

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas

MARCELLA NEVES DÁTILO

Ação anti-inflamatória de ácidos graxos insaturados na retina de camundongos obesos e diabéticos tipo 2: Papel dos receptores acoplados à proteína G (GPCR's).

Anti-inflammatory action of unsaturated fatty acids in the retina of obese and diabetic type 2 mice: Role of G protein-coupled receptors (GPCR's).

Limeira
2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas



MARCELLA NEVES DÁTILO

Ação anti-inflamatória de ácidos graxos insaturados na retina de camundongos obesos e diabéticos tipo 2: Papel dos receptores acoplados à proteína G (GPCR's).

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo, na área de concentração: Ciências Nutricionais e Metabolismo.

Orientador: Prof. Dr. Dennys Esper Corrêa Cintra

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Marcella Neves Dátilo, e orientada pelo Prof. Dr. Dennys Esper Corrêa Cintra.

Limeira
2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

D262a Dátilo, Marcella Neves, 1990-
Ação anti-inflamatória de ácidos graxos insaturados na retina de camundongos obesos e diabéticos tipo 2 : papel dos receptores acoplados à proteína G (GPCR's) / Marcella Neves Dátilo. – Limeira, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Dennys Esper Corrêa Cintra.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Ômega-3. 2. Retinopatia diabética. 3. GPR120. 4. GPR40. 5. Nutrigenômica. I. Cintra, Dennys Esper Corrêa, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Anti-inflammatory action of unsaturated fatty acids in the retina of obese and diabetic type 2 mice : role of G protein-coupled receptors (GPCR)

Palavras-chave em inglês:

Omega-3

Diabetic retinopathy

GPR120

GPR40

Nutrigenomics

Área de concentração: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Dennys Esper Corrêa Cintra

Diego Andreazzi Duarte

Leandro Pereira de Moura

Data de defesa: 05-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Autora: Marcella Neves Dátilo

Título: Ação anti-inflamatória de ácidos graxos insaturados na retina de camundongos obesos e diabéticos tipo 2: Papel dos receptores acoplados à proteína G (GPCR's).

Natureza: Dissertação de mestrado

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas - UNICAMP

Data de Defesa: Limeira, 05 de fevereiro de 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Dennys Esper Corrêa Cintra

Assinatura

Prof. Dr. Leandro Pereira de Moura

Assinatura

Dr. Diego Andreazzi Duarte

Assinatura

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

Dedico este trabalho à família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por guiar meus caminhos e por ter colocado ao meu lado pessoas tão especiais, sem as quais eu não teria dado conta!

Aos animais experimentais, que possibilitaram a construção deste trabalho.

Aos meus pais, Marcelo e Cristiane, meu infinito agradecimento. Por serem meu alicerce e meus maiores exemplos de vida. Aos meus irmãos, Lethicia e Guilherme, por serem meus confidentes e meus parceirinhos de vida. Agradeço pela família que somos, pelo amor incondicional, por acreditarem no meu sonho e me incentivarem a ser melhor a cada dia.

A meu namorado, Guilherme, por ser essencial na minha vida. Agradeço as horas de laboratório e todos os momentos fora dele. Obrigada pelo seu companheirismo, pelo carinho, pela paciência, pela compreensão e por me fazer acreditar que eu posso ser mais do que imagino. Sem você, essa caminhada não teria a mesma cor.

A minha madrinha, Gislaine, pelas palavras de sabedoria, pela ternura e pela fé depositada em mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Dennys Cintra, por ter acreditado no meu potencial e permitido a realização deste trabalho.

Ao Diego, pela parceria e amizade que construímos. Obrigada pelo seu apoio imensurável e por tudo que fez por mim ao longo desses anos.

A minha melhor amiga, Isabela, por sua lealdade, sua verdade e sua cumplicidade. Obrigada por estar ao meu lado há mais de uma década e continuar sendo um terço meu.

Ao LabGeN, por ter me proporcionado anos e encontros memoráveis.

