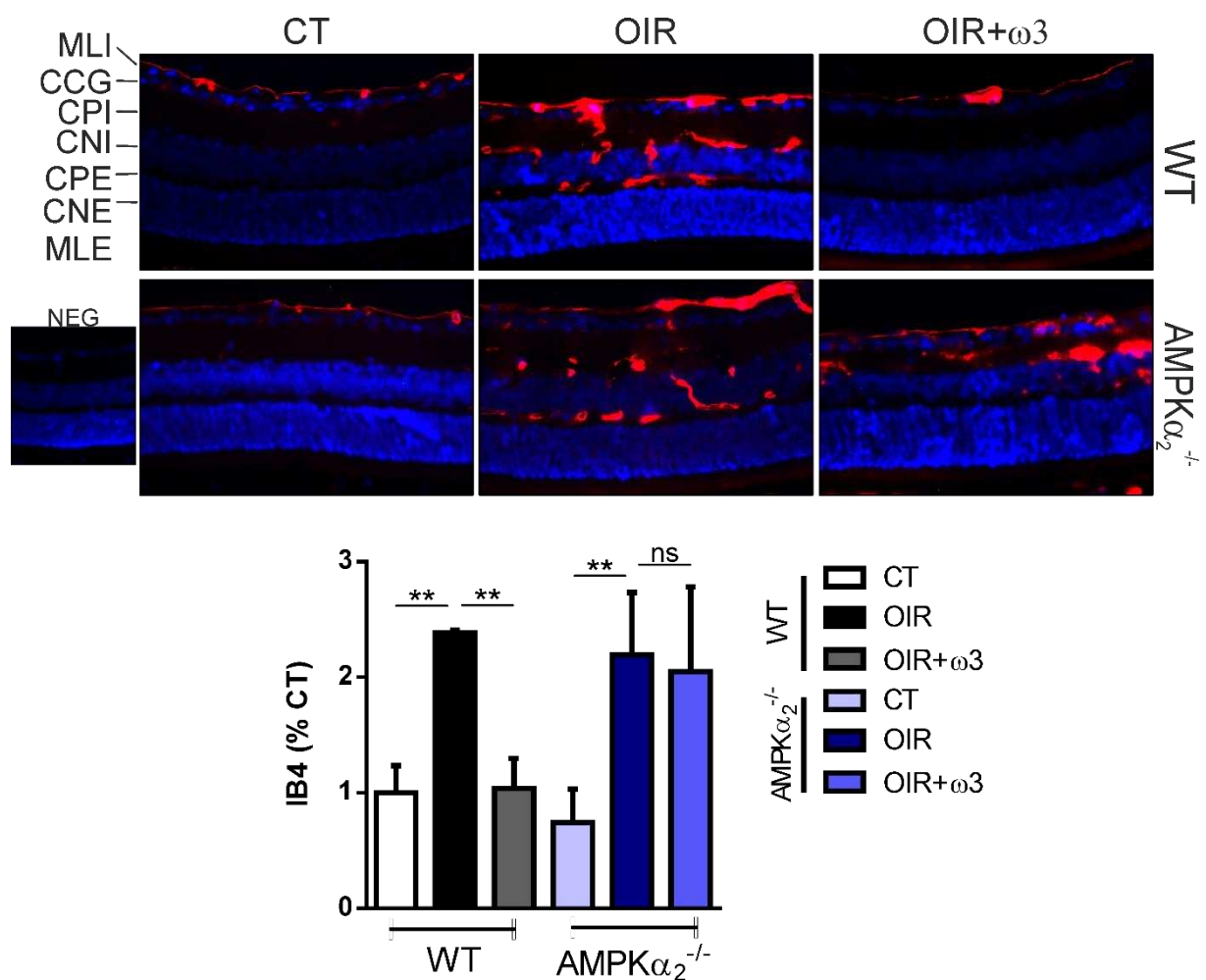


Figura 29. Efeitos benéficos do ômega-3 na angiogênese em modelo de retinopatia induzida por oxigênio são dependentes de AMPK α . Globos oculares em OCT foram cortados em seções de 12 μ M. Imagens representativas de análises imunofluorescência para Isolectina B4 e análises semi-quantitativas de células positivas para IB4. As barras representam a média $\pm$ DP da positividade de IB4 em unidades arbitrárias como a porcentagem de variação em relação ao controle. MLI: membrana limitante interna; CPI: camada plexiforme interna; CNI: camada nuclear interna; CNE: camada nuclear externa; CPE: camada plexiforme externa; MLE: membrana limitante externa. ** p <0.01; ns = não significativa através do teste de ANOVA, seguido do pós teste de Fisher. (n $\geq$ 3/grupo).

6. DISCUSSÃO

Os achados do presente estudo fornecem uma melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares da neovascularização retiniana. O entendimento desses mecanismos é essencial para identificação de possíveis alvos terapêuticos que sejam capazes de controlar ou retardar a progressão das retinopatias isquêmicas, uma vez que são o estágio final de diversas doenças da retina com o desfecho devastador para visão.

Em suma, na tentativa de compreender os mecanismos relacionados ao desenvolvimento e progressão das retinopatias isquêmicas, HRMECs foram expostas a um ambiente isquêmico (tratamento com DMOG) e essa exposição induziu o aumento da expressão de marcadores hipóxicos (HIFs e VEGF), EndMT, além de promover um desarranjo na barreira intercelular de ZO-1, bem como aumento da migração celular e aumento da angiogênese. Além disso, o modelo *in vitro* de hipóxia diminuiu a atividade da AMPK, avaliado por meio da pAMPK^{Thr172} e pACC^{Ser79}. Em contrapartida, a suplementação com DHA preveniu essas anormalidades ao restaurar a atividade da AMPK por meio de sua via canônica. Ainda, o DHA foi capaz de regular positivamente a expressão de seu receptor GPR120, seguido pelo aumento do influxo intracelular de Ca²⁺, que por sua vez, aumentou a expressão da proteína CaMKK β , a montante da AMPK. Os efeitos benéficos do DHA observados em condições hipóxicas não foram observados nas células silenciadas para AMPK α , revelando o papel central da AMPK no mecanismo desempenhado pelo DHA. Em camundongos submetidos ao modelo OIR, a suplementação oral com ω 3-PUFAs foi eficiente na prevenção de alterações vasculares retinianas isquêmicas em camundongos selvagens, mas não em camundongos AMPK α_2 ^{-/-}, indicando que AMPK α_2 desempenha um papel importante nos efeitos protetores de ω 3-PUFAs na angiogênese patológica da retina.

Diversos estudos na literatura demonstram a relação da AMPK no desenvolvimento de diversos processos patológicos da retina (76,91,93,135,136). Estudos anteriores demonstraram que a ativação de AMPK, seja por compostos farmacológicos ou fitoterápicos, foi capaz de diminuir o fenômeno de transição mesenquimal em células no RPE e nas células de Müller, a ativação de AMPK também diminuiu a apoptose e aumentou a autofagia (93,137). Já o tratamento com metformina, um clássico ativador farmacológico de AMPK, foi capaz de reduzir o estresse oxidativo, aumentar a produção de energia pelas mitocôndrias, levando a proteção de fotorreceptores e do RPE em

diferentes modelos de retinopatia (91). Ainda, em ratos espontaneamente obesos e diabéticos (db/db), alimentados com uma dieta rica em *wolfberry*, fruto do *Lycium barbarum*, foi capaz de reduzir o estresse mitocondrial e expressão de marcadores isquêmicos na retina desses animais, sendo esses efeitos relacionados ao aumento de AMPK α_2 no núcleo das células retinianas (92). Por fim, em modelo OIR, o tratamento com metformina foi capaz de reduzir a expressão e fosforilação do receptor de VEGF, FLK-1, sendo relacionado com a inibição da angiogênese patológica nesses animais (138). Apesar de tais evidências demonstrarem o papel de ativadores de AMPK no desenvolvimento e progressão da retinopatia, até onde sabemos, este é o primeiro estudo que avalia o papel da AMPK α na proteção da retina contra insultos isquêmicos.

No presente estudo demonstramos que a ativação da AMPK foi capaz de reduzir marcadores isquêmicos, como a expressão e localização nuclear de HIF, que levou a uma diminuição na expressão de VEGF, culminando na redução da angiogênese patológica.

Entretanto, os efeitos da AMPK na angiogênese não são conclusivos, podendo apresentar efeitos tanto positivos quanto negativos. Em relação aos efeitos positivos mediados pela AMPK na angiogênese, estudos mostram que a ativação da AMPK é capaz de proteger células endoteliais de insultos promovidos pela alta glicose ou altas concentrações de ácidos graxos. Ainda, estudo na literatura demonstrou que a ativação da AMPK promoveu o aumento da migração, proliferação e diferenciação de células endoteliais progenitoras. Tal achado evidenciou que o estímulo de células endoteliais progenitoras (EPCs) com VEGF induzia o aumento da fosforilação de AMPK de maneira dose-dependente e que após ser ativada, AMPK era capaz de fosforilar e ativar eNOS levando ao aumento da formação de tubos, aumento da expressão de marcadores endoteliais (ex. VE-caderina), sendo esses efeitos perdidos quando as EPCs eram tratadas com inibidores farmacológicos da AMPK (80,81). Corroborando com esses dados, a ativação de AMPK também induziu a um aumento na fosforilação de eNOS, coordenando o aumento da migração e formação de tubos em células endoteliais umbilicais (HUVECs) (80). Ainda, a ativação da AMPK em modelo queimadura profunda, foi capaz de aumentar a autofagia, proliferação celular e angiogênese, auxiliando na recuperação tecidual (85).

Em contrapartida, diversos estudos na literatura também evidenciaram o efeito negativo da AMPK na angiogênese, corroborando com os achados do presente trabalho. Estudos na área do câncer evidenciaram que a ativação de AMPK por metformina, AICAR ou sinvastatina foi capaz de diminuir o crescimento de tumores, além de reduzir a angiogênese no microambiente tumoral. Tais estudos, também evidenciaram que a AMPK é capaz de regular negativamente a expressão de HIF-1 e VEGF (139–141). Entretanto, os mecanismos pelos quais a AMPK exerce tais efeitos merecem maiores investigações. Ainda, em modelo de angiogênese patológica, a ativação farmacológica da AMPK foi capaz de diminuir a fosforilação de Smad1/5 e a formação de túbulos em HUVECs tratadas com BMP9, além de reduzir a expressão de outros membros da família do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), responsáveis pelo remodelamento vascular e angiogênese patológica (142). Além disso, a ativação de AMPK por resveratrol, foi capaz de reduzir a fosforilação de NF-KB em células retinianas expostas à TNF- α levando à redução de VEGF além de diminuir a expressão de moléculas de adesão em células do RPE e da microvasculatura retiniana, culminando na diminuição da infiltração de macrófagos e suprimindo a neovascularização da coroide (processo relacionado à gênese da DMRI) (143). Por fim, o resveratrol também foi capaz de reduzir a apoptose em células da microvasculatura retiniana expostas à alta glicose, via AMPK/Sirt1/PGC-1 α (135).

Outro tópico abordado no nosso estudo foi o fenômeno de transição endotélio-mesenquimal (EndMT), processo relacionado com o desenvolvimento e progressão das retinopatias. Por definição, durante o processo de EndMT há a redução na expressão de marcadores endoteliais e de proteínas de junção e aumento na expressão de marcadores mesenquimais, como por exemplo, a vimentina (144). Além disso, os brotamentos aberrantes do endotélio são capazes de alterar os componentes da membrana basal. Durante esse processo, há uma alteração morfológica nas células endoteliais, fazendo com que elas adquiram um formato mais alongado e aumentem sua capacidade migratória (144), alterações também encontradas no presente estudo. Esse fenômeno ocorre pela ativação de diversas vias, como as ativadas por VEGF, citocinas inflamatórias e via de TGF- β e Wnt (144–148). De maneira interessante, a ativação de AMPK parece ser uma interessante estratégia na contenção desse fenômeno uma vez que estudos mostram que a AMPK é capaz de interferir na via de sinalização disparada

por TGF, reduzindo o fenômeno de transição mesenquimal em células epiteliais da retina (149,150), corroborando com os achados do presente estudo.

Dados do presente trabalho também demonstraram que a redução na atividade da AMPK levou ao desarranjo de ZO-1 na barreira das células endoteliais, o que induziu a disfunção da barreira e o aumento da permeabilidade e que, em contrapartida, sua ativação foi capaz de reverter tais parâmetros. De maneira interessante, ativação de AMPK parece estar relacionada com o correto funcionamento da barreira celular, bem como com a deposição de ZO-1 na membrana plasmática. Em células renais (MDKC - *Madin-Darby Canine Kidney cells*), a AMPK foi capaz de fosforilar a proteína Afadin no sítio S1102. Uma vez fosforilada, a Afadina foi capaz de interagir com ZO-1, promovendo sua localização na barreira das células, associada à outras proteínas de junção (151). Nesta perspectiva, estudos evidenciam que a ativação de AMPK por ativadores farmacológicos, como AICAR ou metformina, foram capazes de restaurar a barreira epitelial intestinal (152,153). Entretanto, até onde se sabe essa é a primeira evidência de que a ativação de AMPK por ω 3-PUFAs é capaz de restaurar a deposição de ZO-1 na barreira de células endoteliais retinianas em condição de hipóxia.

Em relação aos ácidos graxos da família do ômega-3, seu consumo ou suplementação têm sido recomendados tanto por auxiliarem na prevenção quanto na redução da incidência de formas mais graves das retinopatias (110–112). Os ácidos graxos da família do ômega-3 (DHA, EPA, ALA), são ácidos graxos essenciais, ou seja, não são produzidos pelo organismo e devem ser adquiridos pela dieta. Eles possuem diversas funções no organismo. Especificamente, sobre a retina, o DHA é o principal componente estrutural do tecido, correspondendo a cerca de 30% dos ácidos graxos da retina. Sendo assim, alterações na ingestão ou na disponibilidade desses ácidos graxos, estão associados com o desenvolvimento e progressão das retinopatias. Além disso, diversos estudos na literatura descreveram o papel terapêutico desses ácidos graxos e seu receptor em diversos tecidos e tipos celulares, como hipotálamo, tecido adiposo, fígado e macrófagos (96,154–157).

A respeito dos benefícios da ingestão de ômega-3 na retinopatia isquêmica, ensaios clínicos demonstraram que a suplementação de bebês nascidos prematuros auxilia no correto desenvolvimento do tecido além de proteger contra a neovascularização patológica retiniana. Nesta perspectiva, ensaio clínico randomizado avaliou 206 bebês

nascidos com menos de 28 semanas de gestação os quais foram suplementados ou não com 50mg/kg/dia de DHA do dia 3 após o nascimento até 40 semanas e verificaram que a suplementação com DHA diminuir em 50% o risco de desenvolvimento de ROP na sua forma severa (110). Ainda, 343 bebês suplementados com diferentes doses de DHA constatou que a suplementação com fórmula infantil contendo 0.32% de DHA foi capaz de melhorar a acuidade visual em comparação à bebês não suplementados (158). Em relação à retinopatia diabética, estudo prospectivo randomizado realizado entre os anos de 2003 e 2009 com 3614 pacientes, demonstrou que a ingestão de 500mg/dia de ácidos graxos da família do ômega-3 era capaz de diminuir o risco de perda de visão em decorrência do diabetes (112). Por fim, ensaio clínico multicêntrico realizado entre os anos de 1992 e 2005, avaliou 1837 indivíduos e evidenciou que pacientes que apresentavam maior ingestão de ω 3-PUFAs, tinham 30% menos chance de desenvolver degeneração macular relacionada à idade neovascular e atrofia geográfica central quando comparados aos indivíduos que apresentavam menor ingestão de ω 3-PUFA (159). Portanto, a ingestão ou suplementação com ω 3-PUFAs parece ser essencial para a prevenção ou redução das formas graves de doenças que acometem a retina.

Sobre os mecanismos moleculares relacionados aos benefícios do ômega-3 na retina, há evidências do potencial anti-inflamatório e anti-angiogênico exercidos pelos ω 3-PUFAs na retina em diversos modelos experimentais (113–115,117,118). Em modelo *in vivo* de neovascularização de coroide a suplementação do 5% de EPA foi capaz de reduzir a neovascularização, expressão de moléculas de adesão, citocinas inflamatórias e VEGF (160). Além disso, o tratamento com neuroprotectina D1 (derivado de DHA) também o foi capaz de reduzir em 80% as lesões causadas na retina por descolamento à laser, além de diminuir o volume de células endoteliais após lesão, quando comparado aos grupos não tratados (161). Em relação aos principais mecanismos relacionados à ação do ômega-3 no tecido retiniano a redução do tônus inflamatório, de moléculas de adesão e expressão de fatores de crescimento estão relacionados com tais benefícios. Além disso, recentemente foi descrito a presença do receptor para ácidos graxos da família do ômega-3, o GPR120, no tecido retiniano. Tal estudo demonstrou a presença do receptor no tecido e que em modelo retinopatia diabética induzida por dieta hiperlipídica, a suplementação com óleo de semente de linhaça (fonte de ômega-3) foi capaz de desarticular a cascata de sinalização inflamatória culminando na redução fosforilação de NF-KB, expressão de citocinas inflamatórias e VEGF (119), corroborando

com os dados obtidos no presente estudo onde foi possível demonstrar a presença de GPR120 em células da microvasculatura retiniana além de descrever seu possível seu mecanismo de ação.

A ativação do GPR120 pode gerar uma cascata de sinalização que culmina na ativação de segundos mensageiros, como o IP3 que coordena a liberação de Ca^{2+} do RE para o citosol. Estudos mostram que o aumento de Ca^{2+} gerado através da ativação de receptores para ácidos graxos é capaz de ativar a proteína CamKK β , aumentando a fosforilação e atividade de AMPK em células musculares e epiteliais do sistema respiratório, promovendo aumento na captação de glicose e auxiliando na organização de *tight junctions* na barreira celular, respectivamente (109,162). De maneira interessante, o presente estudo foi capaz de demonstrar tal mecanismo de ativação de AMPK nas células da microvasculatura retiniana, além de demonstrar que os efeitos benéficos promovidos pelos ω 3-PUFAs em condição de hipóxia são dependentes da ação de AMPK, uma vez que em condição de silenciamento tais efeitos benéficos foram perdidos.

Dessa forma, os resultados obtidos com o presente estudo corroboram com os estudos acerca do tema, evidenciando o potencial terapêutico dos ω 3-PUFAs, além de descrever a presença dos receptores para tais ácidos graxos nas células da microvasculatura retiniana e destacar o papel central da proteína AMPK como mediadora dos efeitos promovidos pelos ω 3-PUFAs nas retinopatias isquêmicas, o que auxilia na maior compreensão dos mecanismos relacionados ao desenvolvimento das RIs e possibilita a elaboração de novas terapias não farmacológicas de baixo custo e fácil implementação para a prevenção e/ou tratamento da doença.

Em relação às limitações do estudo, nossos experimentos *in vitro* foram realizados em apenas de um tipo celular, além de que para a confirmação da hipótese se faz necessário a realização de experimentos adicionais como, por exemplo, a utilização de bloqueador específico para o receptor GPR120. Em relação aos dados *in vivo*, a utilização de animais nocautes específicos para AMPK em células da microvasculatura retiniana seriam necessários para confirmar a hipótese levantada, além da utilização de outros modelos de retinopatias isquêmicas. Por fim, ressalta-se que tal hipótese também deve ser testada em estudos envolvendo seres humanos.

7. CONCLUSÃO

Pode-se concluir o ômega-3 foi capaz de proteger a retina contra insultos isquêmicos e seus efeitos parecem ser dependentes da ativação da proteína AMPK. Nesse sentido, esta evidência pode ser relevante como uma nova ferramenta terapêutica para controlar a angiogênese patológica em doenças isquêmicas da retina. Entretanto, destaca-se a necessidade de experimentos/estudos adicionais para a confirmação da hipótese apresentada no presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rivera JC, Dabouz R, Noueihed B, Omri S, Tahiri H, Chemtob S. Ischemic retinopathies: Oxidative stress and inflammation. Vol. 2017, Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Hindawi Limited; 2017.
2. Kermorvant-Duchemin E, Sapieha P, Sirinyan M, Beauchamp M, Checchin D, Hardy P, et al. Understanding ischemic retinopathies: Emerging concepts from oxygen-induced retinopathy. Vol. 120, Documenta Ophthalmologica. 2010. p. 51–60.
3. Hellström A, Smith LEH, Dammann O. Retinopathy of prematurity. In: The Lancet. Elsevier B.V.; 2013. p. 1445–57.
4. Yucel OE, Eraydin B, Niyaz L, Terzi O. Incidence and risk factors for retinopathy of prematurity in premature, extremely low birth weight and extremely low gestational age infants. BMC Ophthalmol [Internet]. 2022 Sep 13;22(1):367. Available from: <https://bmcophthalmol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12886-022-02591-9>
5. Austeng D, Källen KBM, Uwe ;, Ewald W, Jakobsson PG, Gerd ;, et al. Incidence of Retinopathy of Prematurity in Infants Born Before 27 Weeks' Gestation in Sweden [Internet]. Vol. 127, Arch Ophthalmol. 2009. Available from: <https://jamanetwork.com/>
6. Darlow BA, Hutchinson JL, Henderson-Smart DJ, Donoghue DA, Simpson JM, Evans NJ. Prenatal risk factors for severe retinopathy of prematurity among very preterm infants of the Australian and New Zealand Neonatal Network. Pediatrics. 2005 Apr;115(4):990–6.
7. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. The Lancet [Internet]. 2010;376(9735):124–36. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)62124-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)62124-3)
8. IDF Diabetes Atlas 10th edition [Internet]. Available from: www.diabetesatlas.org
9. Sabanayagam C, Banu R, Chee ML, Lee R, Wang YX, Tan G, et al. Incidence and progression of diabetic retinopathy: a systematic review. Vol. 7, The Lancet Diabetes and Endocrinology. Lancet Publishing Group; 2019. p. 140–9.
10. Song P, Yu J, Chan KY, Theodoratou E, Rudan I. Prevalence, risk factors and burden of diabetic retinopathy in China: A systematic review and meta-analysis. J Glob Health. 2018;8(1).
11. Hammes HP. Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond. Diabetologia. 2018;61(1):29–38.
12. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. Lancet [Internet]. 2010;376(9735):124–36. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673609621243>
13. Mitchell P, Liew G, Gopinath B, Wong TY. Age-related macular degeneration [Internet]. Vol. 392, www.thelancet.com. 2018. Available from: www.thelancet.com
14. Li JQ, Welchowski T, Schmid M, Mauschwitz MM, Holz FG, Finger RP. Prevalence and incidence of age-related macular degeneration in Europe: A systematic review and meta-analysis. British Journal of Ophthalmology. 2020 Aug 1;104(8):1077–84.
15. Niederkorn JY, Kaplan HJ. Immune Response and the Eye. Vol. 92, Chem Immunol Allergy. Basel, Karger. 2007.