As minhas queridas, Patricia, Ruth, Marcella, Camilla e Susana, por tornarem meus dias de pesquisa infinitamente mais leves e muito mais prazerosos. Obrigada pelas noites, pelos finais de semana, pelas viagens e por todos os momentos. Levarei vocês para sempre comigo.

A Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Junqueira Vasques, por ser meu exemplo de professora, de pesquisadora, de pensadora e de ternura. Obrigada por ter me aproximado da pesquisa, por ter me dado oportunidades únicas, por todas as palavras de incentivo, por me mostrar que a gente pode ser mais e que podemos sempre fazer melhor.

A todos os integrantes do LabGeN e LabMEx, pelo suporte e pela parceria. Aos alunos e professores do CNEM, por contribuírem para a minha formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Introdução: A prevalência da obesidade tem atingido níveis alarmantes, contribuindo para o desenvolvimento de diversas comorbidades, entre elas a que mais se destaca é o diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Dentre as principais complicações associadas ao DM2 encontra-se a retinopatia que, atualmente, é considerada uma das principais causas de cegueira em indivíduos adultos. O processo inflamatório crônico e de baixo grau presente na obesidade, favorece o descontrole glicêmico que, a longo prazo, contribui para o desencadeamento da retinopatia. Em linhas gerais, os ácidos graxos ômega-3 são amplamente investigados na literatura devido ao seu potencial anti-inflamatório. O mecanismo de ação do ômega-3 ocorre por meio de seus receptores específicos, GPR120/GPR40, que são capazes de desarticular a cascata inflamatória, levando a diminuição da inflamação em tecidos periféricos e no sistema nervoso central. Contudo, a presença e a ação desses receptores no tecido retiniano ainda é pouco descrita e investigada.

Objetivo: Avaliar a presença e o papel dos receptores para ácidos graxos ômega-3 no controle do processo inflamatório da retina de animais obesos e resistentes à insulina.

Metodologia: Camundongos Swiss machos, com 4 semanas de idade foram distribuídos em 2 grupos: controle (CT) e obeso (HF). O grupo controle foi mantido em ração comercial e o obeso exposto a dieta rica em gordura saturada por 9 semanas. Após esse período foi realizado teste de tolerância à insulina (TTI) para analisar a homeostase glicêmica. Posteriormente, os animais expostos a dieta rica em gordura foram distribuídos randomicamente nos grupos: dieta rica em gordura (HF) e dieta rica em gordura substituída em 10% de gordura por óleo de semente de linhaça, fonte de ômega-3 (HF+ ω 3), por nove semanas. Ao final do período experimental, os testes de tolerância à insulina e a glicose foram realizados (TTI e TTG, respectivamente) e a retina foi extraída para análises da expressão gênica e do conteúdo proteico dos receptores para ω 3 (GPR120 e GPR40), de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-10 e IL-1 β), TAK1

e do marcador de retinopatia diabética (VEGF). Para análise fisiológica da função visual, foi utilizado o teste de eletrorretinografia.

Resultados: Os animais expostos a dieta rica em gordura saturada (HF) apresentaram aumento da massa corporal, resistência à insulina e intolerância à glicose quando comparados ao grupo CT. Por outro lado, o grupo HF+ ω 3 apresentou redução na glicemia de jejum e maior tolerância à glicose em comparação com o grupo HF. Em relação aos dados moleculares, mostramos que a retina dos animais era capaz de expressar os genes para os receptores GPR120 e GPR40, além disso, os animais expostos ao óleo de semente de linhaça apresentaram maior conteúdo proteico de GPR120 em relação ao grupo HF. Em relação às citocinas pró-inflamatórias, o grupo HF apresentou aumento na expressão gênica de TNF- α e IL-1 β , quando comparado ao CT. E o grupo HF+ ω 3, redução na expressão gênica das citocinas quando comparados ao grupo HF. A respeito do conteúdo proteico, os animais do grupo HF apresentaram aumento no conteúdo proteico de IL-1 β , p-TAK1 e VEGF quando comparado ao grupo CT. Além disso, o grupo HF+ ω 3 apresentou redução no conteúdo proteico de TNF- α , IL-1 β , p-TAK e VEGF em relação ao grupo HF. No que se refere ao receptor GPR40 e a citocina IL-10, as diferentes dietas experimentais não foram capazes de modular seu conteúdo proteico. Em relação ao teste funcional retiniano, animais do grupo HF apresentaram menor potencial oscilatório quando comparado ao grupo CT. Entretanto, a dieta rica em óleo de semente de linhaça foi capaz de proteger contra o desenvolvimento da retinopatia.

Conclusão: A dieta *high-fat* foi capaz de induzir inflamação e danos na retina neural em camundongos *Swiss*. Por outro lado, a substituição em 10% por óleo de semente de linhaça foi capaz de reduzir a intolerância à glicose, expressão gênica e conteúdo proteico de marcadores inflamatórios e do fator de crescimento (VEGF). Sendo assim, nossos achados indicam que a dieta contendo óleo de semente de linhaça pode retardar o desenvolvimento de retinopatia diabética em camundongos obesos alimentados com dieta *high-fat*.

Palavras-chave: Ômega-3; Retinopatia Diabética; GPR120; GPR40; Resistência à insulina; Nutrigenômica.

ABSTRACT

Introduction: The prevalence of obesity has reached alarming levels, contributing to the development of several comorbidities specially type 2 diabetes (T2D). Among the main complications associated with DM2 lies retinopathy, which is currently considered one of the main causes of blindness in adults. The chronic and low-grade inflammatory process present in obesity favors the loss of glycemic control that, in the long term, contributes to the onset of retinopathy. In general, omega-3 fatty acids are widely investigated in the literature because of their anti-inflammatory potential. The mechanism of action of omega-3 fatty acids occurs through their specific receptors, GPR120 / GPR40, which are able to disarticulate the inflammatory cascade leading to decreased inflammation in peripheral tissues and the central nervous system. However, the presence and action of these receptors on retinal tissue is still poorly described and investigated.

Objective: Evaluate the presence and role of the omega-3 fatty acids receptors in the control of the retinal inflammatory process of obese and insulin resistant animals.

Methods: Four-week-old male Swiss were randomly distributed into two groups: control (CT) and obese (HF). The control group was maintained in standard chow diet and the obese group was exposed to a high fat diet for 9 weeks. After this period, an insulin tolerance test (ITT) was performed to analyze glucose homeostasis. After this, animals fed a high-fat diet were randomly distributed into two groups: maintained for another 9 weeks on HF diet (HF) or fed a diet substituted in 10% of lard to flaxseed oil, a source of omega-3 (HF+w3) for eight weeks. At the end of the experimental period, animals were submitted to an insulin and glucose tolerance tests (ITT, and GTT, respectively) and the retinas were extracted to analyze gene and protein expression of omega-3 fatty acids receptors (GPR120/GPR40), inflammatory cytokines (TNF- α , IL-10 e IL-1 β), TAK1 and the classical markers of diabetic retinopathy (VEGF). For the physiological analysis of visual function, we used a full flash electroretinography test.

Results: The animals exposed to the high-fat diet (HF) presented an increase in body mass, insulin resistance and glucose intolerance when compared to the CT group. On the other hand, the HF+ ω 3 group showed a reduction in fasting glucose and an improve in glucose tolerance compared to the HF group. In relation to the molecular data, we showed that animals retina were able of expressing the genes for GPR120 and GPR40 receptors and the animals exposed to the flaxseed oil showed an increase in GPR120 protein content compared to HF group. In relation to the proinflammatory cytokines, the HF group showed an increase in the gene expression of TNF- α and IL-1 β when compared to CT. The HF+ ω 3 group showed a reduction in the cytokine gene expression when compared to the HF group. Regarding the protein content, the animals of the HF group showed an increase in the protein content of IL-1 β , p-TAK1 and VEGF when compared to the CT group. In addition, the HF+ ω 3 group showed a reduction in the protein content of TNF- α , IL-1 β , p-TAK and VEGF in relation to the HF group. In relation to GPR40 receptor and IL-10 cytokine, the different experimental diets were not able to modulate their protein content. Regarding the retinal functional test, the animals of the HF group showed a decrease in the lower oscillatory potential when compared to the CT group. However, the diet rich in flax seed oil was able to protect against the development of retinopathy.