16. Gupta MP, Herzlich AA, Sauer T, Chan CC. Retinal anatomy and pathology. *Dev Ophthalmol*. 2015;55:7–17.
17. Mannu GS. Retinal phototransduction. Vol. 19, *Neurosciences*. 2014. p. 275–80.
18. Muth CC. Eye Emergencies. *JAMA* [Internet]. 2017 Aug 15;318(7):676. Available from: <https://doi.org/10.1001/jama.2017.9899>
19. Baden T, Euler T, Berens P. Understanding the retinal basis of vision across species. Vol. 21, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Research; 2020. p. 5–20.
20. Hoon M, Okawa H, della Santina L, Wong ROL. Functional architecture of the retina: Development and disease. Vol. 42, *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd; 2014. p. 44–84.
21. Hurley JB. Retina Metabolism and Metabolism in the Pigmented Epithelium: A Busy Intersection. 2021; Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-100419->
22. Masland R. The fundamental plan of the retina. [cited 2022 Oct 4]; Available from: <https://doi.org/10.1038/nn0901-877>
23. Hosoya K ichi, Tachikawa M. The inner blood-retinal barrier: molecular structure and transport biology. *Adv Exp Med Biol*. 2012;763:85–104.
24. Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C. Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol*. 2011;21(SUPPL.6):3–9.
25. Selvam S, Kumar T, Fruttiger M. Retinal vasculature development in health and disease. Vol. 63, *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd; 2018. p. 1–19.
26. Fields MA, del Priore L v., Adelman RA, Rizzolo LJ. Interactions of the choroid, Bruch's membrane, retinal pigment epithelium, and neurosensory retina collaborate to form the outer blood-retinal-barrier. Vol. 76, *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd; 2020.
27. Naylor A, Hopkins A, Hudson N, Campbell M. Tight junctions of the outer blood retina barrier. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020.
28. Hudson N, Campbell M. Tight Junctions of the Neurovascular Unit. Vol. 14, *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2021.
29. Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C. Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol*. 2011;21(SUPPL.6):3–9.
30. Díaz-Coránguez M, Ramos C, Antonetti DA. The inner blood-retinal barrier: Cellular basis and development. *Vision Res* [Internet]. 2017 Oct;139:123–37. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042698917300986>
31. Naylor A, Hopkins A, Hudson N, Campbell M. Tight junctions of the outer blood retina barrier. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020.
32. Günzel D, Yu ASL. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*. 2013 Apr;93(2):525–69.
33. Selvam S, Kumar T, Fruttiger M. Retinal vasculature development in health and disease. Vol. 63, *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd; 2018. p. 1–19.

34. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2001;2(4):285–93. Available from: <https://doi.org/10.1038/35067088>
35. Fields MA, del Priore L v., Adelman RA, Rizzolo LJ. Interactions of the choroid, Bruch's membrane, retinal pigment epithelium, and neurosensory retina collaborate to form the outer blood-retinal-barrier. Vol. 76, *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd; 2020.
36. brb.
37. Huang H. Pericyte-endothelial interactions in the retinal microvasculature. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–18.
38. Gariano RF. Cellular mechanisms in retinal vascular development. Vol. 22, *Progress in Retinal and Eye Research*. 2003. p. 295–306.
39. Burns SA, Elsner AE, Gast TJ. Imaging the Retinal Vasculature. Vol. 7, *Annual Review of Vision Science*. Annual Reviews Inc.; 2021. p. 129–53.
40. Fruttiger M. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis*. 2007 Jun;10(2):77–88.
41. Huang H. Pericyte-endothelial interactions in the retinal microvasculature. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–18.
42. Nesper PL, Fawzi AA. Human parafoveal capillary vascular anatomy and connectivity revealed by optical coherence tomography angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018 Aug 1;59(10):3858–67.
43. Fevereiro-Martins M do R, Marques-Neves CAM, Areias MHFGP, Bicho MDP. Retinopathy of prematurity: A review of pathophysiology and signaling Pathways. *Surv Ophthalmol* [Internet]. 2022 Nov 22; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36427559>
44. Hellström A, Smith LEH, Dammann O. Retinopathy of prematurity. *The Lancet*. 2013;382(9902):1445–57.
45. Rivera JC, Dabouz R, Noueihed B, Omri S, Tahiri H, Chemtob S. Review Article Ischemic Retinopathies : Oxidative Stress and Inflammation. 2017;2017.
46. Tong Y, Lu W, Deng Q qin, Chen C, Shen Y. Automated identification of retinopathy of prematurity by image-based deep learning. *Eye and Vision*. 2020 Dec 1;7(1).
47. Wong TY, Cheung CMG, Larsen M, Sharma S, Simó R. Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2(April).
48. Duh EJ, Sun JK, Stitt AW. Diabetic retinopathy: Current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI Insight*. 2017;2(14).
49. Frank RN. Diabetic Retinopathy and Systemic Factors. 2015;22(2):151–6.
50. Hendrick AM, Gibson M V. Diabetic Retinopathy. 2015;42:451–64.
51. Rivera JC, Dabouz R, Noueihed B, Omri S, Tahiri H, Chemtob S. Ischemic retinopathies: Oxidative stress and inflammation. Vol. 2017, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2017.
52. Zong H, Ward M, Stitt AW. AGEs , RAGE , and Diabetic Retinopathy. 2011;(May):244–52.

53. Xu HZ, Le YZ. Significance of Outer Blood–Retina Barrier Breakdown in Diabetes and Ischemia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* [Internet]. 2011 Apr 5;52(5):2160. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.10-6518>
54. Eshaq RS, Aldalati AMZ, Alexander JS, Harris NR. Diabetic retinopathy: Breaking the barrier. *Pathophysiology* [Internet]. 2017;1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pathophys.2017.07.001>
55. Altmann C, Schmidt MHH. The role of microglia in diabetic retinopathy: Inflammation, microvasculature defects and neurodegeneration. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2018.
56. Chaudhary S, Zaveri J, Becker N. Proliferative diabetic retinopathy (PDR). *Disease-a-Month*. 2021 May 1;67(5).
57. Subhani S, Vavilala DT, Mukherji M. HIF inhibitors for ischemic retinopathies and cancers: options beyond anti-VEGF therapies. Vol. 19, *Angiogenesis*. Springer Netherlands; 2016. p. 257–73.
58. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. Vol. 29, *Molecules and cells*. 2010. p. 435–42.
59. Taylor CT, Scholz CC. The effect of HIF on metabolism and immunity. Vol. 18, *Nature Reviews Nephrology*. Nature Research; 2022. p. 573–87.
60. Vito A, El-Sayes N, Mossman K. Hypoxia-Driven Immune Escape in the Tumor Microenvironment. Vol. 9, *Cells*. NLM (Medline); 2020.
61. Uemura A, Fruttiger M, D'Amore PA, de Falco S, Jousseaume AM, Sennlaub F, et al. VEGFR1 signaling in retinal angiogenesis and microinflammation. Vol. 84, *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd; 2021.
62. Amadio M, Govoni S, Pascale A. Targeting VEGF in eye neovascularization: What's new?: A comprehensive review on current therapies and oligonucleotide-based interventions under development. Vol. 103, *Pharmacological Research*. Academic Press; 2016. p. 253–69.
63. Gupta N, Mansoor S, Sharma a, Sapkal a, Sheth J, Falatoonzadeh P, et al. Diabetic retinopathy and VEGF. *Open Ophthalmol J* [Internet]. 2013;7:4–10. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3580758&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
64. Jin Y, Kaluza D, Jakobsson L. VEGF, Notch and TGFβ/BMPs in regulation of sprouting angiogenesis and vascular patterning. *Biochem Soc Trans*. 2014 Dec 1;42(6):1576–83.
65. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *Journal of Cell Biology*. 2003 Jun 23;161(6):1163–77.
66. Arcondéguy T, Lacazette E, Millevoi S, Prats H, Touriol C. VEGF-A mRNA processing, stability and translation: A paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic Acids Res*. 2013 Sep;41(17):7997–8010.
67. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. Vol. 176, *Cell*. Cell Press; 2019. p. 1248–64.

68. Storkebaum E, Carmeliet P. VEGF: a critical player in neurodegeneration. *Journal of Clinical Investigation*. 2004 Jan 1;113(1):14–8.
69. Bressan C, Saghatelian A. AMPK-induced autophagy as a key regulator of cell migration. *Autophagy*. 2021;17(3):828–9.
70. Lin SC, Hardie DG. AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. *Cell Metabolism*. 2018.
71. Hardie DG. AMPK: Positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2015;33:1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2014.09.004>
72. Burkewitz K, Zhang Y, Mair WB. AMPK at the nexus of energetics and aging. *Cell Metabolism*. 2014.
73. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. Vol. 13, *Nature Cell Biology*. 2011. p. 1016–23.
74. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2011;13(9):1016–23. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncb2329>
75. Li Y, Sun R, Zou J, Ying Y, Luo Z. Dual roles of the AMP-activated protein kinase pathway in angiogenesis. Vol. 8, *Cells*. MDPI; 2019.
76. Kamoshita M, Ozawa Y, Kubota S, Miyake S, Tsuda C, Nagai N, et al. AMPK-NF- κ B axis in the photoreceptor disorder during retinal inflammation. *PLoS One*. 2014;9(7):1–10.
77. Pernicova I, Korbonits M. Metformin-Mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. Vol. 10, *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Publishing Group; 2014. p. 143–56.
78. Sanchez-Rangel E, Inzucchi SE. Metformin: clinical use in type 2 diabetes. Vol. 60, *Diabetologia*. Springer Verlag; 2017. p. 1586–93.
79. Lv Z, Guo Y. Metformin and Its Benefits for Various Diseases. Vol. 11, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
80. Zheng S, Li W, Xu M, Bai X, Zhou Z, Han J, et al. Calcitonin gene-related peptide promotes angiogenesis via AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2010;299:1485–92. Available from: <http://www.ajpcell.org/C1485>
81. Li X, Han Y, Pang W, Li C, Xie X, Shyy JYJ, et al. AMP-activated protein kinase promotes the differentiation of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Oct;28(10):1789–95.
82. Liang P, Jiang B, Li Y, Liu Z, Zhang P, Zhang M, et al. Autophagy promotes angiogenesis via AMPK/Akt/mTOR signaling during the recovery of heat-denatured endothelial cells. *Cell Death Dis*. 2018 Dec 1;9(12).
83. Ohashi K, Ouchi N, Higuchi A, Shaw RJ, Walsh K. LKB1 Deficiency in Tie2-cre-expressing cells impairs ischemia-induced angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 Jul 16;285(29):22291–8.

84. Yu JW, Deng YP, Han X, Ren GF, Cai J, Jiang GJ. Metformin improves the angiogenic functions of endothelial progenitor cells via activating AMPK/eNOS pathway in diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol*. 2016 Jun 18;15(1).
85. Liang P, Jiang B, Li Y, Liu Z, Zhang P, Zhang M, et al. Autophagy promotes angiogenesis via AMPK/Akt/mTOR signaling during the recovery of heat-denatured endothelial cells. *Cell Death Dis*. 2018 Dec 1;9(12).
86. Ohashi K, Ouchi N, Higuchi A, Shaw RJ, Walsh K. LKB1 Deficiency in Tie2-cre-expressing cells impairs ischemia-induced angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 Jul 16;285(29):22291–8.
87. Ouchi N, Shibata R, Walsh K. AMP-activated protein kinase signaling stimulates VEGF expression and angiogenesis in skeletal muscle. *Circ Res*. 2005 Apr 29;96(8):838–46.
88. Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, et al. Adiponectin Stimulates Angiogenesis by Promoting Cross-talk between AMP-activated Protein Kinase and Akt Signaling in Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Jan 9;279(2):1304–9.
89. Wang JC, Li XX, Sun X, Li GY, Sun JL, Ye YP, et al. Activation of AMPK by simvastatin inhibited breast tumor angiogenesis via impeding HIF-1 α -induced pro-angiogenic factor. *Cancer Sci*. 2018 May 1;109(5):1627–37.
90. Shao S, Zhao L, An G, Zhang L, Jing X, Luo M, et al. Metformin suppresses HIF-1 α expression in cancer-associated fibroblasts to prevent tumor-stromal cross talk in breast cancer. *FASEB Journal*. 2020 Aug 1;34(8):10860–70.
91. Xu L, Kong L, Wang J, Ash JD. Stimulation of AMPK prevents degeneration of photoreceptors and the retinal pigment epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018 Oct 9;115(41):10475–80.
92. Yu H, Wark L, Ji H, Willard L, Jaing Y, Han J, et al. Dietary wolfberry upregulates carotenoid metabolic genes and enhances mitochondrial biogenesis in the retina of db/db diabetic mice. *Mol Nutr Food Res*. 2013 Jul;57(7):1158–69.
93. Chen H, Ji Y, Yan X, Su G, Chen L, Xiao J. Berberine attenuates apoptosis in rat retinal Müller cells stimulated with high glucose via enhancing autophagy and the AMPK/mTOR signaling. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018 Dec 1;108:1201–7.
94. Dyerberg J, Bang HO. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet*. 1979;2(8140):433–5.
95. Kimura I, Ichimura A, Ohue-Kitano R, Igarashi M. Free fatty acid receptors in health and disease. *Physiol Rev*. 2020 Jan 1;100(1):171–210.
96. Novak TE, Babcock TA, Jho DH, Helton WS, Espat NJ. NF- κ B inhibition by ω -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF- α transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2003;284(1):L84–9. Available from: <http://ajplung.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajplung.00077.2002>
97. Lo CJ, Chiu KC, Fu M, Lo R, Helton S. Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the NF kappa B activity. *J Surg Res*. 1999;82:216–21.

98. de Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone M a, Libby P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 1994;14(11):1829–36.
99. Somers SD, Erickson KL. Alteration of tumor necrosis factor-alpha production by macrophages from mice fed diets high in eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acids. *Cell Immunol [Internet]*. 1994;153(2):287–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8118867>
100. Sinha S, Perdomo G, Brown NF, O'Doherty RM. Fatty acid-induced insulin resistance in L6 myotubes is prevented by inhibition of activation and nuclear localization of nuclear factor κB. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(40):41294–301.
101. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, et al. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell*. 2010;142(5):687–98.
102. Oh DY, Walenta E, Akiyama TE, Lagakos WS, Lackey D, Pessentheiner AR, et al. A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nat Med [Internet]*. 2014;20(8):942–7. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84907612482&partnerID=tZOtx3y1>
103. Oliveira V, Marinho R, Vitorino D, Santos G, Moraes J, Dragano N, et al. Diets containing alpha-linolenic (omega 3) or oleic (omega 9) fatty acids rescues obese mice from insulin resistance. *Endocrinology*. 2015;(August):en.2014-1880.
104. Oh DY, Olefsky JM. Omega 3 fatty acids and GPR120. *Cell Metab [Internet]*. 2012;15(5):564–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.009>
105. Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L, et al. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature [Internet]*. 2012;483(7389):350–4. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature10798>
106. Gao B, Han YH, Wang L, Lin YJ, Sun Z, Lu WG, et al. Eicosapentaenoic acid attenuates dexamethasone-induced apoptosis by inducing adaptive autophagy via GPR120 in murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis [Internet]*. 2016;7(5):e2235. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/cddis.2016.144>
107. Ghosh E, Kumari P, Jaiman D, Shukla AK. Methodological advances: The unsung heroes of the GPCR structural revolution. Vol. 16, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 69–81.
108. Milligan G, Alvarez-Curto E, Hudson BD, Prihandoko R, Tobin AB. FFA4/GPR120: Pharmacology and Therapeutic Opportunities. *Trends Pharmacol Sci [Internet]*. 2017;38(9):809–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2017.06.006>
109. Kim N, Lee JO, Lee HJ, Kim HI, Kim JK, Lee YW, et al. Endogenous ligand for GPR120, docosahexaenoic acid, exerts benign metabolic effects on the skeletal muscles via AMP-activated protein kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2015 Aug 14;290(33):20438–47.

110. Hellström A, Nilsson AK, Wackernagel D, Pivodic A, Vanpee M, Sjöbom U, et al. Effect of Enteral Lipid Supplement on Severe Retinopathy of Prematurity: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Pediatr.* 2021 Apr 1;175(4):359–67.
111. Pivodic A, Johansson H, Smith LE, Löfqvist C, Albertsson-Wikland K, Nilsson S, et al. Evaluation of the Retinopathy of Prematurity Activity Scale (ROP-ActS) in a randomised controlled trial aiming for prevention of severe ROP: a substudy of the Mega Donna Mega trial. *BMJ Open Ophthalmol* [Internet]. 2022 Apr 8;7(1):e000923. Available from: <https://bmjophth.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjophth-2021-000923>
112. Sala-Vila A, Díaz-López A, Valls-Pedret C, Cofán M, García-Layana A, Lamuela-Raventós RM, et al. Dietary marine ω -3 fatty acids and incident sight-threatening retinopathy in middle-aged and older individuals with type 2 diabetes: Prospective investigation from the PREDIMED trial. *JAMA Ophthalmol.* 2016 Oct 1;134(10):1142–9.
113. Kalogerou M, Ioannou S, Kolovos P, Prokopiou E, Potamiti L, Kyriacou K, et al. Omega-3 fatty acids promote neuroprotection, decreased apoptosis and reduced glial cell activation in the retina of a mouse model of OPA1-related autosomal dominant optic atrophy. *Exp Eye Res.* 2022 Feb 1;215.
114. Kalogerou M, Kolovos P, Prokopiou E, Papagregoriou G, Deltas C, Malas S, et al. Omega-3 fatty acids protect retinal neurons in the DBA/2J hereditary glaucoma mouse model. *Exp Eye Res.* 2018;167:128–39.
115. Sapieha P, Chen J, Stahl A, Seaward MR, Favazza TL, Juan AM, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids preserve retinal function in type 2 diabetic mice. *Nutr Diabetes* [Internet]. 2012;2(7):e36. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nutd.2012.10>
116. SanGiovanni JP, Chew EY. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog Retin Eye Res.* 2005;24(1):87–138.
117. Prokopiou E, Kolovos P, Georgiou C, Kalogerou M, Potamiti L, Sokratous K, et al. Omega-3 fatty acids supplementation protects the retina from age-associated degeneration in aged C57BL/6J mice. *BMJ Open Ophthalmol.* 2019 Nov 1;4(1).
118. Connor KM, SanGiovanni JP, Lofqvist C, Aderman CM, Chen J, Higuchi A, et al. Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med.* 2007;13(7):868–73.
119. Dátalo MN, Sant’Ana MR, Formigari GP, Rodrigues PB, de Moura LP, da Silva ASR, et al. Omega-3 from Flaxseed Oil Protects Obese Mice Against Diabetic Retinopathy Through GPR120 Receptor. *Sci Rep.* 2018 Dec 1;8(1).
120. Connor KM, Sangiovanni JP, Lofqvist C, Aderman CM, Chen J, Higuchi A, et al. Increased dietary intake of ω -3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med.* 2007 Jul;13(7):868–73.
121. van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In 2011. p. 237–45. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-080-5_20
122. Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. Vol. 56, *Br. J. Cancer.* The Macmillan Press Ltd; 1987.