Conclusion: The high-fat diet was able to induce inflammation and damage in the neural retina of Swiss mice. On the other hand, the substitution of 10% of lard to flaxseed oil was able to reduce glucose intolerance, gene expression and protein content of inflammatory markers and growth factors (VEGF). Thus, our findings indicate that the diet containing flaxseed oil can slow the development of diabetic retinopathy in obese mice fed a high-fat diet.

Keywords: Omega-3; Diabetic Retinopathy; GPR120; GPR40; Insulin Resistance; Nutrigenomics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura Retiniana.....	24
Figura 2	Aspectos moleculares da RD	27
Figura 3	Ácidos graxos ômega-3 e a desarticulação da sinalização inflamatória.....	30
Figura 4	Desenho Experimental	33
Figura 5	Associação GPR120/ β -arrestina2 após gavagem com óleo de semente de linhaça	39
Figura 6	Caracterização metabólica do modelo de indução de obesidade: Evolução ponderal e homeostase glicêmica induzida pela dieta HF	41
Figura 7	Evolução ponderal e ingestão alimentar após tratamento com dieta HF+ ω 3.....	42
Figura 8	Homeostase glicêmica após tratamento com dieta HF+ ω 3	43
Figura 9	Receptores para ácidos graxos após tratamento com dieta HF+ ω 3.....	45
Figura 10	Expressão gênica de citocinas inflamatórias após tratamento com dieta HF+ ω 3.....	46
Figura 11	Conteúdo proteico de citocinas, p-TAK1 e VEGF após tratamento com dieta HF+ ω 3	48
Figura 12	Avaliação funcional retiniana através do teste de eletrorretinografia (ERG)	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dietas Experimentais	34
-----------------	----------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs	Produtos de glicação avançada
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AP-1	Proteína ativadora 1
AVC	Acidente vascular cerebral
COX-2	Ciclooxigenase-2
CT	Dieta padrão
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
EGF	Fator endotelial de crescimento
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
HF	Dieta rica em gordura saturada
HF+ω3	Dieta substituída em 10% de gordura animal por óleo de semente de linhaça
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular 1
IDF	Federação Internacional do Diabetes
IKK	Inibidor kinase kappa
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-1R	Receptor de Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IR	<i>Inner retina</i>
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
IκBα	Ikappa quinase B alfa
IRAK	Quinase associada ao receptor de interleucina 1

JAK	Janus quinase
JNK	C-Jun-N-terminal quinase
LPS	Lipopolissacarídeo
MyD88	Proteína de resposta primária à diferenciação mielóide 88
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
RAGE	Receptor para produto de glicação avançada
RD	Retinopatia diabética
RDNP	Retinopatia diabética não proliferativa
RDP	Retinopatia diabética proliferativa
RPE	Epitélio pigmentado retiniano
TAB1/2	TGF-beta 1/2 ativada por quinase
TAK1	Fator de crescimento transformador beta ativado por kinase-1
TTI	Teste intraperitoneal de tolerância à insulina
TTG	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose
TLR	Receptores do tipo <i>Toll</i>
TLR4	Receptor do tipo <i>Toll</i> 4
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR	Receptor de TNF
TRAF6	Fator 6 associado ao receptor de TNF
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
ω3	Ômega 3

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
μ	Micro
ω	Ômega

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Epidemiologia	18
1.2 Fisiopatologia do DM2	19
1.3 Retinopatia diabética	21
1.4 Retina	22
1.5 Fisiopatologia da RD	24
1.6 Terapia na RD	26
1.7 Ácidos graxos ômega-3 (ω 3)	28
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVO GERAL	31
3.1 Objetivos específicos	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Modelo animal	32
4.2. Delineamento experimental	32
4.3. <i>Time course</i> para determinar a ativação de GPR120 na retina.....	33
4.4. Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TTI)	34
4.5. Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TTG)	35
4.6. Teste eletrorretinograma (ERG).....	35
4.7. Extração Tecidual e Quantificação Proteica	36
4.8. Imunoprecipitação	36
4.9. <i>Imunoblotting</i>	37
4.10. <i>Real Time</i> PCR quantitativo - RT-qPCR	37
4.11. Imunofluorescência	38
4.12. Análise Estatística	28
5. RESULTADOS	39
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. Introdução