123. Martinotti S, Ranzato E. Scratch wound healing assay. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2020. p. 225–9.
124. Francescone RA, Faibish M, Shao R. A matrigel-based tube formation assay to assess the vasculogenic activity of tumor cells. *Journal of Visualized Experiments*. 2011;(55).
125. Rosales MAB, Silva KC, Duarte DA, Rossato FA, de Faria JBL, de Faria JML. Endocytosis of tight junctions caveolin nitrosylation dependent is improved by cocoa via opioid receptor on RPE cells in diabetic conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(9):6090–100.
126. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. Vol. 20, *Journal of Laboratory Automation*. SAGE Publications Inc.; 2015. p. 107–26.
127. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54.
128. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;
129. Viollet B, Andreelli F, Jørgensen SB, Perrin C, Geloën A, Flamez D, et al. The AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;111(1):91–8.
130. Viollet B, Andreelli F, Jørgensen SB, Perrin C, Geloën A, Flamez D, et al. The AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *Journal of Clinical Investigation*. 2003 Jan 1;111(1):91–8.
131. Viollet B, Andreelli F, Jørgensen SB, Perrin C, Flamez D, Mu J, et al. Physiological role of AMP-activated protein kinase (AMPK): insights from knockout mouse models.
132. Smith LEH, Wesolowski E, Mclellan A, Kostyk SK, Robert D'amato X, Sullivan R, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. [Internet]. 1994 [cited 2022 Mar 17]. Available from: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2160821>
133. Pinto CC, Silva KC, Biswas SK, Martins N, Lopes de Faria JB, Lopes de Faria JM. Arterial hypertension exacerbates oxidative stress in early diabetic retinopathy. *Free Radic Res*. 2007 Oct;41(10):1151–8.
134. Silva KC, Rosales MAB, Hamassaki DE, Saito KC, Faria AM, Ribeiro PAO, et al. Green tea is neuroprotective in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;
135. Li J, Yu S, Ying J, Shi T, Wang P. Resveratrol prevents ROS-induced apoptosis in high glucose-treated retinal capillary endothelial cells via the activation of AMPK/Sirt1/PGC-1 α pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;
136. Xu L, Kong L, Wang J, Ash JD. Stimulation of AMPK prevents degeneration of photoreceptors and the retinal pigment epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018 Oct 9;115(41):10475–80.
137. Matoba R, Morizane Y, Shiode Y, Hirano M, Doi S, Toshima S, et al. Suppressive effect of AMP-activated protein kinase on the epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelial cells. *PLoS One*. 2017 Jul 1;12(7).

138. Joe SG, Yoon YH, Choi JA, Koh JY. Anti-angiogenic effect of metformin in mouse oxygen-induced retinopathy is mediated by reducing levels of the vascular endothelial growth factor receptor Flk-1. *PLoS One*. 2015 Mar 18;10(3).
139. Theodoropoulou S, Brodowska K, Kayama M, Morizane Y, Miller JW, Gragoudas ES, et al. Aminoimidazole Carboxamide Ribonucleotide (AICAR) Inhibits the Growth of Retinoblastoma In Vivo by Decreasing Angiogenesis and Inducing Apoptosis. *PLoS One*. 2013 Jan 3;8(1).
140. Cauchy F, Mebarki M, Leporq B, Laouirem S, Albuquerque M, Lambert S, et al. Strong antineoplastic effects of metformin in preclinical models of liver carcinogenesis. *Clin Sci*. 2017;131(1):27–36.
141. Wang JC, Li XX, Sun X, Li GY, Sun JL, Ye YP, et al. Activation of AMPK by simvastatin inhibited breast tumor angiogenesis via impeding HIF-1 α -induced pro-angiogenic factor. *Cancer Sci*. 2018 May 1;109(5):1627–37.
142. Ying Y, Ueta T, Jiang S, Lin H, Wang Y, Vavvas D, et al. Metformin inhibits ALK1-mediated angiogenesis via activation of AMPK [Internet]. 2017. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
143. Nagai N, Kubota S, Tsubota K, Ozawa Y. Resveratrol prevents the development of choroidal neovascularization by modulating AMP-activated protein kinase in macrophages and other cell types. *Journal of Nutritional Biochemistry* [Internet]. 2014;25(11):1218–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.05.015>
144. Shu DY, Butcher E, Saint-Geniez M. EMT and ENDMT: Emerging roles in age-related macular degeneration. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–26.
145. Takagaki Y, Lee SM, Dongqing Z, Kitada M, Kanasaki K, Koya D. Endothelial autophagy deficiency induces IL6 - dependent endothelial mesenchymal transition and organ fibrosis. *Autophagy*. 2020 Oct 2;16(10):1905–14.
146. Yoshimatsu Y, Wakabayashi I, Kimuro S, Takahashi N, Takahashi K, Kobayashi M, et al. TNF- α enhances TGF- β -induced endothelial-to-mesenchymal transition via TGF- β signal augmentation. *Cancer Sci*. 2020 Jul 1;111(7):2385–99.
147. Peng PH, Chieh-Yu Lai J, Hsu KW, Wu KJ. Hypoxia-induced lncRNA RP11-390F4.3 promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis through upregulating EMT regulators. *Cancer Lett* [Internet]. 2020;483(April):35–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.04.014>
148. Xiao X, Fischbach S, Zhang T, Chen C, Sheng Q, Zimmerman R, et al. SMAD3/stat3 signaling mediates beta-cell epithelial-mesenchymal transition in chronic pancreatitis-related diabetes. *Diabetes*. 2017;
149. Wang L, Tian Y, Shang Z, Zhang B, Hua X, Yuan X. Metformin attenuates the epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells through the AMPK/TGF- β /Smad2/3 signalling pathway. *Exp Eye Res*. 2021 Nov 1;212.
150. Matoba R, Morizane Y, Shiode Y, Hirano M, Doi S, Toshima S, et al. Suppressive effect of AMP-activated protein kinase on the epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelial cells. *PLoS One*. 2017 Jul 1;12(7).

151. Wu J, Rowart P, Francois Jouret X, Gassaway BM, Rajendran V, Rinehart J, et al. Mechanisms involved in AMPK-mediated deposition of tight junction components to the plasma membrane. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2020;318:486–501. Available from: www.ajpcell.org
152. Olivier S, Leclerc J, Grenier A, Viollet MFB, Tamburini J. Ampk activation promotes tight junction assembly in intestinal epithelial caco-2 cells. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 2;20(20).
153. Chen L, Wang J, You Q, He S, Meng Q, Gao J, et al. Activating AMPK to restore tight junction assembly in intestinal epithelium and to attenuate experimental colitis by metformin. *Front Pharmacol*. 2018;
154. Gaspar RC, Veiga CB, Bessi MP, Dátalo MN, Sant'Ana MR, Rodrigues PB, et al. Unsaturated fatty acids from flaxseed oil and exercise modulate GPR120 but not GPR40 in the liver of obese mice: a new anti-inflammatory approach. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2019 Apr 1;66:52–62.
155. Satapati S, Qian Y, Wu MS, Petrov A, Dai G, Wang SP, et al. GPR120 Suppresses Adipose Tissue Lipolysis and Synergizes with GPR40 in Anti-Diabetic Efficacy. *J Lipid Res* [Internet]. 2017;jlr.M075044. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28583918>
156. Fu Z, Lofqvist CA, Shao Z, Sun Y, Joyal JS, Hurst CG, et al. Dietary ω -3 polyunsaturated fatty acids decrease retinal neovascularization by adipose-endoplasmic reticulum stress reduction to increase adiponectin. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2015 Apr 1;101(4):879–88.
157. Dragano NR v., Solon C, Ramalho AF, de Moura RF, Razolli DS, Christiansen E, et al. Polyunsaturated fatty acid receptors, GPR40 and GPR120, are expressed in the hypothalamus and control energy homeostasis and inflammation. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2017;14(1):91. Available from: <http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-017-0869-7>
158. Birch EE, Carlson SE, Hoffman DR, Fitzgerald-Gustafson KM, Fu VLN, Drover JR, et al. The DIAMOND (DHA Intake and Measurement of Neural Development) Study: A double-masked, randomized controlled clinical trial of the maturation of infant visual acuity as a function of the dietary level of docosahexaenoic acid. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2010 Apr 1;91(4):848–59.
159. SanGiovanni JP, Agrón E, Meleth AD, Reed GF, Sperduto RD, Clemons TE, et al. ω -3 long-chain polyunsaturated fatty acid intake and 12-y incidence of neovascular age-related macular degeneration and central geographic atrophy: AREDS report 30, a prospective cohort study from the Age-Related Eye Disease Study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2009 Dec 1;90(6):1601–7.
160. Koto T, Nagai N, Mochimaru H, Kurihara T, Izumi-Nagai K, Satofuka S, et al. Eicosapentaenoic acid is anti-inflammatory in preventing choroidal neovascularization in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Sep;48(9):4328–34.
161. Sheets KG, Zhou Y, Ertel MK, Knott EJ, Regan CE, Elison JR, et al. Neuroprotectin D1 Attenuates Laser-induced Choroidal Neovascularization in Mouse [Internet]. 2010. Available from: <http://www.molvis.org/molvis/v16/a38>

162. Moonwiriyaakit A, Wattanaphichet P, Chatsudthipong V, Muanprasat C. GPR40 receptor activation promotes tight junction assembly in airway epithelial cells via AMPK-dependent mechanisms. *Tissue Barriers*. 2018 Apr 3;6(2):1–12.

ANEXO 1 – Certificado de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no uso de animais da UNICAMP.

CERTIFICADO CEUA nº 112/2021



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Participação da AMPK na retina em camundongos nocaute para AMPK em modelos experimentais de diabetes e retinopatia isquêmica proliferativa: estudos in vivo e in vitro.**, registrada com o nº **5710-1/2021**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. José Butori Lopes de Faria e Marcella Neves Dátilo**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **18/03/2021**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/04/2021 a 01/03/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	18/03/2021 a 01/03/2022
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / B6.129-Prkaa2tm1.1 Vio/Orl (AMPK alpha2 KO)
No. de animais:	54
Idade/Peso:	5.00 Dias / 5.00 Gramas
Sexo:	27 Machos 27 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / B6.129-Prkaa2tm1.1 Vio/Orl (AMPK alpha2 KO)
No. de animais:	54
Idade/Peso:	5.00 Dias / 5.00 Gramas
Sexo:	27 Machos 27 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / B6.129-Prkaa2tm1.1 Vio/Orl (AMPK alpha2 KO)
No. de animais:	54
Idade/Peso:	5.00 Dias / 5.00 Gramas
Sexo:	27 Machos 27 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	54
Idade/Peso:	5.00 Dias / 5.00 Gramas
Sexo:	27 Machos 27 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	54
Idade/Peso:	5.00 Dias / 5.00 Gramas
Sexo:	27 Machos 27 Fêmeas

CERTIFICADO CEUA nº 112/2021

Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	54
Idade/Peso:	5.00 Dias / 5.00 Gramas
Sexo:	27 Machos 27 Fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Unidade Multidisciplinar de Experimentação Animal - UMEA, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **01 de junho de 2021.**

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, COORDENADOR CEUA/UNICAMP**, em 02/06/2021, às 20:43 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 02/06/2021, às 09:10 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
9BBA0907 13024C3D 9E537924 2B04693E



Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código 9BBA0907 13024C3D 9E537924 2B04693E

ANEXO 2 – Política editorial da Elsevier, concedendo permissão aos autores para reprodução de seus artigos em teses e dissertações sem requisitar permissão.

Author rights

The below table explains the rights that authors have when they publish with Elsevier, for authors who choose to publish either open access or subscription. These apply to the corresponding author and all co-authors.

Author rights in Elsevier's proprietary journals	Published open access	Published subscription
Retain patent and trademark rights	✓	✓
Retain the rights to use their research data freely without any restriction	✓	✓
Receive proper attribution and credit for their published work	✓	✓
Re-use their own material in new works without permission or payment (with full acknowledgement of the original article): 1. Extend an article to book length 2. Include an article in a subsequent compilation of their own work 3. Re-use portions, excerpts, and their own figures or tables in other works.	✓	✓
Use and share their works for scholarly purposes (with full acknowledgement of the original article): 1. In their own classroom teaching. Electronic and physical distribution of copies is permitted 2. If an author is speaking at a conference, they can present the article and distribute copies to the attendees 3. Distribute the article, including by email, to their students and to research colleagues who they know for their personal use 4. Share and publicize the article via Share Links, which offers 50 days' free access for anyone, without signup or registration 5. Include in a thesis or dissertation (provided this is not published commercially) 6. Share copies of their article privately as part of an invitation-only work group on commercial sites with which the publisher has a hosting agreement	✓	✓

ANEXO 3 – Artigo original publicado como parte das atividades realizadas durante o doutorado.

Experimental Eye Research 226 (2023) 109345



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Eye Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexer



Research article

AMP kinase activation by Omega-3 polyunsaturated fatty acid protects the retina against ischemic insult: An *in vitro* and *in vivo* study

Marcella N. Dátilo, Guilherme P. Formigari, José B. Lopes de Faria, Jacqueline M. Lopes de Faria *

Renal Pathophysiology Laboratory, Investigation on Diabetes Complications, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Retinal ischemia
AMPK
Docosahexaenoic acid
Angiogenesis
Oxygen-induced retinopathy

ABSTRACT

Purpose: To investigate the possible beneficial effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω 3-PUFAs) in ischemic retinal angiogenesis and whether AMP-activated protein kinase (AMPK) is involved.

Methods: Human retinal microvascular endothelial cells (hRMECs) were exposed to dimethylxylglycine (DMOG), a hypoxia-inducible factor hydroxylase inhibitor, in the presence or absence of docosahexaenoic acid (DHA) and small interfering RNA (siRNA) for AMPK α for 24 h. Ischemic factors, endothelial mesenchymal transition marker, endothelial barrier integrity, cell migration, and tube formation were evaluated. Neonatal AMPK α ^{-/-} and control wild-type (WT) mice were submitted to an oxygen-induced retinopathy (OIR) protocol; their nursing mother mice were either fed ω 3-PUFAs or not. In the end, ischemic markers and endothelial cell proliferation were evaluated in neonatal mouse retinal tissue through immunohistochemical or immunofluorescent assays among all studied groups.

Results: Cells exposed to DMOG displayed increased expressions of hypoxic and endothelial mesenchymal transition (vimentin) markers and barrier disarrangement of Zonula Occludens-1 compared to the control, accompanied by increased cellular migration and tube formation ($p < 0.05$). AMPK activity was significantly decreased. Supplementation with DHA restored the mentioned alterations compared to DMOG ($p < 0.05$). In siRNA_{AMPK α} -treated cells, the beneficial effects observed with DHA were abolished. DHA upregulated G-protein receptor-120 (GPR120), which promptly increased intracellular levels of calcium ($p \leq 0.001$), which consequently increased Calcium/calmodulin-dependent protein kinase β expression (CaMKK β) thus phosphorylating AMPK^{Thr172}. AMPK α ^{-/-} and wild-type (WT) OIR mice exhibited similar retinal ischemic changes, and the oral supplementation with ω 3-PUFA efficiently prevented the noticed ischemic alterations only in WT mice, suggesting that AMPK α is pivotal in the protective effects of ω 3-PUFA.

Conclusions: ω 3-PUFAs protect the retina from the effects of ischemic conditions, and this effect occurs via the GPR120-CaMKK β -AMPK axis. A better understanding of this mechanism might improve the control of pathological angiogenesis in retinal ischemic diseases.

1. Introduction

Ischemic retinopathy (IR) is the late stage of several retinopathies, such as retinopathy of prematurity (ROP) (Hellström et al., 2013), diabetic retinopathy (DR) (Duh et al., 2017), age-related macular degeneration (AMD) (Campochiaro, 2015), and retinal central vein occlusion (RVO) (Phillips et al., 2005). IR is characterized by the loss of preexisting vessels and the formation of abnormal vessel proliferation into the vitreous, associated with significant visual sequelae. These visual sequelae are secondary to vitreous hemorrhage, retinal detachment, and

extensive retinal fibrotic scar, leading to blindness in infants and adults (Rivera et al., 2017; Sabanayagam et al., 2019). Mechanistically, the local high level of ischemic factors drives an increase in microvascular sprout formation with aberrant remodeling as a compensatory mechanism. The early endothelial barrier breakdown leads to profound local tissue damage, which worsens the local oxygen supply (Wilson et al., 1995), followed by the migration of endothelial cells (Gerhardt et al., 2003; Jin et al., 2014).

One of the fundamental requirements of all cell types is the balance between adenosine triphosphate consumption and generation. With this

* Corresponding author. Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária, Campinas, SP, CEP 13083-887, Brazil.
E-mail address: lopesdefariajm@gmail.com (J.M. Lopes de Faria).

<https://doi.org/10.1016/j.yexer.2022.109345>

Received 6 September 2022; Received in revised form 7 November 2022; Accepted 5 December 2022

Available online 9 December 2022

0014-4835/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

essential role, AMPK (5' AMP-activated protein kinase) is highly conserved among species as an energy sensor (Lin and Hardie, 2018). AMPK is a heterotrimeric protein composed of two regulatory (β and γ) and one catalytic subunit (α). Under low energy status, AMPK can be phosphorylated at threonine172 and activated by its upstream kinases, such as Liver Kinase B (LKB1) and Calmodulin-Dependent Protein Kinase β (CaMKK β). Once activated, AMPK restores intracellular energy by increasing catabolic pathways and decreasing anabolic pathways (Lin and Hardie, 2018). Besides energy sensing, AMPK plays an important role in intracellular homeostasis and metabolism, coordinating autophagy (Mihaylova and Shaw, 2011), and cell migration (Wang et al., 2021).

The role of AMPK in angiogenesis is complex and might be dual; thus far, no definitive findings are available (Li Y et al., 2019). Through different pathways, AMPK may promote angiogenesis. AMPK regulates fatty acid oxidation and induces phosphorylating PFKFB3, a pivotal glycolysis activator (de Bock et al., 2013). These events promote vascular sprouting, migration of tip cells, and vessel proliferation. Therefore, AMPK enhances angiogenesis through glycolysis via vascular endothelial growth factor (VEGF). Alternatively, AMPK stimulates endothelial progenitor differentiation and migration (Li et al., 2008), phosphorylating endothelial nitric oxide synthase and leading to vasodilation and angiogenesis (Zheng et al., 2010). In the context of diabetes, studies have shown that AMPK may have positive effects since ischemia and hypoxia conditions are frequent comorbidities found in patients with diabetes (Catrina and Zheng, 2021) (Fig. 1). However, the so-called positive effects of AMPK on angiogenesis are deleterious to retinal tissue because pathological retinal vascular proliferation causes retinal detachment and/or vitreous hemorrhage in its late stage.

By contrary, studies have illustrated the anti-angiogenic effects of AMPK in retinal tissue, demonstrating that AMPK in retinal tissue protects non-vascular retinal cells (neurons, glia, and pigmented epithelium) from the toxic effects of diabetes, especially inflammation and oxidative stress (Fu et al., 2016; Kim et al., 2018; Song et al., 2021), and, notably, this inhibits retinal angiogenesis. Activators of AMPK, such as Metformin and Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR), inhibit IR and retinoblastoma growth in vivo by decreasing angiogenesis and inducing apoptosis (Joe et al., 2015; Theodoropoulou et al., 2013). A proposed mechanism suggests that AMPK activation induces nuclear AMPK α_2 , suppressing HIF-1 α and VEGF (Nagai et al., 2014; Theodoropoulou et al., 2013) or its receptor and inhibiting angiogenesis in db/db mice (Yu et al., 2013). From this point of view, a better understanding of AMPK modulation is of great interest for controlling the mechanisms of angiogenesis in retinal ischemic diseases (Fig. 1).

Besides several pharmacological agonists of AMPK, such as AICAR (Lin and Hardie, 2018), A-769662 (Kim et al., 2016), metformin (Rena et al., 2017), phenformin (Faubert et al., 2015) certain nutrients are also able to increase AMPK activity. Recent evidence showed that omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω 3-PUFAs) were able to increase AMPK activity in skeletal muscle (Kim et al., 2015) and intestinal epithelial cells (Choi et al., 2019). Furthermore, the long-chain role in health and disease has been extensively studied. Clinical studies have shown the

beneficial effects of ω 3-PUFAs in different conditions, such as cognitive impairment, and Alzheimer's disease (Kotani et al., 2006), cardioprotection (Ebrahimi et al., 2009; Farrell et al., 2020), immunity and allergy (Ebrahimi et al., 2009; Lee et al., 2013), dry eye (Giannaccare et al., 2019), and multiple sclerosis (AlAmmar et al., 2021). A recent clinical trial showed that diet supplementation with arachidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid (DHA) seemed to be a promising adjuvant intervention to mitigate sight-threatening in cases of retinopathy of prematurity (Hellström et al., 2021a), and another randomized clinical trial with diabetic patients revealed that a diet supplemented with ω 3-PUFAs was associated with reduced risk of DR-related sight-threatening (A Sala-Vila et al., 2016). However, the molecular mechanism by which ω 3-PUFAs protect the retina against ischemic insults remains poorly understood.

We investigated the possible beneficial effects of ω 3-PUFAs in the early events in an ischemic retinopathy model and whether the mechanism of action could occur via AMPK activation. To this end, we used an *in vitro* model to mimic the early molecular and cellular events present in endothelial cells under ischemic conditions; for the *in vivo* study, mice knocked-down for AMPK α_2 and its genetic control were submitted to oxygen-induced retinopathy (OIR). In this study, we show that ω 3-PUFA *in vitro* decreased the expression of ischemic markers, endothelial cell migration, and tube formation and improved the intercellular barrier under hypoxic conditions; moreover, we revealed that these effects were dependent on AMPK. In the animal model, the oral supplementation of ω 3-PUFAs was retinal protective in wild-type mice but not in AMPK α_2 ^{-/-} mice. This indicates that AMPK α_2 plays a pivotal role in the beneficial retinal effects of ω 3-PUFAs under ischemic conditions.

2. Methods

2.1. *In vitro* assay

Primary human retinal microvascular endothelial cells (hRMEC - ACBRI 181) were purchased from Cell Systems (Kirkland, WA) and cultured with endothelial cell growth medium-2 (EGM-2; CC-3162; Lonza, Switzerland). Cells in passages 4–6 were used in this study. Cells at 70% confluence were submitted to normal conditions or dimethylsulfoxide (DMSO; 400 μ M; Tocris Bioscience, USA) conditions, supplemented or not supplemented with ω 3-PUFA (docosahexaenoic acid-DHA; 50 μ M; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). The concentrations used were determined based on a thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay that estimate the condition with toxicity lower than 25% (Supplementary Fig. A1).

2.2. Western blot analysis

Protein extracts from total cell lysates were subjected to SDS-PAGE in a Bio-Rad gel apparatus (Mini-PROTEAN Tetra cell; Bio-Rad, Hercules, CA) and electronically transferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were incubated with primary antibodies for anti-Phospho-AMPK α (Thr172), anti-AMPK α , anti-Phospho-ACC (Ser79), anti-ACC,

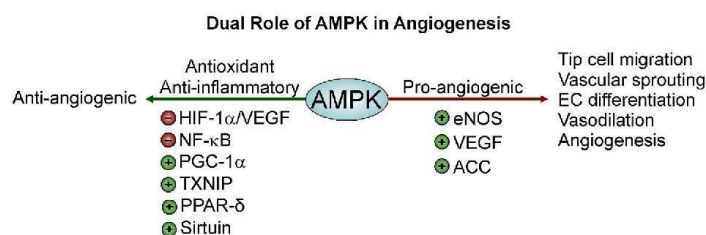


Fig. 1. Dual role of AMPK in angiogenesis. Depending on the cell type or biological system, the activation of AMPK by different upstream may lead to specific pathways. The wide range of effects of AMPK may result in angiogenesis induction through the VEGF pathway or fatty acid oxidation or inhibition via antioxidant/anti-inflammatory pathways. EC: endothelial cell; eNOS: Endothelial nitric oxide synthase; VEGF: Vascular endothelial growth factor; ACC: acetyl-CoA carboxylase; PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α ; NF- κ B: Nuclear factor kappa-B; TXNIP: thio-redoxin interacting protein; PPAR- δ : Peroxisome proliferator-activated receptor delta.

anti-Vinculin, and anti-GAPDH (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), and with the antibodies, anti-GPR120 and anti-CaMKK β (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), followed by appropriate secondary. As an internal control, the membranes were hybridized against vinculin or GAPDH (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Immunoreactive bands were visualized using the enhanced chemiluminescence method (Super Signal CL-HRP Substrate System; Pierce, IL). The membranes were scanned with a digital photodocumentator (ImageQuant LAS 500, GE; Boston, MA) and analyzed quantitatively with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). At least three independent experiments were carried out.

2.3. Transient transfection with siRNA

The duplexes of siRNA and scramble siRNA (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) corresponding to human AMPK $\alpha_{1/2}$ were transiently transfected using a lipofectamine transfection reagent (LipofectamineTM 3000, Invitrogen; Waltham, MA) in accordance with the manufacturer's instructions.

2.4. Migration assay

As previously described (Martinotti and Ranzato, 2020), to assess the cellular migration ability, a scratch wound healing assay was performed. Cells were plated in 60 mm dishes to create a confluent monolayer, after a scratch in a straight line was performed on the monolayer using a pipette tip. Thereafter, the cells were exposed to the treatments. Migration progress was evaluated through digital photographs taken at different time points using 100x magnification. At least 5 images per plate per time point were captured using a light microscope. Cell migration was calculated by subtracting the initial free area from the final free area using ImageJ; the results are expressed in square pixels (px²). This experiment was repeated three times.

2.5. Tube formation assay

A tube formation assay was performed to evaluate the angiogenesis *in vitro*. Briefly, 50 μ L of extracellular matrix (ECM) gel (E6909; Sigma Aldrich®, San Luis, MO) was added to 96-well plates and incubated for 30 min at 37 °C, as previously described (Francescone et al., 2011). Thereafter, 2×10^5 cells/mL were seeded onto a hardened ECM culture at 37 °C for 6 h. Cells were observed in an inverted microscope using 100x magnification and 4 different fields per well were randomly selected, photographed using AxioVision software (Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany), and quantified using ImageJ software.

2.6. Measurement of endothelial electrical resistance (TEER)

TEER was performed as previously described (Rosales et al., 2014b; Srinivasan et al., 2015). Briefly, 8×10^4 hRMECs were seeded onto a polyester filter membrane of a transwell device (24-well format, 0.4 mm pore size; Corning Inc., NY). Cells were cultured for 7 days, and the respective treatments were performed as described. The TEER values were measured using a voltmeter (Millicell-ERS; Millipore, Burlington, MA). Three different samples with three reproducible measurements in each condition were considered. Values were expressed in ohms and corrected by the area of the polyester membrane (ohms/cm²) subtracted from the blank (polyester membrane only).

2.7. Measurement of intracellular Ca²⁺

As done previously (Kim et al., 2015), Ca²⁺ concentration was measured by fluorescence of Ca²⁺ sensitive indicator Fluo 3-AM (73881; Sigma Aldrich®, San Luis, MO) under a fluorescence microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) with 5 μ M of Fluo 3-AM for 30 min at 37 °C. Plates were observed at 420x magnification and the signal detected was

at an excitation of 488 nm. The images were captured from time 0–45 s using AxioVision software, and fluorescence intensity was measured using ImageJ software. Cells under ischemic conditions were previously exposed to DMOG for 24h, and at the time of signal fluorescence observation, DHA (50 μ M) was added to the cell medium.

2.8. In vitro immunofluorescence

Plates were fixed using a pre-cooled methanol for 15 min. They were then incubated with anti-HIF-1 α (NB100-105; Novus Biologicals, Littleton, CO), anti-HIF-2 α (NB100-22; Novus Biologicals, Littleton, CO), anti-VEGF α (ab1316; Abcam, Cambridge, UK), anti-vimentin (ab92547; Abcam, Cambridge, UK), and anti-ZO-1 (33-9100; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) overnight at 4 °C, followed by incubation with Alexa Fluor-595-labeled secondary antibody. Antifade with DAPI was used as a mounting medium. Images were examined under a fluorescence microscope (Zeiss) using 420x magnification, and images were captured using AxioVision software. At least three independent experiments were performed.

2.9. Animal model and experimental design

The protocols employed were approved by the local animal research ethics committee of the multidisciplinary center for biological research at the State University of Campinas (Protocol 5710-1/2021) in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The generation and genetically modified mouse employed in this study was previously characterized (Violet et al., 2003). The animals were housed under a controlled temperature (22 ± 2 °C), with 12 h of light and 12 h of dark and had free access to water and a standard mouse chow diet (Nuvilab®, Quimtia, Colombo, BR).

The oxygen-induced retinopathy (OIR) model (Smith et al., 1994) was used with some modifications: mouse pups (AMPK α_2 ^{-/-} and the genetic control C57BL/6J), and their nursing mothers were exposed to a hyperoxic chamber (75% O₂) for 5 consecutive days from postnatal day 7 (P7) to postnatal day 12 (P12). At P12, animals were returned to room air and kept there until P17 when a pathological neovascularization response in the retina reached its maximum response (Smith et al., 1994). The control animals were kept in room air from P0 until P17 (Fig. 2).

2.10. ω 3-PUFAs supplementation

The nursing mother mice were fed *ad libitum* with a standard rodent diet and supplemented with 50 μ L of oil rich in ω 3-PUFAs (240 mg/g of DHA and 360 mg/g of eicosapentaenoic acid [EPA]; Essentia Pharma, Florianópolis, BR) by oral gavage. This dose corresponds to 2% of the lipid fraction ingested daily (Connor et al., 2007). The oral

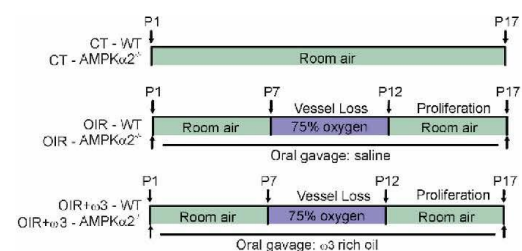


Fig. 2. Experimental design of oxygen-induced retinopathy used for neonatal AMPK α_2 ^{-/-} and their control mice in which their nursing mother mice were fed or not fed ω 3-PUFAs.

supplementation was performed from P1 until P17. The control group received 50 μ L of saline by oral gavage. Two nursing mother mice were submitted to each experimental group, and at least 10 pups in each group were studied. All the experiments include both male and female pups.

2.11. Immunohistochemistry/immunofluorescence in mice retinal sections

Immunohistochemistry immunofluorescence was performed as previously described (Pinto et al., 2007; Rosales et al., 2014a,b). Retinal sections were incubated with primary antibody anti-HIF-1 α (NB100-105, Novus Biologicals, Littleton, CO), anti-VEGF α (ab1316; Abcam, Cambridge, UK), or anti-Isolectin GS-IB4 (I21411, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) overnight at 4 °C, followed by incubation with appropriated secondary antibodies (Dako, Glostrup, Denmark). Images were examined under a light or fluorescence microscope (Zeiss) using 420x magnification, and images were captured using AxioVision software. Retinal positivity of HIF-1 α , VEGF, and IB4 was measured with ImageJ software in 5 images per retinal section of at least 5 non-consecutive retinal slides for each animal.

2.12. Statistical analysis

The data represent the mean $\pm$ standard deviation (SD). The comparisons between the groups were assessed by a one-way analysis of variance, followed by Fisher's post hoc test. GraphPad Prism® 6 software was used for all comparisons. Any p-value less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. hRMEC alterations in the ischemic environment

DMOG is a pro-ischemic compound that inhibits the activity of the enzyme prolyl hydroxylase domain (PHD), which is responsible for the degradation of HIF (Zhdanov et al., 2015). The stimulation of hRMECs with DMOG (400 μ M) for 24 h induced increased expression of VEGF and HIF-1 α as well as nuclear translocation of HIF-2 α , demonstrating that DMOG is an ischemic agent in the *in vitro* model. In addition, hRMECs treated with DMOG developed a phenotype of endothelial mesenchymal transition (EndMT) with increments in cell migration and vimentin expression accompanied by disarrangement of ZO-1 expression in the intercellular barrier (Fig. 3A and B).

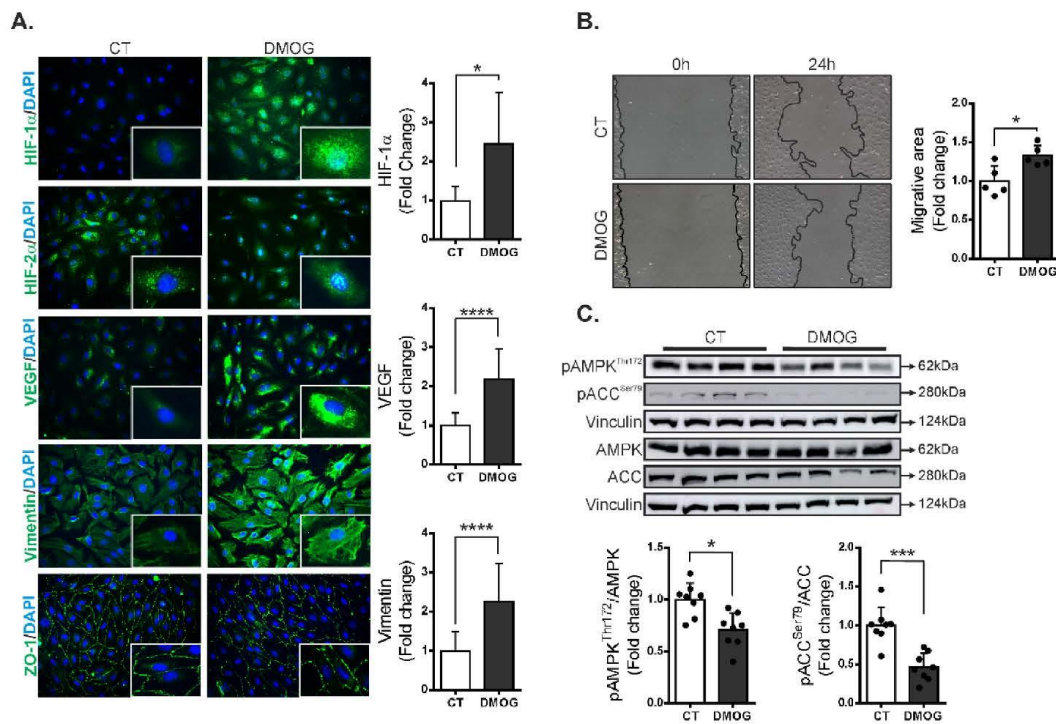


Fig. 3. DMOG stimulus induces ischemic changes accompanied by an increment of endothelium mesenchymal transition (EMT) marker and disarrangement of the intercellular barrier in hRMECs. (A) A representative photomicrograph and semiquantitative analysis of HIF-1 α , HIF-2 α , VEGF, vimentin, and ZO-1 immunofluorescences in hRMECs cultured for 24 h under DMOG conditions. Magnification 420 $\times$. The bars represent the mean $\pm$ SD of positive cells corrected by the total number of cells expressed as the percentage of variation relative to control positive cells in 5 different fields in each plate. (B) Representative photomicrograph and quantification of the migrative area of endothelial cellular migration. Magnification 100 $\times$. The bars represent the mean $\pm$ SD of migrative area variation relative to control in at least three independent experiments. (C) Representative protein expressions were evaluated by Western blotting assays and densitometric analysis of AMPK^{Thr172}/AMPK and pACC^{Ser79}/ACC, both normalized by the internal control vinculin in hRMECs exposed to DMOG for 24 h. The bars represent the mean $\pm$ SD of band densities expressed in arbitrary units as the percentage of variation relative to control in at least three independent experiments. **p* < 0.05; ****p* < 0.001; *****p* < 0.0001 by Student's test.

hRMECs exposed to DMOG showed a decrease in the expression of AMPK^{Thr172} ($p < 0.05$) and ACC^{Ser79} ($p < 0.001$) compared to the control condition (Fig. 3C), indicating a decrease in AMPK activity. Taken together, this set of results indicates that the hypoxia condition promoted by DMOG exposure induces an augment of ischemic factors and EndMT markers accompanied by disarrangement of the intercellular barrier, which is associated with a significant decrease in AMPK activity.

3.2. Protective effects of DHA on hRMECs under ischemic conditions are dependent on AMPK

Thereafter, hRMECs were exposed to DHA under ischemic conditions. In the DMOG + DHA group, DHA was able to decrease expressions of HIF-1 α ($p < 0.0001$) and VEGF ($p < 0.001$) when compared to DMOG (Fig. 4A). In addition, DMOG + DHA also reduce nuclear expression of HIF-2 α when compared to DMOG. After that, we evaluated angiogenesis *in vitro*. DMOG increased tube formation, both in tube length ($p < 0.05$) and in the number of nodes ($p < 0.05$) when compared to the control (Fig. 4B). On the other hand, DHA treatment under ischemic conditions reduced tube formation and promoted by DMOG ($p < 0.001$ for length and nodes) (Fig. 4B). To assess the possible role of AMPK in ischemic molecular events, hRMECs were treated with siRNA_{AMPK}, which reduced protein expression of AMPK in 70% when compared to CT. The reduction of AMPK α expression also promoted decreased phosphorylation at Ser⁷⁹ of ACC, a downstream of AMPK, indicating a reduction in AMPK activity under silencing (Supplementary Fig. B1). The beneficial effects of DHA in DMOG conditions were abolished under AMPK α silencing ($p < 0.001$; $p < 0.01$; $p < 0.05$; and $p < 0.05$ for expressions of HIF-1 α , HIF-2 α , VEGF, tube length, and number of nodes, respectively, for comparisons between the DMOG + DHA and the siRNA_{AMPK} + DMOG + DHA groups) (Fig. 4).

The EndMT alterations (vimentin expression and cell migration) and ZO-1 disarrangement present in cells exposed to DMOG conditions were prevented with DHA treatment when compared to DMOG (Fig. 5A and B). These observed effects of DHA under DMOG conditions were not present in siRNA_{AMPK} cells (Fig. 5A and B). To evaluate intercellular barrier function, the TEER assay was performed. After 24 h of hypoxia, there was a massive reduction in TEER in all DMOG-treated groups

($p < 0.0001$ vs. control). At 48 h, the deleterious effect of DMOG was sustained ($p < 0.0001$ vs. CT). The presence of DHA prevented the further decrease of TEER ($p < 0.05$ DMOG + DHA vs. DMOG alone) but not in cells treated with siRNA_{AMPK} ($p < 0.05$, DHA vs. siAMPK α +DMOG + DHA) (Fig. 5C). These results indicate that DHA partially protected the barrier function under hypoxia conditions and that this effect was partially dependent on AMPK.

3.3. DHA restores AMPK activity in hRMECs through the G-protein-receptor-calcium calmodulin kinase kinase pathway

Previous research has demonstrated that AMPK can be activated by DHA through G-protein receptor 120 (GR120) (Kim et al., 2015). In our study, we evaluated the phosphorylation of AMPK^{Thr172} in cells exposed to DMOG and supplemented with DHA for 24 h. DHA restored AMPK^{Thr172} phosphorylation ($p < 0.05$). To better understand the mechanism by which DHA improves AMPK, we addressed the GPR120-CamKK β axis, a canonical upstream of AMPK signaling. The treatment with DHA increased GPR120 ($p < 0.001$) and CamKK β ($p < 0.05$) expressions under ischemic conditions compared with DMOG (Fig. 6A). Treatment with DHA in cells under ischemia increased intracellular Ca²⁺ ($p < 0.01$), which in turn upregulated CamKK β (Fig. 6B). This cascade of events demonstrates the intracellular signaling by which DHA activates AMPK in endothelial retinal cells under ischemic conditions.

3.4. Deletion of AMPK α_2 impedes the beneficial effects of ω 3-PUFAs on the oxygen-induced retinopathy model

To evaluate the potential benefits of ω 3-PUFAs in protecting the retina from the insult of ischemia, we submitted mouse pups to the OIR model. In this study, nursing mice from AMPK α_2 ^{-/-} and its genetic control WT strains were randomized to receive or not receive 50 μ l of oral supplementation of ω 3-rich oil from P1 to P17. The confirmation of AMPK α_2 deletion is demonstrated in Supplementary Fig. C1.

The OIR-WT mice showed increased endothelial cell numbers in the ganglion cell layer compared to the CT-WT group, similarly, as seen among OIR-AMPK α_2 ^{-/-} animals. It is possible to observe cell clumps

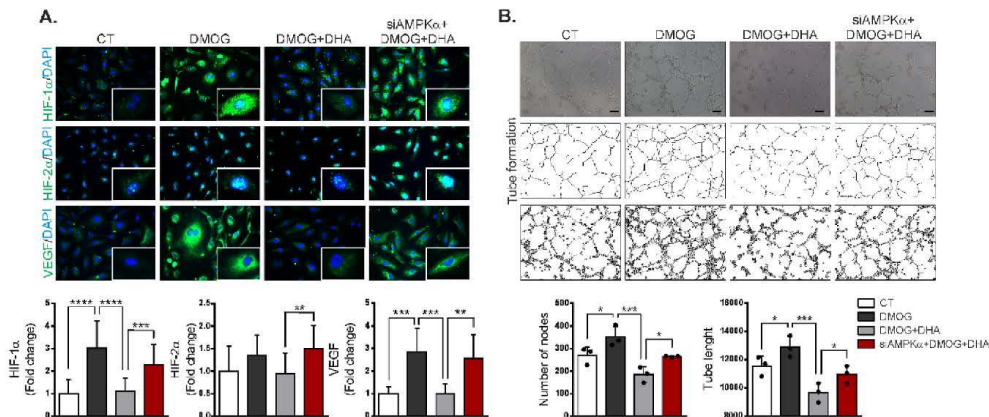


Fig. 4. The beneficial effects of DHA on ischemia in hRMECs were dependent on AMPK. (A) A representative photomicrograph and semiquantitative analysis of HIF-1 α , HIF-2 α , and VEGF immunofluorescences of hRMECs exposed for 24 h to DMOG and DMOG + DHA under silencing or not of AMPK α for 24 h. Magnification 420 $\times$. The bars represent the mean $\pm$ SD of positive cells corrected by the total number of cells expressed as the percentage of variation relative to control positive cells in 5 different fields in each plate. (B) Phase contrast photomicrograph of endothelial tube formation in each studied condition, followed by angiogenesis analysis and binary transformation using ImageJ software. Magnification 100 $\times$. Quantitative analysis of tube length and the number of nodes of endothelial tube formation in all tested conditions was conducted. The bars represent the mean $\pm$ SD in three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ by Fisher's test.