1.1 Epidemiologia

A prevalência do diabetes mellitus (DM) têm crescido a níveis alarmantes. O levantamento realizado pela *International Diabetes Federation* (IDF) no ano de 2015, mostrou que 415 milhões de indivíduos ao redor do planeta eram portadores da doença, sendo o Brasil o quarto país no *ranking* mundial com aproximadamente 14,3 milhões de diabéticos. Estima-se que nos próximos 25 anos, 642 milhões de pessoas, entre 20 e 79 anos, serão portadoras de DM¹. A doença é caracterizada pela incapacidade de captação de glicose pelas células dependentes de insulina. Isso pode ocorrer por deficiência na produção de insulina pelas células β -pancreáticas, caracterizando o diabetes tipo 1 (DM1) ou pela resistência a ação ao hormônio insulina, caracterizando o diabetes tipo 2 (DM2)². A incidência do DM1 abrange aproximadamente 10% dos casos de diabetes, enquanto o DM2 acomete os outros 90%³.

Diversos fatores contribuem para o desenvolvimento do DM2, dentre eles destacam-se a predisposição genética, fatores psicossociais, sedentarismo, maior consumo de energia oriundas de gorduras predominantemente saturadas, sobrepeso e, principalmente, a obesidade^{4,5}. A obesidade, por sua vez, é definida pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo e é comumente diagnosticada pela relação entre o peso e altura do indivíduo, caracterizada pelo Índice de Massa Corporal (IMC), no qual valores a partir de 30 kg/m² apontam obesidade⁶. Segundo o relatório de 2012 da Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência da obesidade quase dobrou entre os anos de 1980 e 2008, com projeções de aproximadamente 700 milhões de indivíduos considerados obesos para 2025⁶. Além de estar fortemente relacionada com o

desenvolvimento do DM2, a obesidade também contribui para o desenvolvimento de outras doenças como doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, doenças neurodegenerativas entre outras⁷⁻⁹.

Em relação ao DM, sabe-se que ser portador da doença aumenta o risco de morte prematura e, atualmente, o diabetes está classificado entre as dez maiores causas de morte no mundo. Em 2015, o diabetes e complicações associadas foram responsáveis por aproximadamente 5 milhões de mortes, ultrapassando o número de óbitos causados pela síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e tuberculose¹. Pacientes diabéticos apresentam maiores chances de desenvolver complicações como acidente vascular cerebral (AVC), infarto agudo do miocárdio, doenças coronarianas e câncer. Além disso, complicações tardias associadas ao DM como neuropatia, nefropatia e retinopatia apresentam grande impacto na qualidade de vida de pacientes diabéticos além e contribuir de maneira significativa para o aumento dos custos destinados para o tratamento dos portadores da doença¹⁰.

1.2 Fisiopatologia do DM2

Dentre o conjunto de doenças associadas à obesidade ou mesmo aos desfechos associados ao DM2, parece haver um fator em comum para o desenvolvimento dessas condições, a inflamação crônica e de baixo grau. Até o fim da década de 2000 acreditava-se que proteínas de cunho inflamatório surgiam com o aumento da massa adiposa¹¹, e que seriam as responsáveis pelo desenvolvimento da doença. Contudo, diversas evidências posteriores apontaram para o surgimento de um processo inflamatório de baixo grau, mediante exposição de poucos dias¹² e, até mesmo horas¹³, à dietas ricas em gorduras saturadas, como é o caso da dieta ocidental ou presente nos países