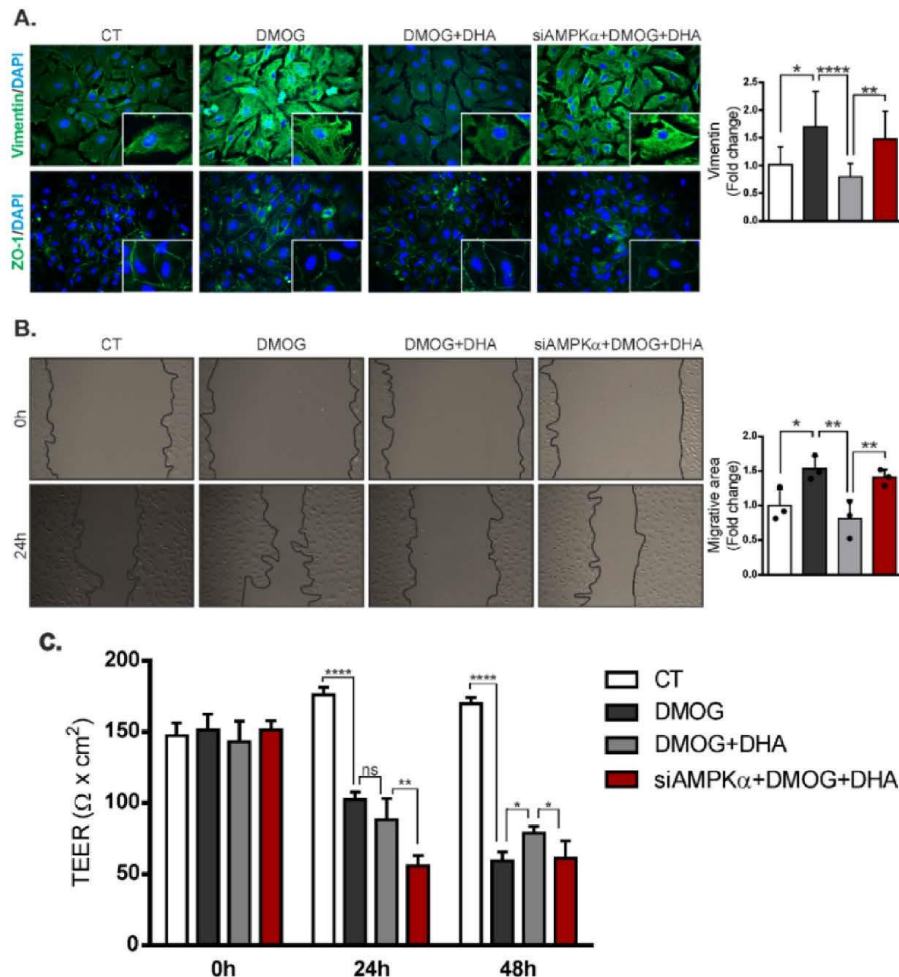


Fig. 5. The beneficial effects of DHA on mesenchymal transition and barrier function in hRMECs were dependent on AMPK α . (A) A representative photomicrograph and semiquantitative analysis of vimentin and ZO-1 immunofluorescence in hRMECs exposed for 24 h to DMOG and DMOG + DHA in cells under siRNA_{AMPK α} or not for 24 h. Magnification 420 $\times$. The bars represent the mean $\pm$ SD of positive cells corrected by the total number of cells expressed as the percentage of variation relative to control positive cells in 5 different fields in each plate. (B) Cellular migration and quantification of migrative area hRMECs exposed for 24 h to DMOG and DMOG + DHA in cells under siRNA_{AMPK α} or not. Magnification 100 $\times$. The bars represent the mean $\pm$ SD of migrative area variation relative to control in three independent experiments. (C) TEER is expressed in $\Omega \times \text{cm}^2$. The bars represent the mean $\pm$ SD of measurements at 0, 24, and 48 h in each condition. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns = not significant by Fisher's test.

invading the inner limiting membrane from the ganglion cell layer toward the vitreous. In pups whose nursing mothers were supplemented with ω 3-PUFAs, there was a clear reduction in the number of endothelial cells in the ganglion cell layer among OIR-WT mice but not in OIR AMPK α 2/ mice (Fig. 7A).

HIF-1 α and VEGF expressions evaluated by immunohistochemistry were shown to have increased in all retinal cell layers ($p < 0.01$ and $p < 0.0001$ vs. control, respectively). For pups whose nursing mothers were supplemented with ω 3-PUFAs, there was a significant reduction in retinal staining of HIF-1 α and VEGF among OIR-WT mice ($p < 0.01$ and

$p < 0.0001$, respectively) but not among OIR- AMPK α 2/ mice ($p = 0.3$ and $p = 0.3$, respectively). No beneficial effects were observed in AMPK α 2/ pups whose nursing mothers were supplemented with ω 3-PUFA (Fig. 6A and B). Isolectin B4 (IB4), a marker of endothelial cells, displayed the same pattern: in the control condition, retinal sections from either WT or AMPK α 2/ pups showed mild staining of IB4+ located at the nerve fiber layer (NFL), corresponding to the superficial vascular plexus (SVP). In both mouse strains submitted to the OIR model, IB4+ was abundantly found at the NFL, inner plexiform layer (IPL), and outer plexiform layer (OPL), corresponding to the superficial, intermediate,

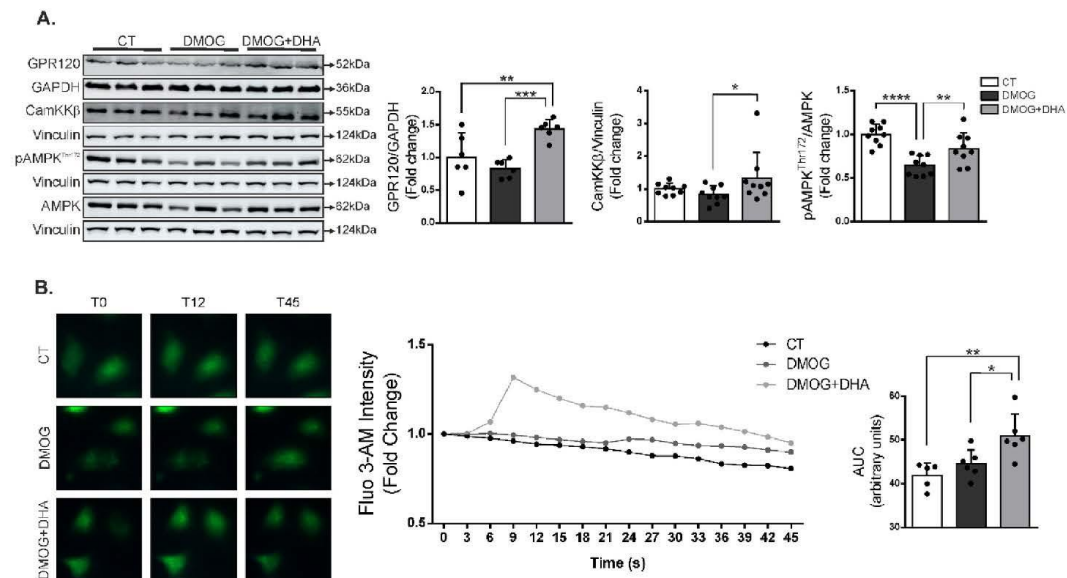


Fig. 6. DHA restores the phosphorylation of AMPK in hRMECs under hypoxia. (A) Representative Western blotting assay and densitometric analysis of GPR120, CamKKβ, AMPK^{Thr172}/AMPK normalized by the internal control vinculin in lysates of hRMECs exposed to DMOG and DMOG + DHA for 24 h. The bars represent the mean ± SD of band densities expressed in arbitrary units as the percentage of variation relative to control in at least three independent experiments. (B) Representative images of Fluo 3-AM loaded-hRMECs exposed to CT and DMOG for 24 h. The supplementation of DHA (50 μM) was done prior to starting the time course of fluorescence images up to 45 s. Magnification 420×. Area Under the Curve (AUC) was calculated in order to compare intracellular calcium influx in each condition by fluorescence microscope. The bars represent the mean ± SD expressed in arbitrary units. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; *****p* < 0.0001 by Fisher's test.

and deep vascular plexuses, indicating an increase and diffuse retinal neovascular proliferation. In OIR+ω3 WT pups, IB4+ cells were restricted to the SVP, as seen in the CT condition. These effects were not observed among the OIR+ω3-AMPKα₂^{-/-} group, which demonstrates the role of AMPK in ω3-PUFA's beneficial retinal effect (Fig. 7A and B).

4. Discussion

A better understanding of the early cellular and molecular mechanisms of retinal neovascularization is needed to control this devastating end stage of diverse ischemic retinal diseases. In this study, we showed that ischemic milieu conditions led to increased expressions of hypoxic markers, EndMT, and intercellular barrier disarrangement of ZO-1 as well as increased cell migration and tube formation in human endothelial retinal cells. Additionally, the *in vitro* model of hypoxia decreased AMPK activity, as evaluated through pAMPK^{Thr172} and pACC^{Ser79}. The supplementation with DHA prevented these abnormalities by restoring AMPK activity via its canonical pathway. DHA upregulated the expression of its receptor GPR120, followed by intracellular Ca²⁺ influx, which in turn, upregulated CamKKβ. The beneficial effects of DHA observed under hypoxic conditions were not present in cells treated with siRNA^{AMPKα}, revealing the pivotal role of AMPK in the DHA mechanism. In mice submitted to the OIR model, oral supplementation with ω3-PUFA was efficient in preventing ischemic vascular retinal alterations among wild-type mice but not among AMPKα₂^{-/-} mice, indicating that AMPKα₂ plays an important role in the protective effects of ω3-PUFA on pathological retinal angiogenesis.

The novelty of this study relies on the evidence of the AMPK activation, especially the retinal isoform α₂, as a pivotal player in the observed beneficial effects of diet supplementation of ω3-PUFAs in ischemic retinal conditions. The control of pathological retinal

neovascularization is a clinical challenge found in patients with late-stage diabetic retinopathy, exudative macular degeneration, retinal vein obstruction, and in premature newborns with a high risk to develop retinopathy of prematurity.

The inhibition or activation of AMPK affects several pathological processes in ocular diseases. Previous reports showed that AMPK activation by AICAR in retinal pigmented epithelial (RPE) cells reduced EMT and, in Müller cells, attenuated apoptosis (Chen et al., 2018). The AMPK activation promoted by metformin prevents the degeneration of photoreceptors and of RPE *in vivo* (Xu et al., 2018). In spontaneous diabetic and obese mice (db/db mice), a diet with wolfberry increased AMPK^{Thr172} phosphorylation and nuclear translocation of AMPKα₂, leading to a decrease in HIF-1α and VEGF expressions (Yu et al., 2013). Paradoxically, the beneficial effect of fenofibric acid in the maintenance of retinal pigmented epithelial (RPE) cell barrier *in vitro* in presence of interleukin-1β was associated with decreased AMPK^{Thr172} (Villarreal et al., 2011). A study by Higuchi and colleagues also demonstrated a reduction of retinal pathological angiogenesis through an adiponectin-dependent pathway correlated with the PPARα-AMPK axis (Higuchi et al., 2010). In the OIR model, treatment with metformin suppresses the activity of the VEGF receptor FLK-1 (Joe et al., 2015). Interestingly, AMPK activation has also been shown to be beneficial in cancer development. Activation of AMPK by metformin, AICAR, or simvastatin diminishes tumor growth by controlling tumor angiogenesis (Cauchy et al., 2017; Theodoropoulou et al., 2013). Simvastatin, a drug that lowers lipid levels, has been shown to control breast tumor growth by attenuating angiogenesis via downregulating HIF-1α and the downstream pro-angiogenic factor VEGF (Wang et al., 2018). To the best of our acknowledgment, this is the first study to address the role of AMPKα₂ in the mechanism of retinal protection against ischemic insults.

ω3-PUFAs, such as eicosapentaenoic acid (EPA) and DHA, are widely

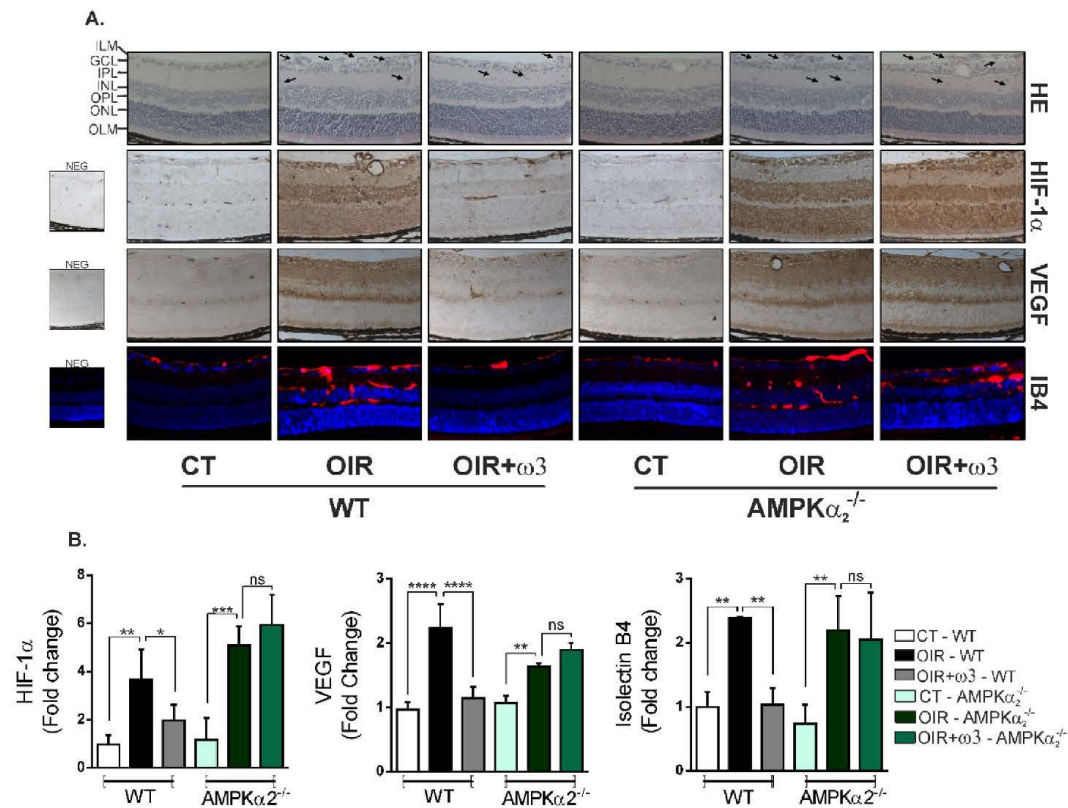


Fig. 7. Deletion of AMPK α 2 impedes the beneficial effects of ω -3 PUFAs on the retinas of mice submitted to the oxygen-induced retinopathy model. (A) A representative photomicrograph of retina sections stained with HE and retinal immunohistochemistry or fluorescence staining for HIF-1 α , VEGF, and IB4⁺ proteins in all studied groups. Magnification 420 $\times$. (B) Semiquantitative analysis of HIF-1 α , VEGF immunohistochemistry, and IB4⁺ immunofluorescence. The bars represent the mean $\pm$ SD expressions as the percentage of variation relative to the control. ILM: Inner limiting membrane; GCL: Ganglion cell layer; IPL: Inner plexiform layer; INL: Inner nuclear layer; OPL: Outer plexiform layer; ONL: Outer nuclear layer. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001; ns non-significant by Fisher's test.

distributed throughout the body, especially in cell membranes in the brain (Sun et al., 2018) and retina (SanGiovanni and Chew, 2005). Several mechanisms by which ω -3-PUFAs exert anti-inflammatory effects were described, such as reduction in leukocyte tracking (Serhan, 2014), inflammatory cells (CD4, CD8, and CD11b) (Li et al., 2021), and cytokine levels (Li et al., 2014). Additionally, studies in the literature have stated that some anti-inflammatory effects promoted by ω -3-PUFAs are mediated by GPR120 (Dátalo et al., 2018; Oh et al., 2010, 2014). However, the mechanisms triggered by ω -3-PUFAs are not fully understood. The identification of these bioactive effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids has opened a new field of investigation.

In vivo and clinical studies demonstrate that supplementation with ω -3-PUFAs coordinates anti-angiogenic and neuroprotective mechanisms in the retina, which can ameliorate ischemia (Connor et al., 2007; Georgiou et al., 2017), inflammation (Dátalo et al., 2018), oxidative stress (Johansson et al., 2015), and neurodegeneration (Kalogerou et al., 2022; Osada et al., 2021) in several models of retinal disease. Moreover, studies from Prokopiou and colleagues have shown the potential retinal neuroprotective effect of oral supplementation in different experimental models of ocular diseases such as dry macular degeneration (Georgiou and Prokopiou, 2015; Prokopiou et al., 2017), Stargardt disease

(Prokopiou et al., 2018), Anterior Ischemic Optic Neuropathy and hereditary glaucoma (Kalogerou et al., 2018). In this context, clinical trials have indicated that infants with higher serum levels of DHA are associated with less severe ROP (Hellström et al., 2021c). Moreover, supplementation with oil containing DHA and arachidonic acid in the initial postnatal months reduces severe ROP in infants by 50% (Hellström et al., 2021b). Of great relevance is the consortium *Prevención con Dieta Mediterránea* (PREDIMED). The prospective randomized controlled study aiming to test the efficiency of the Mediterranean diet, which is rich in ω -3-PUFAs, as a primary intervention against cardiovascular disease, also revealed the efficiency of this ω -3-PUFAs rich diet in protecting from sight-threatening at middle age and older individuals with diabetes. In type 2 diabetic patients, intake of 500 mg/d of ω -3-PUFAs reduces by 46% the risk of sight-threatening diabetic retinopathy. (Sala-Vila et al., 2016). This present work contributes to the knowledge of the mechanism of action by which the ω -3-PUFAs exert their beneficial effect against ischemic injury in retinal tissue.

5. Conclusions

In conclusion, the present study demonstrated, either in human

endothelial retinal cells or in an experimental ischemic retinopathy model induced by oxygen, that AMPK α activation by ω 3-PUFA was efficient in preventing the intracellular cascade evoked by the ischemic milieu. DHA, through GPR120, induces intracellular calcium influx, which subsequently activates CamKK β /AMPK axis, a canonical upstream of AMPK signaling, reducing HIF-1 α and nuclear translocation of HIF-2 α and diminishing VEGF expressions thus abrogating the ischemic insults. This evidence may be relevant as a new therapeutic tool for controlling pathological angiogenesis in ischemic retinal diseases.

Author contributions

M.N.D. and G.P.F. performed the experiments; J.B.L.F. and J.M.L.F. interpreted the results of the experiments; M.N.D. prepared the figures; M.N.D. and J.M.L.F. drafted the manuscript; M.N.D., G.P.F., J.B.L.F., and J.M.L.F. approved the final version of the manuscript; M.N.D., G.P.F., J.B.L.F., and J.M.L.F. analyzed the data; J.M.L.F. conceived and designed the research; J.M.L.F. edited and revised the manuscript.

Funding information

This work was supported by Sao Paulo State Research Support Foundation (FAPESP, grant number 2014/22687-0); M.N.D. received a scholarship from FAPESP (2018/07398-3); G.P.F. received a scholarship from Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES) (8888.2434910/20019-01) and J.B.L.F. was awarded by The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) which partially funded this work.

Declaration of competing interest

The authors declare no competing interests in this study.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

We would like to thank Ms. Antonio Ramos Calixto and Ms. Nilza Alzira Batista for their technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.exer.2022.109345>.