industrializados. Atualmente, compreende-se que o consumo de gorduras saturadas seja o fator iniciador do processo inflamatório e o excesso de massa adiposa contribui para a perpetuação dessa inflamação, caracterizando o caráter crônico da doença¹⁴.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), secretado tanto pelo tecido adiposo hipertrofiado quanto pela ativação de suas vias específicas de transdução celular de sinais está intimamente associado ao desenvolvimento das comorbidades anteriormente mencionadas. Ele possui papel fundamental no mecanismo de resistência à insulina, pois sua cascata de sinalização culmina na ativação da proteína transformador beta ativado por kinase-1 (TAK1), que provoca a ativação de proteínas serinas quinases, como o inibidor da kinase kappa (IKK) e o C-Jun N-terminal quinase (JNK). Essas proteínas são capazes de inibir a transdução da sinalização de insulina, por fosforilar em serina no resíduo 307 o substrato de receptor de insulina 1 (IRS-1). Com isso, ocorre o impedimento da interação do IRS-1 com a subunidade β do receptor de insulina, interrompendo a propagação da via¹⁵⁻¹⁸. Essas alterações causam prejuízo na transdução do sinal da insulina, prejudicando diversas ações deste hormônio, inclusive a captação de glicose. Concomitantemente, no intuito de compensar o estado hiperglicêmico, as células β pancreáticas aumentam a produção de insulina para reestabelecer a homeostase glicêmica. Com isso as células β se tornam hipertrofiadas, disparando sinais pró-inflamatórios que, por vezes, culminam com a ativação de vias pró-apoptóticas, agravando ainda mais o quadro de DM2¹⁸.

Nesse contexto, o sistema imune inato desempenha um papel importante na patogênese do DM2 e de doenças neurodegenerativas¹⁹. Entre as famílias

de receptores responsáveis pela resposta imunológica, se destacam os Receptores do tipo *Toll* (TLRs), que são proteínas transmembrana com função de reconhecer patógenos e propagar o sinal inflamatório por meio da produção de citocinas²⁰. Esses receptores do tipo *Toll* reconhecem não só o lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana de bactérias gram negativas como também ácidos graxos saturados oriundos da dieta, o que torna possível a ativação da resposta inflamatória mesmo na ausência de patógenos²¹.

Os domínios citoplasmáticos do TLR-4 são reconhecidos pela proteína de resposta primária à diferenciação mieloide 88 (MyD88), que ao se associar ao TLR, desencadeia uma cascata de sinalização que culmina na fosforilação e degradação do inibidor do fator de transcrição nuclear kappa B alpha (I κ B α), permitindo que o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), agora ativado, migre ao núcleo e estimule a produção de diversos mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-6, IL-1 β , óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2)²²⁻²⁴.

A ativação do sistema imune inato também pode interferir diretamente na sinalização da insulina por meio da ativação direta da proteína JNK e fosforilação dos substratos do receptor de insulina em serina 307^{18,20,25}.

1.3 Retinopatia diabética

Entre as principais complicações tardias associadas ao diabetes, a retinopatia se destaca e tem sido alvo de diversas pesquisas, pois a progressão natural da doença culmina, por vezes, em cegueira diabética^{26,27}. A retinopatia diabética (RD) acomete mais de 77% dos portadores de DM, além de ser uma das principais causas de cegueira em indivíduos em idade produtiva, sendo responsável por 4,8% das 37 milhões de perdas de visão ao redor do mundo²⁸.

A RD é definida através de alterações microvasculares retiniana e hiperglicemia crônica associada a inflamação subclínica que está fortemente correlacionada com a fisiopatologia da doença. A RD tem sua fase inicial denominada como retinopatia diabética não proliferativa (RDNP), podendo evoluir para um estágio mais avançado intitulado retinopatia diabética proliferativa (RDP)²⁹.

A RDNP é caracterizada pela alteração na vasculatura retiniana, 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. O surgimento de 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 visão²⁹⁻³¹. Para que seja possível a total compreensão do curso da doença, é necessário ter um panorama geral do funcionamento do tecido, como descrito a seguir.