References

- Alammar, W.A., Albeesh, F.H., Ibrahim, L.M., Algindan, Y.Y., Yamani, L.Z., Khattab, R. Y., 2021. Effect of omega-3 fatty acids and fish oil supplementation on multiple sclerosis: a systematic review. *Nutr. Neurosci.* 24, 569–579. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1659560>.
- Campochiaro, P.A., 2015. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases. *Prog. Retin. Eye Res.* 49, 67–81. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.06.002>.
- Catrina, S.-B., Zheng, X., 2021. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in diabetes and its complications. *Diabetologia* 64 (4), 709–716. <https://doi.org/10.1007/s00125-021-05380-z> (Published).
- Cauchy, F., Mebarki, M., Leporq, B., Laouirem, S., Albuquerque, M., Lambert, S., Bourgoin, P., Soubrane, O., van Beers, B.E., Faivre, S., Bedossa, P., Paradis, V., 2017. Strong antineoplastic effects of metformin in preclinical models of liver carcinogenesis. *Clin. Sci.* 131, 27–36. <https://doi.org/10.1042/CS20160438>.
- Chen, H., Ji, Y., Yan, X., Su, G., Chen, L., Xiao, J., 2018. Berberine attenuates apoptosis in rat retinal Müller cells stimulated with high glucose via enhancing autophagy and the AMPK/mTOR signaling. *Biomed. Pharmacother.* 108, 1201–1207. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.140>.
- Choi, J.W., Lee, J., Lee, J.H., Park, B.J., Lee, E.J., Shin, S., Cha, G.H., Lee, Y.H., Lim, K., Yuk, J.M., 2019. Omega-3 polyunsaturated fatty acids prevent *Toxoplasma gondii* infection by inducing autophagy via AMPK activation. *Nutrients* 11, 2137. <https://doi.org/10.3390/nu11092137>.
- Connor, K.M., Sangiovanni, J.P., Loïqvist, C., Aderman, C.M., Chen, J., Higuchi, A., Hong, S., Pravda, E.A., Majchrzak, S., Carper, D., Hellstrom, A., Kang, J.X., Chew, E. Y., Salem, N., Serhan, C.N., Smith, L.E.H., 2007. Increased dietary intake of ω -3 polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat. Med.* 13, 868–873. <https://doi.org/10.1038/nm1591>.
- Dátalo, M.N., Sant'Ana, M.R., Formigari, G.P., Rodrigues, P.B., de Moura, L.P., da Silva, A.S.R., Ropelle, E.R., Pauli, J.R., Cintra, D.E., 2018. Omega-3 from flaxseed oil protects obese mice against diabetic retinopathy through GPR120 receptor. *Sci. Rep.* 8, 14318. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32553-5>.
- de Bock, K., Georgiadou, M., Schoors, S., Kuchnio, A., Wong, B.W., Cantelmo, A.R., Quaegebeur, A., Ghesquiere, B., Cauwenberghs, S., Eelen, G., Phng, L.K., Betz, I., Tembuyser, B., Brepods, K., Welt, J., Gendens, L., Segura, I., Cruys, B., Bifari, F., Decimo, I., Blanco, R., Wyns, S., Vangindertael, J., Rocha, S., Collins, R.T., Munck, S., Dademans, D., Imamura, H., Devlieger, R., Rider, M., van Veldhoven, P. P., Schuit, F., Bartrons, R., Hoekens, J., Fraidi, P., Telang, S., Deberardinis, R.J., Schoonjans, L., Vinckier, S., Chesney, J., Gerhardt, H., Dewerchin, M., Carmeliet, P., 2013. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell* 154 (3), 651–663. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.037>.
- Duh, E.J., Sun, J.K., Stitt, A.W., 2017. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI Insight* 2 (14), e93751. <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.93751>.
- Ebrahimi, M., Ghayour-Mobarghan, M., Rezaiean, S., Hoseini, M., Parizade, S.M.R., Farhadi, F., Hosseini-neshad, S.J., Tavallaei, S., Vejdani, A., Azimi-Nezhad, M., Shakeri, M.T., Rad, M.A., Mobarra, N., Kazemi-Bajestani, S.M.R., Ferns, G.A.A., 2009. Omega-3 fatty acid supplements improve the cardiovascular risk profile of subjects with metabolic syndrome, including markers of inflammation and autoimmunity. *Acta Cardiol.* 64, 321–327. <https://doi.org/10.2143/ac.64.3.2038916>.
- Farrell, S.W., Defina, L.F., Tindle, N., Barlow, C.E., Leonard, D., Haskell, W.L., Berry, J. D., Willis, B.L., Pavlovic, A., Harris, W.S., 2020. Higher omega-3 index is associated with more rapid heart rate recovery in healthy men and women. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 163, 102206. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2020.102206>.
- Faubert, B., Vincent, E.E., Poffenberger, M.C., Jones, R.G., 2015. The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: many faces of a metabolic regulator. *Cancer Lett.* 356, 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.canl.2014.01.018>.
- Francescone, R.A., Faibish, M., Shao, R., 2011. A matrigel-based tube formation assay to assess the vasculogenic activity of tumor cells. *JoVE* (55), 3040. <https://doi.org/10.3791/3040>.
- Fu, D., Yu, J.Y., Connell, A.R., Yang, S., Hookham, M.B., McLeese, R., Lyons, T.J., 2016. Beneficial effects of berberine on oxidized LDL-induced cytotoxicity to human retinal Müller cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57, 3369–3379. <https://doi.org/10.1167/iov.16-19291>.
- Georgiou, T., Prokopiou, E., 2015. The new era of omega-3 fatty acid supplementation: therapeutic effects on dry age-related macular degeneration. *J. Stem Cell.* 10, 205–215. <https://doi.org/10.1136/bmjophth-2016-000056>.
- Georgiou, T., Wen, Y.-T., Chang, C.-H., Kolovos, P., Kalogerou, M., Prokopiou, E., Neokleous, A., Huang, C.-T., Tsai, R.-K., 2017. Neuroprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids in a rat model of anterior ischemic optic neuropathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58, 1603–1611. <https://doi.org/10.1167/iov.16-20979>.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Landkvist, A., Abramson, A., Jøtisch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., Betsholtz, C., 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* 161, 1163–1177. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302047>.
- Giannaccare, G., Pellegrini, M., Sebastiani, S., Bernabei, F., Roda, M., Taroni, L., Versura, P., Campos, E.C., 2019. Efficacy of omega-3 fatty acid supplementation for treatment of dry eye disease: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Cornea* 38, 565–573. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001884>.
- Hellström, A., Nilsson, A.K., Wackernagel, D., Pivodic, A., Vanpee, M., Sjöborn, U., Hellgren, G., Hallberg, B., Domellöf, M., Nèvebro, S., Hellström, W., Andersson, M., Lund, A.M., Löfquist, C., Bivén, A., Sävman, K., Hansen-Pupp, I., Hård, A.L., Smith, L.E.H., Ley, D., 2021b. Effect of enteral lipid supplement on severe retinopathy of prematurity: a randomized clinical trial. *JAMA Pediatr.* 175, 359–367. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2020.5653>.
- Hellström, A., Pivodic, A., Gräse, L., Landgren, P., Sjöborn, U., Nilsson, A.K., Söderling, H., Hård, A.L., Smith, L.E.H., Löfquist, C.A., 2021c. Association of docosahexaenoic acid and arachidonic acid serum levels with retinopathy of prematurity in preterm infants. *JAMA Netw. Open* 4 (10), e2128771. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.28771>.
- Hellström, A., Smith, L.E.H., Dammann, O., 2013. Retinopathy of prematurity. *Lancet* 382, 1445–1457. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60178-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60178-6).
- Higuchi, A., Ohashi, K., Shibata, R., Sono-Romanelli, S., Walsh, K., Ouchi, N., 2010. Thiazolidinediones reduce pathological neovascularization in ischemic retinas via an adiponectin-dependent mechanism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 46–53. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.198465>.
- Jin, Y., Kaluza, D., Jakobsson, L., 2014. VEGF, Notch and TGF β /BMPs in regulation of sprouting angiogenesis and vascular patterning. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1576–1583. <https://doi.org/10.1042/BSI20140231>.
- Joe, S.G., Yoon, Y.H., Choi, J.A., Koh, J.Y., 2015. Anti-angiogenic effect of metformin in mouse oxygen-induced retinopathy is mediated by reducing levels of the vascular endothelial growth factor receptor Flk-1. *PLoS One* 10 (3), e0119708. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119708>.
- Johansson, I., Monsen, V.T., Pettersen, K., Miltenberger, J., Misund, K., Kaarniranta, K., Schenck, S., Bjerkoy, G., 2015. The marine n-3 PUFA DHA evokes cytoprotection against oxidative stress and protein misfolding by inducing autophagy and NFE2L2

- in human retinal pigment epithelial cells. *Autophagy* 11, 1636–1651. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1061170>.
- Kalogerou, M., Ioannou, S., Kolovos, P., Prokopiou, E., Potamiti, L., Kyriacou, K., Panagiotidis, M., Ioannou, M., Fella, E., Worth, E.P., Georgiou, T., 2022. Omega-3 fatty acids promote neuroprotection, decreased apoptosis and reduced glial cell activation in the retina of a mouse model of OPA1-related autosomal dominant optic atrophy. *Exp. Eye Res.* 215, 108901 <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108901>.
- Kim, Jeongmok, Yang, G., Kim, Y., Kim, Jin, Ha, J., 2016. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Exp. Mol. Med.* 48, e224. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.16>.
- Kim, N., Lee, J.O., Lee, H.J., Kim, H.I., Kim, J.K., Lee, Y.W., Lee, S.K., Kim, S.J., Park, S. H., Kim, H.S., 2015. Endogenous ligand for GPR120, docosahexaenoic acid, exerts benign metabolic effects on the skeletal muscles via the AMP-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 290, 20438–20447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.657379>.
- Kim, Y.S., Kim, M., Choi, M.Y., Lee, D.H., Roh, G.S., Kim, H.J., Kang, S.S., Cho, G.J., Hong, E.K., Choi, W.S., 2018. Alpha-lipoic acid reduces retinal cell death in diabetic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 503, 1307–1314. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.041>.
- Kotani, S., Sakaguchi, E., Warashina, S., Matsukawa, N., Ishikura, Y., Kiso, Y., Sakakibara, M., Yoshimoto, T., Guo, J., Yamashima, T., 2006. Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction. *Neurosci. Res.* 56, 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2006.06.010>.
- Lee, H.S., Barrera-Villarreal, A., Hernandez-Vargas, H., Sly, P.D., Biessy, C., Ramakrishnan, U., Romieu, I., Herczeg, Z., 2013. Modulation of DNA methylation states and infant immune system by dietary supplementation with ν -3 PUFA during pregnancy in an intervention study. *Am. J. Clin. Nutr.* 98, 480–487. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.052241>.
- Li, K., Huang, T., Zheng, J., Wu, K., Li, D., 2014. Effect of marine-derived n-3 polyunsaturated fatty acids on C-reactive protein, interleukin 6 and tumor necrosis factor α : a meta-analysis. *PLoS One* 9 (2), e8810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088103>.
- Li, L.Y., Wang, X., Zhang, T.C., Liu, Z.J., Gao, J.Q., 2021. Cardioprotective effects of omega-3 fatty acids from fish oil and it enhances autoimmunity in porcine cardiac myosin-induced myocarditis in the rat model. *Naturforsch C J Biosci.* 76, 407–415. <https://doi.org/10.1515/nznc-2021-0057>.
- Li, X., Han, Y., Pang, W., Li, C., Xie, X., Shyy, J.Y.J., Zhu, Y., 2008. AMP-activated protein kinase promotes the differentiation of endothelial progenitor cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1789–1795. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.172452>.
- Li, Y., Sun, R., Zou, J., Ying, Y., Luo, Z., 2019. Dual roles of the AMP-activated protein kinase pathway in angiogenesis. *Cells* 8, 752. <https://doi.org/10.3390/cells8070752>.
- Lin, S.C., Hardie, D.G., 2018. AMPK: sensing glucose as well as cellular energy status. *Cdi Metabol.* 27 (2), 299–313. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.009>.
- Martiniotti, S., Ranzato, E., 2020. Scratch wound healing assay: in: methods in molecular biology. *Methods Mol. Biol.* 2109, 225–229. <https://doi.org/10.1007/9781-4939-259-259>.
- Mihaylova, M.M., Shaw, R.J., 2011. The AMPK signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, and metabolism. *Nat. Cell Biol.* 13 (9), 1016–1023. <https://doi.org/10.1038/nrn2329>.
- Nagai, N., Kubota, S., Tsubota, K., Ozawa, Y., 2014. Resveratrol prevents the development of choroidal neovascularization by modulating AMP-activated protein kinase in macrophages and other cell types. *J. Nutr. Biochem.* 25, 1218–1225. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.05.015>.
- Oh, D.Y., Tolukdar, S., Bae, E.J., Imamura, T., Morinaga, H., Fan, W., Li, P., Lu, W.J., Watkins, S.M., Olefsky, J.M., 2010. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142, 687–698. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.041>.
- Oh, D.Y., Walenta, E., Akiyama, T.E., Lagakos, W.S., Lackey, D., Pessenheimer, A.R., Sasik, R., Hah, N., Chi, T.J., Cox, J.M., Powds, M.A., di Salvo, J., Sinz, C., Watkins, S. M., Armando, A.M., Chung, H., Evans, R.M., Quehenberger, O., McElis, J., Bogner-Strauss, J.G., Olefsky, J.M., 2014. A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nat. Med.* 20, 942–947. <https://doi.org/10.1038/nm.3614>.
- Osada, H., Toda, E., Homma, K., Guzman, N.A., Nagai, N., Ogawa, M., Negishi, K., Arita, M., Tsubota, K., Ozawa, Y., 2021. ADIPO1 deficiency-induced suppression of retinal ELOVL2 and docosahexaenoic acid levels during photoreceptor degeneration and visual loss. *Cell Death Dis.* 12 (5), 458. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03741-5>.
- Phillips, S., Fekrat, S., Finkelstein, D., 2005. Branch Retinal Vein Occlusion. *Retina*, fourth ed., pp. 1349–1354. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-02598-0.50077-X>.
- Pinto, C.C., Silva, K.C., Biswas, S.K., Martins, N., Lopes de Faria, J.B., Lopes de Faria, J. M., 2007. Arterial hypertension exacerbates oxidative stress in early diabetic retinopathy. *Free Radic. Res.* 41, 1151–1158. <https://doi.org/10.1080/10715760701632816>.
- Prokopiou, E., Kolovos, P., Kalogerou, M., Neokleous, A., Nicolaou, O., Sokratous, K., Kyriacou, K., Georgiou, T., 2018. Omega-3 fatty acids supplementation: therapeutic potential in a mouse model of Stargardt disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 59, 2757–2767. <https://doi.org/10.1167/iov.17-23523>.
- Prokopiou, E., Kolovos, P., Kalogerou, M., Neokleous, A., Papageorgiou, G., Deltas, C., Malas, S., Georgiou, T., 2017. Therapeutic potential of omega-3 fatty acids supplementation in a mouse model of dry macular degeneration. *BMJ Open Ophthalmol.* 1, e000056 <https://doi.org/10.1136/bmjophth-2016-000056>.
- Rena, G., Hardie, D.G., Pearson, E.R., 2017. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 60, 1577–1585. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>.
- Rivera, J.C., Dabouz, R., Noueheid, B., Omri, S., Tahiri, H., Chemtob, S., 2017. Ischemic retinopathies: oxidative stress and inflammation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 3940241. <https://doi.org/10.1155/2017/3940241>.
- Rosales, M.A.B., Silva, K.C., Duarte, D.A., de Oliveira, M.G., de Souza, G.F.P., Catharino, R.R., Ferreira, M.S., de Faria, J.B.L., de Faria, J.M.L., 2014a. S-nitrosoglutathione inhibits inducible nitric oxide synthase upregulation by redox posttranslational modification in experimental diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 2921–2932. <https://doi.org/10.1167/iov.13-13762>.
- Rosales, M.A.B., Silva, K.C., Duarte, D.A., Rossato, F.A., de Faria, J.B.L., de Faria, J.M.L., 2014b. Endocytosis of tight junctions caveolin nitrosylation dependent is improved by cocoa via opioid receptor on RPE cells in diabetic conditions. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 6090–6100. <https://doi.org/10.1167/iov.14-14234>.
- Sabanayagam, C., Banu, R., Chee, M.L., Lee, R., Wang, Y.X., Tan, G., Jonas, J.B., Lamoureux, E.L., Cheng, C.Y., Klein, B.E.K., Mitchell, P., Klein, R., Cheung, C.M.G., Wong, T.Y., 2019. Incidence and progression of diabetic retinopathy: a systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 7, 140–149. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(18\)30128-1](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(18)30128-1).
- Sala-Vila, A., Díaz-López, A., Valls-Pedret, Cofán, M., García-Layana, A., Lamuela-Raventós, R.-M., Castañer, O., Zanon-Moreno, V., Martínez-González, M.A., Toledo, E., Basora, J., Salas-Salvado, J., Corella, D., Gómez-Gracia, E., Fiol, M., Estruch, R., Lapetra, J., Fitó, M., Arós, F., Serra-Majem, L., Pintó, X., Ros, E., 2016. Dietary marine omega-3 fatty acids and incident sight-threatening retinopathy in middle-aged and older individuals with type 2 diabetes: prospective investigation from the PREDIMED trial. *JAMA Ophthalmol.* 134 (10), 1142–1149. <https://doi.org/10.1001/jamaophth.2016.2906>.
- SanGiovanni, J.P., Chew, E.Y., 2005. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 24, 87–138. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2004.06.002>.
- Serhan, C.N., 2014. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 510, 92–101. <https://doi.org/10.1038/nature13479>.
- Smith, L.E.H., Wesolowski, E., McEllan, A., Kostyk, S.K., Robert D'Amato, X., Sullivan, R., D'Amore, P.A., 1994. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 101–111.
- Song, S., Bao, S., Zhang, C., Zhang, J., Lv, J., Li, X., Chudhary, M., Ren, X., Kong, L., 2021. Stimulation of AMPK prevents diabetes-induced photoreceptor cell degeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2021, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2021/5587340>.
- Srinivasan, B., Kolli, A.R., Esch, M.B., Abaci, H.E., Shuler, M.L., Hickman, J.J., 2015. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J. Lab. Autom.* 20, 107–126. <https://doi.org/10.1177/2211068214561025>.
- Sun, G.Y., Simonyi, A., Fritsche, K.L., Chuang, D.Y., Hannink, M., Gu, Z., Greenleaf, C.M., Yao, J.K., Lee, J.C., Beversdorf, D.Q., 2018. Docosahexaenoic acid (DHA): an essential nutrient and a nutraceutical for brain health and diseases. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 136, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.03.006>.
- Theodoropoulos, S., Brodowska, K., Kayama, M., Morizane, Y., Miller, J.W., Gragoudas, E.S., Vavvas, D.G., 2013. Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR) inhibits the growth of retinoblastoma in vivo by decreasing angiogenesis and inducing apoptosis. *PLoS One* 8, e52852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052852>.
- Villarreal, M., García-Ramírez, M., Corraliza, L., Hernández, C., Simó, R., 2011. Fenofibrate prevents retinal pigment epithelium disruption induced by interleukin-1 β by suppressing AMP-activated protein kinase (AMPK) activation. *Diabetologia* 54, 1543–1553. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2089-5>.
- Viollet, B., Andreelli, F., Jørgensen, S.B., Perrin, C., Hamez, D., Mu, J., Wojtaszewski, J.F. P., Schuit, F.C., Birnbaum, M., Richter, E., Bucelin, R., Vaulont, S., 2003. Physiological role of AMP-activated protein kinase (AMPK): insights from knockout mouse models. *Biochem. Soc. Trans.* 31 (Pt 1), 216–219. <https://doi.org/10.1042/bst0310216>.
- Wang, J.C., Li, X.X., Sun, X., Li, G.Y., Sun, J.L., Ye, Y.P., Cong, L.L., Li, W.M., Lu, S.Y., Feng, J., Liu, P.J., 2018. Activation of AMPK by simvastatin inhibited breast tumor angiogenesis via impeding HIF-1 α -induced pro-angiogenic factor. *Cancer Sci.* 109, 1627–1637. <https://doi.org/10.1111/cas.13570>.
- Wang, X., Lu, Y., Tuo, Z., Zhou, H., Zhang, Y., Cao, Z., Peng, L., Yu, D., Bi, L., 2021. Role of SIRT1/AMPK signaling in the proliferation, migration, and invasion of renal cell carcinoma cells. *Oncol. Rep.* 45, 109. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8060>.
- Wilson, C.A., Berkowitz, B.A., Funatsu, H., Metrikin, D.C., Harrison, D.W., Lam, M.K., Sonkin, P.L., 1995. Blood-retinal barrier breakdown following experimental retinal ischemia and reperfusion. *Exp. Eye Res.* 61, 547–557. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(05\)80048-X](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(05)80048-X).
- Xu, L., Kong, L., Wang, J., Ash, J.D., 2018. Stimulation of AMPK prevents degeneration of photoreceptors and the retinal pigment epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 10475–10480. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802724115>.
- Yu, H., Wark, L., Ji, H., Willard, L., Jaing, Y., Han, J., He, H., Ortiz, E., Zhang, Y., Medeiros, D.M., Lin, D., 2013. Dietary ω -3 fatty acids upregulate carotenoid metabolic genes and enhance mitochondrial biogenesis in the retina of db/db diabetic mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 1158–1169. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200642>.
- Zhdanov, A.V., Okkerman, I.A., Collins, F.W.J., Mdgar, S., Papkovsky, D.B., 2015. A novel effect of DMOG on cell metabolism: direct inhibition of mitochondrial function precedes HIF target gene expression. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1847 (10), 1254–1266. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.06.016>.
- Zheng, S., Li, W., Xu, M., Bai, X., Zhou, Z., Han, J., Y-J Shyy, J., Wang, Xian, Wang, X., 2010. Calcitonin gene-related peptide promotes angiogenesis via AMP-activated protein kinase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 299, 1485–1492. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00173.2010>.

ANEXO 4 – Capítulo publicado como parte das atividades realizadas durante o doutorado.

Chapter

Deficient Autophagy Contributes to the Development of Diabetic Retinopathy

Jacqueline M. Lopes de Faria and Marcella Neves Dátilo

Abstract

Autophagy is a self-degradation process essential to maintain intracellular homeostasis and cell survival, controlling elimination of pathogens, damage to organelles, and nutrient recycling to generate energy. Alterations in autophagic flux have been reported in the mechanisms of several diseases such as neurodegenerative diseases, cancer, diabetes mellitus, and its associated complications. Diabetic retinopathy (DR) is a microvascular complication of diabetes, affecting nearly 30% of diabetic patients. Several pathways are triggered and repressed in the development of DR, and autophagy showed to be relevant in the pathogenesis of this devastating complication. In this chapter, autophagy's involvement in the development and progression of DR will be discussed, mainly in retinal pigmented epithelial cells and retinal microvascular endothelial cells, as well as in Müller cells—the more prominent retinal glial cell.

Keywords: retina, diabetic retinopathy, autophagy, ARPE-19, endothelial cell, Müller cell

1. Introduction

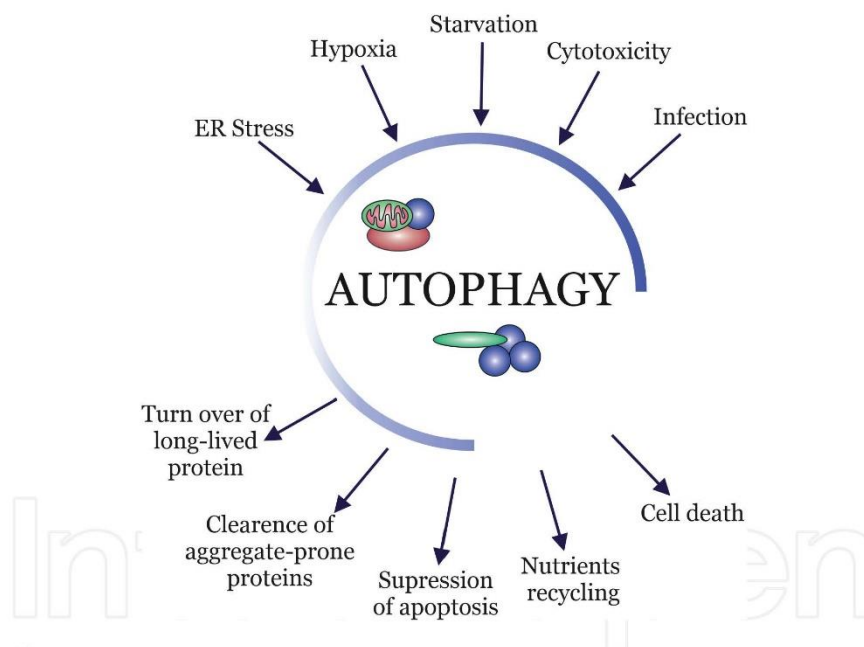
Autophagy (from Greek, meaning “self-eating”) refers to a highly conserved process in eukaryotic cells, which coordinates the degradation of intracellular components and nutrient recycling. This process is essential for cellular homeostasis, survival, and differentiation. In basal conditions, the autophagic process happens in low levels to maintain cellular homeostasis. However, in such conditions as low levels of adenosine triphosphate (ATP) or depletion of essential amino acids and glucose, autophagic flux can increase to generate energy and raise basal levels. More recently, the understanding of this process has gained attention due to its pivotal role in cellular physiology and a variety of diseases from cancer, chronic degenerative diseases, and immune diseases (**Table 1**).

Autophagy is a primary cell response to stress and can be induced by starvation, endoplasmic reticulum (ER) stress, hypoxia, cytotoxicity, and infection (**Figure 1**). Sensation, initiation, and regulation of the autophagy-lysosomal pathway is controlled by the heterotrimeric serine/threonine kinase AMP (AMPK) and rapamycin complex 1 (mTORC1), either triggering or repressing autophagy and mitophagy. Unc-51-like kinase 1 (ULK1) is a primary initiating protein, as is mTORC1-suppressed transcription factor EB (TFEB), which coordinates the synthesis of

Gene	Disease	References
GBA1[1], TMEM230[2]	Parkinson's disease	Schapira, 2015; Kim et al, 2017
PS1[3], APP[4]	Alzheimer's disease	Lee et al, 2010; Reddy et al, 2018
PTPN2[5]	Type 1 diabetes, juvenile arthritis	Scharl et al, 2012
ERBB2[6], FANC[7] genes	Breast Cancer	Vega-Rubin-de-Cellis et al, 2018; Sumpter et al, 2016
GPR65[8]	Inflammatory bowel disease	Lassen et al, 2016

Table 1.

In this table, some examples of genetic diseases associated with autophagic impairment [1–8].

**Figure 1.**

Several cellular sensors regulate autophagic flux to maintain homeostasis.

lysosomes and other essential proteins maintaining the autophagic flux [9–12]. In addition, sirtuin-1—a class III deacetylase dependent on nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)—becomes a positive autophagy regulator, since it may also be considered a cellular sensor [13].

This process is mainly regulated at a post-translational level, increasing mRNA expression of autophagy genes [14]. Under stress conditions, TFEB is translocated from cytosol to the nucleus, activating transcription of ATG genes and coordinating upregulation of the entire autophagy–lysosomal pathway [15].

Autophagy can be constitutive or inducible, rapidly adjusting to alterations within the internal and external environment of the cells. Autophagy serves as a housekeeping system, demonstrated by animal models deficient in

Deficient Autophagy Contributes to the Development of Diabetic Retinopathy
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.89339>

autophagy-related genes (ATG). For example, deletion of specific neurons of ATG7 or 5 genes leads to postnatal neurodegeneration [16, 17].

Intrinsically, cellular sensors detect changes in levels of glucose, cytosolic Ca^{++} , reactive oxygen species (ROS), and metabolic intermediates. Therefore, a decrease in glucose availability or impairment of mitochondrial respiration—compromising ATP production leads to an increase in the AMP/ADP ratio, activating the AMPK α subunit [10].

An example of extrinsic sensing occurs via drug-targetable mechanisms at the plasma membrane level. Tyrosine kinase receptors converge on mTOR, AMPK, or Beclin-1-Vps complex by modulating autophagy following growth factors [18, 19]. Even G-protein-coupled receptors (GPCRs) control autophagy via intracellular pathways that similarly modulate AMPK and mTOR [20–22].

This discussion includes a short overview of the more common types of autophagy and will highlight the role of autophagy in retinal diseases, with special attention to diabetic retinopathy.

2. Types of autophagy

There are three forms of autophagy previously described in the literature: macroautophagy, chaperone-mediated autophagy, and microautophagy (**Figure 2**).

2.1 Macroautophagy

Usually known as autophagy, this intracellular pathway includes cytosolic components such as proteins, lipids, organelles, and parts of the nucleus [23, 24]. Autophagy was first described by Christian du Duve 50 years ago and has been highly preserved across the species. From beginning to end, the whole process is controlled by the ATG protein family, and more than 35 genes have been identified to orchestrate the process [25].

Autophagosome formation is the hallmark of this process. The well-coordinated process begins with an initiation phase, when ULK1 kinase forms a complex with ATG13, ATG10, and FIP200 (known as RB1CC1) at a specific cell site located in the perivacuolar region known as the phagophore assembly site (PAS). ULK1 kinase activity triggers the formation of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) complex, which favors the formation of phosphatidylinositol 3-phosphate, initiating the nucleation phase [26]. Ubiquitin-like conjugation systems are then activated, catalyzed by ATG7. ATG12 is conjugated to ATG5, then phosphatidylethanolamine to microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3) through ATG7 kinase, forming an autophagosome bound to LC3 (also called LC3-II) [27, 28]. The late stage of autophagy is controlled by molecules that regulate maturation of the autophagosome, fusion with lysosomes, acidification of the inside compartment of the autophagosome components, and recycling of metabolites from the lysosomal compartment. This coordinated process—including a sequence of protein–protein and protein–lipid interaction—is a dynamic process, where the autophagosome formation, fusion to the lysosome, and digestion of the inside components occur in less than 10 minutes. Therefore, any sort of autophagy dysfunction (such as blockage of lysosomal fusion or lysosomal function impairment) may lead to accumulation of harmful damaged organelles and protein aggregates inside the cell [29] (**Figure 2**).

2.2 Chaperone-mediated autophagy

In chaperone-mediated autophagy, there is no reorganization of the lysosomal membrane. This selective autophagy is only described in mammals [30], which

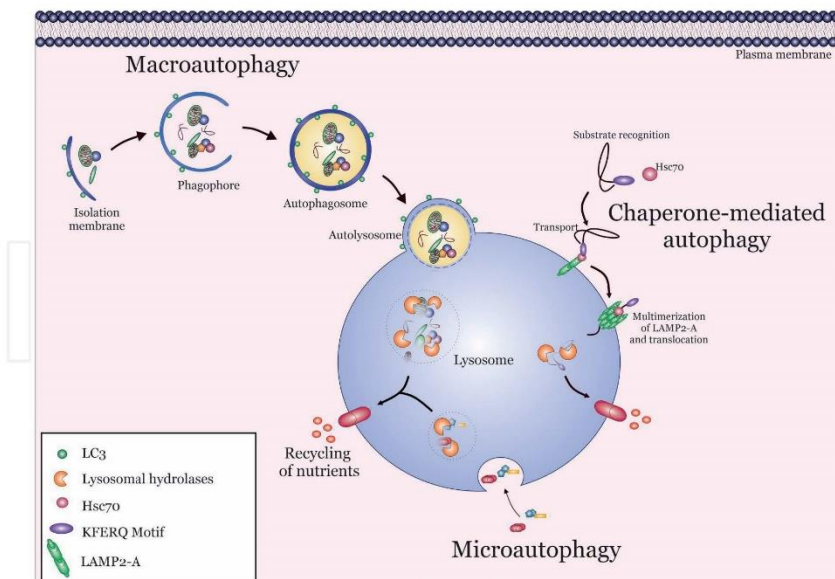


Figure 2. Types of autophagy. (1) Macroautophagy: initiation of autophagy through isolation membrane, extension of membrane, and closure forming the autophagosome. Finally, the autophagosome merges with lysosome. Lysosomal hydrolases digest the contents to recycling nutrients. (2) Chaperone-mediated autophagy: identification of KFERQ-motif by Hsc70. Transportation of damage protein to lysosome. Recognition and multimerization of LAMP-2. Damage proteins are translocated to inside of the lysosome to suffer the action of lysosomal hydrolases. (3) Microautophagy: recognition and internalization of cytoplasmic component.

mediates delivery of specific proteins to the lysosome. The distinction occurs because the cytosolic proteins need to be degraded by the presence of a pentapeptide amino acid sequence, KFERQ. This sequence permits recognition of the target protein by a family of chaperones and co-chaperones: the heat shock cognate, 70-kDa (Hsc70)—the most abundant in the family. After recognition of the KFERQ sequence, Hsc70 presents the unfolded proteins to the lysosome, one by one, where they are recognized by the transmembrane domain of lysosome-associated membrane protein type 2A (LAMP2-A). After this, the multimerization of LAMP2-A occurs, allowing transportation of the substrate into the lysosome for degradation. At the end of this process, the LAMP2-A complex is disassembled, and the chaperone Hsp70 is released to start a new cycle [31].

2.3 Microautophagy

Microautophagy is not well described in mammalian cells. However, recent evidence has shown that there is recognition and internalization of small cytoplasmic components in late endosomes. This type of autophagy requires the chaperone Hsc70. However, the microautophagy process is independent of the unfolding of KFERQ and the multimerization of LAMP2-A [32, 33].

2.4 Role of autophagy in disease development

Since the primary function of autophagy is to eliminate harmful components from cells (aggregated proteins, damaged organelles, and pathogens), malfunctioning of this mechanism implicit in diseases—such as Huntington's and Parkinson's diseases [34, 35]—results in protein accumulation.

In physiological conditions, autophagy is involved in cellular homeostasis, as demonstrated in heart diseases, as seen in heart failure and ischemia–reperfusion injuries [36]. In the pancreas, autophagy is required to maintain function of β cells, revealing significance in the pathogenesis of diabetes. Alterations in autophagy have also been described in a more complex model in cancer research: it can suppress tumors but also helps the tumor adapt to metabolic stress in its late stages [37].

3. Diabetic retinopathy

Diabetes mellitus is a public health issue, estimated to affect about 500 million people by 2035 [38]. Nearly 30% of patients are likely to suffer from retinal microvascular complications and 10% may experience visual threatening due to macular edema or proliferative diabetic retinopathy [39, 40].

Multiple mechanisms are triggered under hyperglycemic conditions (hexosamine and polyol pathways [41], synthesis de novo of diacylglycerol-PKC [42, 43], low grade oxidative stress [44–46], inflammation [47–51], and advanced glycation end products [52, 53]). Although vascular changes are presumed to be the hallmarks of DR, abnormalities in retinal function are detected in patients with diabetes who have good visual acuity [54–59].

The characteristics of retinal neurodegeneration are apoptosis of neuro cells and dysfunction of glial cells—mainly Müller cells [29, 50, 60]. In microvascular disease of diabetic retinopathy, both inner and outer blood retinal barrier break down [61].

3.1 Autophagy in diabetic retinopathy

Since their pioneering studies, Remé et al. —describing the presence of active autophagy in photoreceptors during hibernation with a decreased number of mitochondria and organelles compared to animals in non-hibernating conditions—observed an increased number of autophagosomes [62]. These data show the pivotal role of autophagy in the retina, degrading cellular components (such as mitochondria) during hibernation.

Implications of autophagy in retinal ganglion cells (RGCs) attracted interest as a potential tool for neuroprotection in glaucoma. The first evidence of the cytoprotective role of autophagy in RGCs was shown by Rodríguez-Muela et al. using autophagy-deficient mice, which displayed increased axonal damage following optic nerve transection (ONT) models of optic neuropathy [63–65].

3.2 Autophagy in blood retinal barriers and implications on diabetic retinopathy

The main function of the blood-retina barrier (BRB) is maintenance of retinal homeostasis, regulating the transport of blood stream molecules to provide an appropriate supply for the neuroretina and to protect neural tissue against harmful agents present in the blood. The BRB is formed by two types of barriers: the inner blood-retina barrier (iBRB) and the outer blood-retina barrier (oBRB) [66].

Both outer and inner retinal barriers are affected by the toxic metabolic effects of hyperglycemia [67]. Alterations in the iBRB are more studied than the oBRB among the mechanisms of development and progression of DR [68–70]. The appropriated function of autophagy flux is important for maintenance of cellular viability and confers stress tolerance in retinal cells under adverse conditions such as DR [71].

Retinal endothelial cells of microcirculation of the retina form the iBRB. This barrier selectively allows passage of molecules from systemic circulation to retinal tissue. As a constituent of this barrier, there are tight junctions and adherens junctions such as zonula occludens-1 (ZO-1), occludin, VE-cadherin, and N-cadherin [72]. Endothelial cells are warped by pericytes, which are highly specialized. Pericytes play an essential role in the structure and stability of the iBRB, coordinating angiogenesis and vascular remodeling [73, 74].

Few articles have highlighted the autophagic process in retinal endothelial cells under diabetic conditions [75, 76]. Exposure to high glucose leads to an increase in retinal endothelial cell apoptosis, and this mechanism is mediated by the enhancement of ROS production. This phenomenon is correlated with a reduction in the AMPK pathway [76], which is well described as a direct activator of ULK-1 in the autophagy process [77]. Reestablishing the level of AMPK using specific activators—such as AICAR or antioxidant treatment—is effective in the protection of endothelial retinal cells from damage caused by diabetic conditions [75, 76]. A recent study from Niu et al. described the importance of the protective properties of metformin on retinal endothelial cells and human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs) via autophagy in diabetic conditions. In this work, the authors showed that there was an increased LC3 puncta formation, which is an indicative of autophagy, in retinal vascular endothelium from db/db (diabetic) mice compared with control (non-diabetic) mice. This is indicative that metformin protects the retinal microvascular cells by diminishing LC3 formation. To further understand this mechanism, HUVECs were exposed to high levels of glucose and treated with metformin, resulting in a clear increase of LC3 formation. In HUVECs transfected with sh-PRKAA1/2 (AMP catalytic subunit), the protective effect of metformin was abrogated, indicating that metformin acts via AMPK activation [78] and improving autophagy in these cells.

The oBRB is a monolayer formed by retinal pigment epithelial cell layer that separates the neuro retina from choriocapillaris. Impairment of this barrier is implicated in diabetic retinopathy development [79–81]. The major functions of the oBRB are to provide glucose, fatty acids, and retinol to photoreceptors from choriocapillaris and reisomerise all-trans-retinal in 11-cis-retinal after photon absorption of the photoreceptor [66, 82, 83]. Therefore, any disturbance in this structure may have detrimental effects on the retina. A number of sight-threatening diseases display RPR dysfunction, such as age-related macular degeneration, proliferative vitreoretinopathy, and diabetic retinopathy [84].

It is well described in the literature that human retinal pigmented epithelial (RPE) immortalized cells (ARPE-19) exposed to high concentrations of glucose present molecular changes, including a decrease of proliferation, an increase in oxidative stress mediated by ROS production, and augmented lipid droplets and inflammation [85–88]. These alterations can activate or repress the autophagic flux in RPE cells. Studies have shown that, until 48 hours of exposure to high glucose levels, ARPE-19 cells present an increase in lipid droplets, which can contribute to ROS production [71, 85, 89]. This increase in ROS production can initiate autophagy, enhancing the numbers of autophagosomes, increasing conversion of LC3-I to LC3-II, and decreasing levels of p62/SQSTM1 as a defense mechanism against damage caused by high glucose. However, Chen et al. found that an increase in autophagic flux promoted by high glucose cannot be maintained long-term. After 7 days in high glucose, ARPE-19 presented impairment in the degradation of p62/SQSTM1 and an increase in apoptotic cells. These findings indicated that autophagy was the first defense against oxidative stress in high-glucose conditions. In the long-term, this protective pathway became saturated and inefficient, thus contributing to RPE degeneration in DR [87].

Deficient Autophagy Contributes to the Development of Diabetic Retinopathy
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.89339>

Zhang et al. have shown that high glucose concentrations can attenuate the PINK1 and parkin pathways involved in controlling cellular mitophagy. Downregulation of mitophagy can lead to an increase in cellular stress levels because the biogenesis of mitochondria becomes compromised [90].

The role of autophagy in retinal diabetic complications is not simply a matter of inhibiting its initiation or progression. Inhibition of autophagy in ARPE-19 during its initial phase with 3-methyladenine (3-MA) or during the fusion of autophagosome and lysosome using bafilomycin aggravates oxidative stress and exacerbates secretion of the pro-inflammatory interleukin-1 β promoted by high glucose [88]. The appropriated autophagic process is important as a mechanism of cell homeostasis in diabetic conditions.

3.3 Autophagy in Müller glial cells and implications in diabetic retinopathy pathogenesis

Müller cells are the predominant glial cell in the retina. Its unique morphology allows the Müller cell to directly interact with neighboring neural and vascular cells, expanding through the entire retina from the inner limiting membrane to the photoreceptor layer. Müller cells are closely related with vitreous, blood vessels, and sub retinal space. Each Müller cell interacts with one cone and 10 rods [91]. This configuration of Müller cells inside the retina explains the diversity of its function, responsible for the metabolic, functional, and structural support of the retina [92].

There are several functions attributed to Müller cells, such as the release of trophic factors [93, 94], neurotransmitter recycling [95], and phagocytosis of external photoreceptor segments [96, 97]. Müller cells, depending upon the stimulus (trauma, vascular, or metabolic), may react with phenotype changes called gliosis, which consist in adaptive morphological, biochemical, and physiological alterations. Among the more interesting biochemical changes in Müller cells are increased vascular endothelial growth factor (VEGF) [98] and glial fibrillary acidic protein (GFAP) production, both with pro-angiogenic and pro-inflammatory effects. Massive VEGF release is present in the proliferative stages of DR and diabetic macular edema, representing a major therapeutic target for pharmacological treatment of these devastating complications.

There are few studies showing the effects of high glucose on autophagy in retinal Müller cells. Devi et al. described the implications of autophagy dysfunction in the mechanisms of DR [99]. In their study, Müller cells exposed to high glucose conditions for 5 days displayed an increase of autophagosome and mitophagosome in the cytosol, suggesting high glucose conditions activated the autophagy process. Despite activation of the protective process (autophagy), they observed an association with an increased proapoptotic caspase-3, leading to programmed cell death. This scenario elucidates that diabetic conditions induce activation of autophagy followed by dysfunction, leading to cellular death.

In the previously published work addressing the mechanism by which Müller cells exposed to high glucose release high amounts of VEGF and trigger increased apoptosis, it was shown that the autophagic process was defective in Müller cells among diabetic conditions. In cells exposed to high glucose, autophagy markers—both early Beclin and late LC3-I and LC3-II—were increased, but p62/SQSTM1 accumulated in the cytosol compartment of Müller cells, accompanied by an increased apoptotic rate. To further understand how p62/SQSTM1 could modulate the autophagy and apoptosis in Müller cells exposed to high glucose, p62/SQSTM1 was suppressed. In this condition, there was less endoplasmic reticulum stress, lowering the interaction with caspase-8 and, by extension, less apoptosis. The presence of rapamycin, an mTOR blocker, triggered the formation of autophagosome

and ameliorated the degradation of p62/SQSTM1. Rapamycin showed to improve proteolytic activity of the lysosome, reducing the release of VEGF. Corresponding findings were also demonstrated in models using diabetic animals. In the retinas of diabetic rats, there was a significant increase in p62/SQSTM1 accumulation, particularly in cells located in the inner nuclear layer [29]. Lysosomal impairment and autophagic flux dysfunction are early indicators of the pathogenesis of DR.

4. Conclusion

Diabetic retinopathy is a neurodegenerative disease presenting vascular changes in its late stages. Multiple factors are associated with the development and progression of DR. Recently, better understanding at cellular and molecular levels of its process has been identified through the pathways and intracellular signaling involved in cells exposed to diabetic conditions. This has allowed identification of new therapeutic approaches. Recent concepts of this disease have been analyzed here, with special focus on the process of autophagy using experimental models in different retinal cells targeted by hyperglycemia in the developmental stages of the disease.

Author details

Jacqueline M. Lopes de Faria* and Marcella Neves Dátalo
Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, São Paulo, Brazil

*Address all correspondence to: lopesdefariajm@gmail.com

IntechOpen

© 2019 The Author(s). Licensee IntechOpen. This chapter is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. 