1.4 Retina

A retina é uma estrutura ocular composta por neurônios que são responsáveis por detectar luz e cor e converter a imagem em estímulos nervosos que serão enviados, através do nervo óptico, ao córtex visual que é responsável pelo processamento das informações e organização espacial do cenário visual. A retina contém um conjunto de camadas que compõe a retina neural e o epitélio pigmentado retiniano³² (Figura 1).

A luz atravessa as diversas camadas retinianas, até atingir a camada de cones e bastonetes, onde se inicia o processo de transdução de sinal³³. Subsequente à camada de fotorreceptores, está localizado o epitélio pigmentado retiniano (*retinal pigment epithelium* – RPE), constituído por uma única camada celular que contém inúmeros melanossomos. O pigmento negro da RPE impede a reflexão da luz por todo o globo ocular, além disso o RPE também é responsável pela difusão de nutrientes à neuroretina³⁴.

Os cones e bastonetes possuem fotopsinas e rodopsina, respectivamente, que são substâncias químicas fotossensíveis e ao serem expostas à luz são decompostas. Esse processo irá possibilitar a transmissão do sinal através de condução elétrica às células bipolares e horizontais, presentes na camada plexiforme externa. As células horizontais, por sua vez, são capazes de transmitir sinais horizontalmente de cones e bastonetes às células bipolares. Ao serem excitadas, as células bipolares, fazem sinapse com células amácrinas e ganglionares. Essas, são capazes de transmitir sinais eferentes da retina através do nervo óptico até o córtex visual^{32,35}.

Células da glia também estão presentes no tecido retiniano. Células de Müller são as principais células macrogliais da retina, elas se estendem por toda a neuroretina e são responsáveis pelo transporte de nutrientes, água e resíduos entre os vasos retinianos e os neurônios, sendo extremamente importantes na regulação da homeostase do tecido, atuando diretamente na rigidez da barreira

retiniana³⁶. Células do sistema imunológico da retina, são denominadas micróglias e sua função primordial é a fagocitose de debris celulares³⁷.

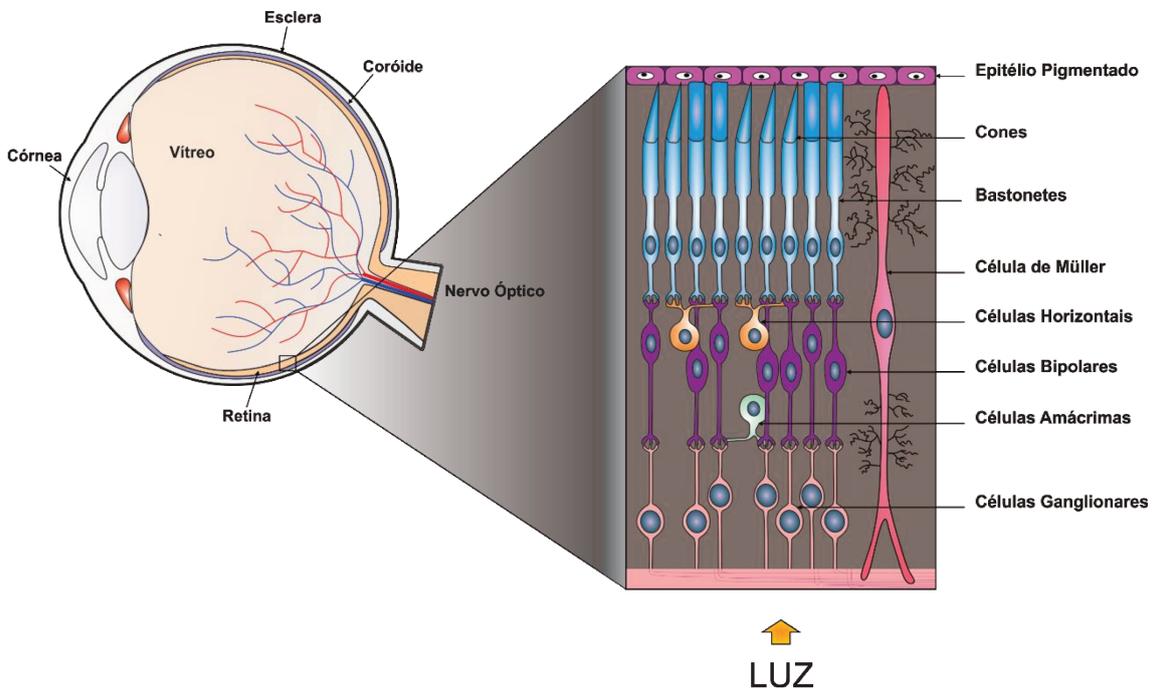


Figura 1 - Estrutura retiniana.