Deficient Autophagy Contributes to the Development of Diabetic Retinopathy
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.89339>

References

- [1] Schapira AHV. Glucocerebrosidase and parkinson disease: Recent advances. *Molecular and Cellular Neurosciences*. 2015;**66**:37-42. DOI: 10.1016/j.mcn.2015.03.013
- [2] Kim MJ, Deng H-X, Wong YC, Siddique T, Krainc D. The Parkinson's disease-linked protein TMEM230 is required for Rab8a-mediated secretory vesicle trafficking and retromer trafficking. *Human Molecular Genetics*. 2017;**26**(4):729-741. DOI: 10.1093/hmg/ddw413
- [3] Lee J-H, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, et al. Lysosomal proteolysis and autophagy require Presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*. 2010;**141**(7):1146-1158. DOI: 10.1016/j.cell.2010.05.008
- [4] Reddy PH, Yin X, Manczak M, Kumar S, Pradeepkiran JA, Vijayan M, et al. Mutant APP and amyloid beta-induced defective autophagy, mitophagy, mitochondrial structural and functional changes and synaptic damage in hippocampal neurons from Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*. 2018;**27**(14):2502-2516. DOI: 10.1093/hmg/ddy154
- [5] Scharl M, Wojtal KA, Becker HM, Fischbeck A, Frei P, Arikkat J, et al. Protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 2 regulates Autophagosome formation in human intestinal cells. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2012;**18**(7):1287-1302. DOI: 10.1002/ibd.21891
- [6] Vega-Rubín-de-Celis S, Zou Z, Fernández ÁF, Ci B, Kim M, Xiao G, et al. Increased autophagy blocks HER2-mediated breast tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;**115**(16):4176-4181. DOI: 10.1073/pnas.1717800115
- [7] Sumpter R, Sirasanagandla S, Fernández ÁF, Wei Y, Dong X, Franco L, et al. Fanconi anemia proteins function in Mitophagy and immunity. *Cell*. 2016;**165**(4):867-881. DOI: 10.1016/j.cell.2016.04.006
- [8] Lassen KG, McKenzie CI, Mari M, Murano T, Begun J, Baxt LA, et al. Genetic coding variant in GPR65 alters Lysosomal pH and links Lysosomal dysfunction with colitis risk. *Immunity*. 2016;**44**(6):1392-1405. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.05.007
- [9] Fernández ÁF, Sebtí S, Wei Y, Zou Z, Shi M, McMillan KL, et al. Disruption of the beclin 1-BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice. *Nature*. 2018;**558**(7708):136-140. DOI: 10.1038/s41586-018-0162-7
- [10] Melendez A. Autophagy genes are essential for Dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science*. 2003;**301**(5638):1387-1391. DOI: 10.1038/s41586-018-0162-7
- [11] Hars ES, Qi H, Jin SV, Cai L, Hu C, Liu LF. Autophagy Regulates Ageing in *C. elegans*. *Autophagy*. 2007;**3**(2):93-95. DOI: 10.4161/auto.3636
- [12] Hansen M, Chandra A, Mitic LL, Onken B, Driscoll M, Kenyon CA. Role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*. *PLoS Genetics*. 2008;**4**(2):e24. DOI: 10.1371/journal.pgen.0040024
- [13] Juhasz G, Erdi B, Sass M, Neufeld TP. Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in *Drosophila*. *Genes & Development*. 2007;**21**(23):3061-3066. DOI: 10.1101/gad.1600707
- [14] Feng Y, Yao Z, Klionsky DJ. How to control self-digestion: Transcriptional,

- post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy. *Trends in Cell Biology*. 2015;**25**(6):354-363. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.02.002
- [15] Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, et al. A gene network regulating Lysosomal biogenesis and function. *Science*. 2009;**325**(5939):473-477. DOI: 10.1126/science.1174447
- [16] Lipinski MM, Zheng B, Lu T, Yan Z, Py BF, Ng A, et al. Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;**107**(32):14164-14169. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.013
- [17] Chen Y, Sawada O, Kohno H, Le YZ, Subauste C, Maeda T, et al. Autophagy protects the retina from light-induced degeneration. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013;**288**(11):7506-7518. DOI: 10.1074/jbc.M112.439935
- [18] Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the Autophagic/Lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metabolism*. 2007;**6**(6):472-483. DOI: 10.1016/j.cmet.2007.11.004
- [19] Sarkis GJ, Ashcom JD, Hawdon JM, Jacobson LA. Decline in protease activities with age in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1988;**45**(3):191-201. DOI: 10.1016/0047-6374(88)90001-2
- [20] Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*. 2004;**432**(7020):1032-1036. DOI: 10.1038/nature03029
- [21] Kapahi P, Kaeberlein M, Hansen M. Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models. *Ageing Research Reviews*. 2017;**39**:3-14. DOI: 10.1016/j.arr.2016.12.005
- [22] Mattison JA, Colman RJ, Beasley TM, Allison DB, Kemnitz JW, Roth GS, et al. Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nature Communications*. 2017;**8**(1):14063. DOI: 10.1038/ncomms14063
- [23] Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology*. 2013;**15**(7):713-720. DOI: 10.1038/ncb2788
- [24] Dou Z, Xu C, Donahue G, Shimi T, Pan JA, Zhu J, et al. Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature*. 2015;**527**(7576):105-109. DOI: 10.1038/nature15548
- [25] Ktistakis NT, Tooze SA. Digesting the expanding mechanisms of autophagy. *Trends in Cell Biology*. 2016;**26**(8):624-635. DOI: 10.1016/j.tcb.2016.03.006
- [26] Bento CF, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M, et al. Mammalian autophagy: How does it work? *Annual Review of Biochemistry*. 2016;**85**(1):685-713. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060815-014556
- [27] Choi AMK, Ryter SW, Levine B. Mechanisms of disease: Autophagy in human health and disease. *The New England Journal of Medicine*. 2013;**368**(7):651-662. DOI: 10.1056/NEJMr1205406
- [28] Suzuki H, Osawa T, Fujioka Y, Noda NN. Structural biology of the core autophagy machinery. *Current Opinion in Structural Biology*. 2017;**43**:10-17. DOI: 10.1016/j.sbi.2016.09.010

Deficient Autophagy Contributes to the Development of Diabetic Retinopathy
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.89339>

- [29] Lopes de Faria JM, Duarte DA, Montemurro C, Papadimitriou A, Consonni SR, Lopes de Faria JB. Defective autophagy in diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2016;**57**(10):4356. DOI: 10.1167/iovs.16-19197
- [30] Arias E, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Current Opinion in Cell Biology*. 2011;**23**(2):184-189. DOI: 10.1016/j.ceb.2010.10.009
- [31] Orenstein SJ, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms and physiological relevance. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2010;**21**(7):719-726. DOI: 10.1074/jbc.R117818237
- [32] Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, et al. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Developmental Cell*. 2011;**20**(1):131-139. DOI: 10.1016/j.devcel.2010.12.003
- [33] Tekirdag K, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Jointed by a chaperone. *The Journal of Biological Chemistry*. 2018;**293**(15):5414-5424. DOI: 10.1074/jbc.R117818237
- [34] Moloudizargari M, Asghari MH, Ghobadi E, Fallah M, Rasouli S, Abdollahi M. Autophagy, its mechanisms and regulation: Implications in neurodegenerative diseases. *Ageing Research Reviews*. 2017;**40**:64-74. DOI: 10.1016/j.arr.2017.09.005
- [35] Menzies FM, Fleming A, Caricasole A, Bento CF, Andrews SP, Ashkenazi A, et al. Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic mechanisms and therapeutic opportunities. *Neuron*. 2017;**93**(5):1015-1034. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.01.022
- [36] Lavandero S, Chiong M, Rothermel BA, Hill JA. Autophagy in cardiovascular biology. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015;**125**(1):55-64. DOI: 10.1172/JCI73943
- [37] Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Kroemer G. Autophagy mediates tumor suppression via cellular senescence. *Trends in Cell Biology*. 2016;**26**(1):1-3. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.11.001
- [38] Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;**27**(5):1047-1053. DOI: 10.2337/diacare.27.5.1047
- [39] Yau JWY, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2012;**35**(3):556-564. DOI: 10.2337/dc11-1909
- [40] Kempen JH, O'Colmain BJ, Leske MC, Haffner SM, Klein R, Moss SE, et al. The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Archives of Ophthalmology*. 2004;**122**(4):552-563. DOI: 10.1001/archophth.122.4.552
- [41] Berrone E, Beltramo E, Solimine C, Ape AU, Porta M. Regulation of intracellular glucose and polyol pathway by thiamine and benfotiamine in vascular cells cultured in high glucose. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006;**281**(14):9307-9313. DOI: 10.1074/jbc.M600418200
- [42] Gerald P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circulation Research*. 2010;**106**(8):1319-1331. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.217117
- [43] Lee TS, Saltsman KA, Ohashi H, King GL. Activation of protein kinase C

- by elevation of glucose concentration: Proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;**86**(13):5141-5145. DOI: 10.1073/pnas.86.13.5141
- [44] Wu M, Yiang G, Lai T, Li C. The oxidative stress and mitochondrial dysfunction during the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018;**2018**:1-12. DOI: 10.1155/2018/3420187
- [45] Rosales MAB, Silva KC, Duarte DA, Rossato FA, Lopes de Faria JB, Lopes de Faria JM. Endocytosis of tight junctions Caveolin Nitrosylation dependent is improved by cocoa via opioid receptor on RPE cells in diabetic conditions. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2014;**55**(9):6090. DOI: 10.1167/iov.14-14234
- [46] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes*. 2005;**54**(6):1615-1625. DOI: 10.3390/nu8090585
- [47] Li J, Schmidt AM. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997;**272**(26):16498-16506. DOI: 10.1074/jbc.272.26.16498
- [48] Rajagopal R, Bligard GW, Zhang S, Yin L, Lukasiewicz P, Semenkovich CF. Functional deficits precede structural lesions in mice with high-fat diet-induced diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2016;**65**:1-35. DOI: 10.2337/db15-1255
- [49] Shelton MD, Kern TS, Mieyal JJ. Glutaredoxin regulates nuclear factor κ -B and intercellular adhesion molecule in Müller cells: Model of diabetic retinopathy. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007;**282**(17):12467-12474. DOI: 10.1074/jbc.M610863200
- [50] Duarte DA, Papadimitriou A, Gilbert RE, Thai K, Zhang Y, Rosales MAB, et al. Conditioned medium from early-outgrowth bone marrow cells is retinal protective in experimental model of diabetes. *PLoS One*. 2016;**11**(2):e0147978. DOI: 10.1371/journal.pone.0147978
- [51] Dátalo MN, Sant'Ana MR, Formigari GP, Rodrigues PB, de Moura LP, da Silva ASR, et al. Omega-3 from flaxseed oil protects obese mice against diabetic retinopathy through GPR120 receptor. *Scientific Reports*. 2018;**8**(1):14318. DOI: 10.1038/s41598-018-32553-5
- [52] Genuth S, Sun W, Cleary P, Gao X, Sell DR, Lachin J, et al. Skin advanced glycation end products glucosepane and methylglyoxal hydroimidazolone are independently associated with long-term microvascular complication progression of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2015;**64**(1):266-278. DOI: 10.1007/s00726-010-0773-2
- [53] Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, Van Obberghen E. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by advanced Glycation end products. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;**276**(47):43836-43841. DOI: 10.1074/jbc.M106534200
- [54] Hyvärinen L, Laurinen P, Rovamo J. Contrast sensitivity in evaluation of visual impairment due to diabetes. *Acta Ophthalmologica*. 2009;**61**(1):94-101. DOI: 10.1111/j.1755-3768.1983.tb01399.x
- [55] Sokol S, Moskowitz A, Skarf B, Evans R, Molitch M, Senior B. Contrast sensitivity in diabetics with and without background retinopathy. *Archives of Ophthalmology*. 1985;**103**(1):51-54. DOI: 10.1001/archoph.1985.01050010055018

Deficient Autophagy Contributes to the Development of Diabetic Retinopathy
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.89339>

- [56] Hardy KJ, Lipton J, Scase MO, Foster DH, Scarpello JHB. Detection of colour vision abnormalities in uncomplicated type 1 diabetic patients with angiographically normal retinas. *The British Journal of Ophthalmology*. 1992;**76**(8):461-464. DOI: 10.1136/bjo.76.8.461
- [57] Bresnick GH. Electroretinographic oscillatory potentials predict progression of diabetic retinopathy. *Archives of Ophthalmology*. 1984;**102**(9):1307. DOI: 10.1167/iops.04-1409
- [58] Lopes de Faria J, Katsumi O, Cagliero E, Nathan D, Hirose T. Neurovisual abnormalities preceding the retinopathy in patients with long-term type 1 diabetes mellitus. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2001;**239**(9):643-648. DOI: 10.1007/s004170100268
- [59] Simó R, Hernández C. Neurodegeneration in the diabetic eye: New insights and therapeutic perspectives. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2014;**25**(1):23-33. DOI: 10.1016/j.tem.2013.09.005
- [60] Duarte DA, Rosales MAB, Papadimitriou A, Silva KC, Amancio VHO, Mendonça JN, et al. Polyphenol-enriched cocoa protects the diabetic retina from glial reaction through the sirtuin pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2015;**26**(1):64-74. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2014.09.003
- [61] Li PSH, Wong TH, Tang WWT, Lai JSM. Diabetic retinopathy. *Hong Kong Practice*. 2004;**26**(8):346-353. DOI: 10.1038/nrdp.2016.12
- [62] Remé CE, Young RW. The effects of hibernation on cone visual cells in the ground squirrel. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1977;**16**(9):815-840
- [63] Rodríguez-Muela N, Germain F, Mariño G, Fitze PS, Boya P. Autophagy promotes survival of retinal ganglion cells after optic nerve axotomy in mice. *Cell Death and Differentiation*. 2012;**19**(1):162-169. DOI: 10.1038/cdd.2011.88
- [64] Rodríguez-Muela N, Boya P. Axonal damage, autophagy and neuronal survival. *Autophagy*. 2012;**8**(2):286-288. DOI: 10.4161/auto.8.2.18982
- [65] Kurz T, Karlsson M, Brunk UT, Nilsson SE, Frennesson C. ARPE-19 retinal pigment epithelial cells are highly resistant to oxidative stress and exercise strict control over their lysosomal redox-active iron. *Autophagy*. 2009;**5**(4):494-501. DOI: 10.4161/auto.5.4.7961
- [66] Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C. Blood-retinal barrier. *European Journal of Ophthalmology*. 2011;**21**(Suppl 6):3-9. DOI: 10.5301/EJO.2010.6049
- [67] Di Rosa M, Distefano G, Gagliano C, Rusciano D, Malaguarnera L. Autophagy in diabetic retinopathy. *Current Neuropharmacology*. 2016;**14**(8):810-825. DOI: 10.2174/1570159X14666160321122900
- [68] Rübsam A, Parikh S, Fort P. Role of inflammation in diabetic retinopathy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;**19**(4):942. DOI: 10.3390/ijms19040942
- [69] Díaz-Coránguez M, Ramos C, Antonetti DA. The inner blood-retinal barrier: Cellular basis and development. *Vision Research*. 2017;**139**:123-137. DOI: 10.1016/j.visres.2017.05.009
- [70] Gardner TW, Antonetti DA, Barber AJ, LaNoue KF, Levison SW. Diabetic retinopathy: More than meets the eye. *Survey of Ophthalmology*. 2002;**47**:S253-S262. DOI: 10.1016/S0039-6257(02)00387-9

- [71] Huang C, Lu H, Xu J, Yu H, Wang X, Zhang X. Protective roles of autophagy in retinal pigment epithelium under high glucose condition via regulating PINK1/Parkin pathway and BNIP3L. *Biological Research*. 2018;**51**(1):22. DOI: 10.1186/s40659-018-0169-4
- [72] Daruich A, Matet A, Moulin A, Kowalczyk L, Nicolas M, Sellam A, et al. Mechanisms of macular edema: Beyond the surface. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2018;**63**:20-68. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2017.10.006
- [73] Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell and Tissue Research*. 2003;**314**(1):15-23. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00441-003-0745-x>
- [74] Park DY, Lee J, Kim J, Kim K, Hong S, Han S, et al. Plastic roles of pericytes in the blood-retinal barrier. *Nature Communications*. 2017;**8**(1):15296. DOI: 10.1007/s00441-003-0745-x
- [75] Mao XB, You ZP, Wu C, Huang J. Potential suppression of the high glucose and insulin-induced retinal neovascularization by Sirtuin 3 in the human retinal endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;**482**(2):341-345. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.11.065
- [76] Li J, Yu S, Ying J, Shi T, Wang P. Resveratrol prevents ROS-induced apoptosis in high glucose-treated retinal capillary endothelial cells via the activation of AMPK/Sirt1/PGC-1 α pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;**2017**:1-10. DOI: 10.1155/2017/7584691
- [77] Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*. 2011;**13**(2):132-141. DOI: 10.1038/ncb2152
- [78] Niu C, Chen Z, Kim KT, Sun J, Xue M, Chen G, et al. Metformin alleviates hyperglycemia-induced endothelial impairment by downregulating autophagy via the hedgehog pathway. *Autophagy*. 2019;**15**(5):843-870. DOI: 10.1080/15548627.2019.1569913
- [79] Simó R, Villarreal M, Corraliza L, Hernández C, García-Ramírez M. The retinal pigment epithelium: Something more than a constituent of the blood-retinal barrier-implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010;**2010**:190724. DOI: 10.1155/2010/190724
- [80] Xu H-Z, Le Y-Z. Significance of outer blood-retina barrier breakdown in diabetes and ischemia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011;**52**(5):2160. DOI: 10.1167/iovs.10-6518
- [81] Xia T, Rizzolo LJ. Effects of diabetic retinopathy on the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Vision Research*. 2017;**139**:72-81. DOI: 10.1016/j.visres.2017.02.006
- [82] Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews*. 2005;**85**(3):845-881. DOI: 10.1152/physrev.00021.2004
- [83] Amram B, Cohen-Tayar Y, David A, Ashery-Padan R. The retinal pigmented epithelium – From basic developmental biology research to translational approaches. *The International Journal of Developmental Biology*. 2017;**61**(3-4-5):225-234. DOI: 10.1387/ijdb.160393ra
- [84] Viores SA, Gadegbeku C, Campochiaro PA, Green WR. Immunohistochemical localization of blood-retinal barrier breakdown in

Deficient Autophagy Contributes to the Development of Diabetic Retinopathy
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.89339>

- human diabetics. *The American Journal of Pathology*. 1989;**134**(2):231-235
- [85] Zhang W, Song J, Zhang Y, Ma Y, Yang J, He G, et al. Intermittent high glucose-induced oxidative stress modulates retinal pigmented epithelial cell autophagy and promotes cell survival via increased HMGB1. *BMC Ophthalmology*. 2018;**18**(1):192. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.01.034
- [86] Boya P, Esteban-Martínez L, Serrano-Puebla A, Gómez-Sintes R, Villarejo-Zori B. Autophagy in the eye: Development, degeneration, and aging. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2016;**55**:206-245. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2016.08.001
- [87] Chen Q, Tang L, Xin G, Li S, Ma L, Xu Y, et al. Oxidative stress mediated by lipid metabolism contributes to high glucose-induced senescence in retinal pigment epithelium. *Free Radical Biology & Medicine*. 2019;**130**:48-58. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.419
- [88] Shi H, Zhang Z, Wang X, Li R, Hou W, Bi W, et al. Inhibition of autophagy induces IL-1 β release from ARPE-19 cells via ROS mediated NLRP3 inflammasome activation under high glucose stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015;**463**(4):1071-1076. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.060
- [89] Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. *Cell Death and Differentiation*. 2015;**22**(3):377-388. DOI: 10.1038/cdd.2014.150
- [90] Zhang Y, Xi X, Mei Y, Zhao X, Zhou L, Ma M, et al. High-glucose induces retinal pigment epithelium mitochondrial pathways of apoptosis and inhibits mitophagy by regulating ROS/PINK1/Parkin signal pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;**111**:1315-1325. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.01.034
- [91] Reichenbach A, Bringmann A. Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina. *Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina*. New York, NY: Springer New York; 2010. DOI: 10.1007/978-1-4419-1672-3
- [92] Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2016;**51**:1-40. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.06.003
- [93] Pow DV, Crook DK. Direct immunocytochemical evidence for the transfer of glutamine from glial cells to neurons: Use of specific antibodies directed against the stereoisomers of glutamate and glutamine. *Neuroscience*. 1996;**70**(1):295-302. DOI: 10.1016/0306-4522(95)00363-N
- [94] Powell C, Grant AR, Cornblath E, Goldman D. Analysis of DNA methylation reveals a partial reprogramming of the Muller glia genome during retina regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;**110**(49):19814-19819. DOI: 10.1073/pnas.1312009110
- [95] Schütte M, Werner P. Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina. *Neuroscience Letters*. 1998;**246**(1):53-56. DOI: 10.1016/S0304-3940(98)00229-8
- [96] Long KO, Fisher SK, Fariss RN, Anderson DH. Disc shedding and autophagy in the cone-dominant ground squirrel retina. *Experimental Eye Research*. 1986;**43**(2):193-205. DOI: 10.1016/S0014-4835(86)80087-2
- [97] Wang JS, Kefalov VJ. The cone-specific visual cycle. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2011;**30**(2):115-128. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2010.11.001

[98] Bai Y, Ma J, Guo J, Wang J, Zhu M, Chen Y, et al. Müller cell-derived VEGF is a significant contributor to retinal neovascularization. *The Journal of Pathology*. 2009;**219**(4):446-454. DOI: 10.1002/path.2611

[99] Devi TS, Lee I, Hüttemann M, Kumar A, Nantwi KD, Singh LP. TXNIP links innate host defense mechanisms to oxidative stress and inflammation in retinal Muller glia under chronic hyperglycemia: Implications for diabetic retinopathy. *Experimental Diabetes Research*. 2012;**2012**:1-19. DOI: 10.1155/2012/438238

IntechOpen