1.5 Fisiopatologia da RD

Diversas alterações moleculares estão diretamente relacionadas com o surgimento da RD, dentre elas destacam-se o aumento da inflamação, o acúmulo de produtos de glicação avançada (AGEs), estresse oxidativo e aumento da secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)²⁹.

A formação e o acúmulo de AGEs ocorre de maneira acelerada no diabetes devido aos elevados níveis de glicose plasmática. Eles são formados através de uma ligação não enzimática de açúcares reduzidos ao grupo amino terminal de proteínas, no seu estado pós-transcricional³⁸ e são capazes de se ligar aos seus receptores específicos, os receptores para produtos de glicação avançada (RAGE). Os RAGE são receptores transmembrana da superfamília das imunoglobulinas e são expressos em diversos tipos celulares retinianos,

porém seu maior conteúdo proteico é localizado nas células gliais de Müller. Após sua ativação, o receptor dispara uma cascata de sinalização que culmina no aumento de produção de espécies reativas de oxigênio, moléculas de adesão, fatores de crescimento e citocinas inflamatórias³⁹.

Processos inflamatórios estão fortemente relacionados com alterações moleculares e estruturais envolvidas na gênese da RD. A cascata de sinalização coordenada pelos receptores TLRs resulta na migração do fator de transcrição NF- κ B ao núcleo, que é responsável pela expressão de diversas proteínas envolvidas nos estágios iniciais da retinopatia como, TNF- α , IL-1 β , iNOS e moléculas de adesão. As citocinas inflamatórias são capazes de, ao se ligarem aos seus receptores específicos, aumentar a transcrição de genes pró-inflamatórios e pró-apoptóticos resultando em maior permeabilidade vascular, apoptose e neurodegeneração^{40,41}. O aumento de iNOS, por sua vez, é capaz de induzir alterações estruturais ou funcionais nos capilares retinianos, como degeneração capilar e perda de pericitos⁴².

As moléculas de adesão (*intercellular adhesion molecule* - ICAM-1; *vascular cell adhesion molecule* - VCAM-1), são importantes biomarcadores da RD. Ao serem expressas são capazes de perpetuar o ciclo inflamatório através do recrutamento de leucócitos^{18,43,44}. O VEGF, por sua vez, induz angiogênese, que é a característica primária da retinopatia diabética proliferativa. O VEGF pode ser produzido por células presentes em diversas camadas da retina como o epitélio pigmentado, células endoteliais, células gliais e ganglionares⁴⁵. Fechando o círculo vicioso, o VEGF também é descrito por aumentar o processo inflamatório intraocular, por meio do aumento da vaso-permeabilidade (Figura 2)⁴⁶.

1.6 Terapia na RD

A terapêutica tradicional, prevê utilização de corticosteroides de uso tópico ou cirurgias a laser. A corticoterapia parece auxiliar no retardo na progressão da doença retiniana *in vitro*²⁹, contudo, não parece ser capaz de bloquear outras vias inflamatórias também presentes na doença. Animais *knockout* para a proteína MyD88 também apresentam retardo na progressão de retinopatia¹⁹. Desta forma, vias não-canônicas presentes na inflamação poderiam também ser avaliadas como possíveis alvos para controle da progressão ou retardo da doença. Ainda, fármacos como o *aflibercept* e *ranibizumab*, inibidores específicos do VEGF, previnem a degeneração macular e oclusão de veias na retina, demonstrando benefícios aos portadores da doença, contudo, com alto custo financeiro e à longo prazo pacientes se tornam resistentes a esse tipo de tratamento⁴⁷.

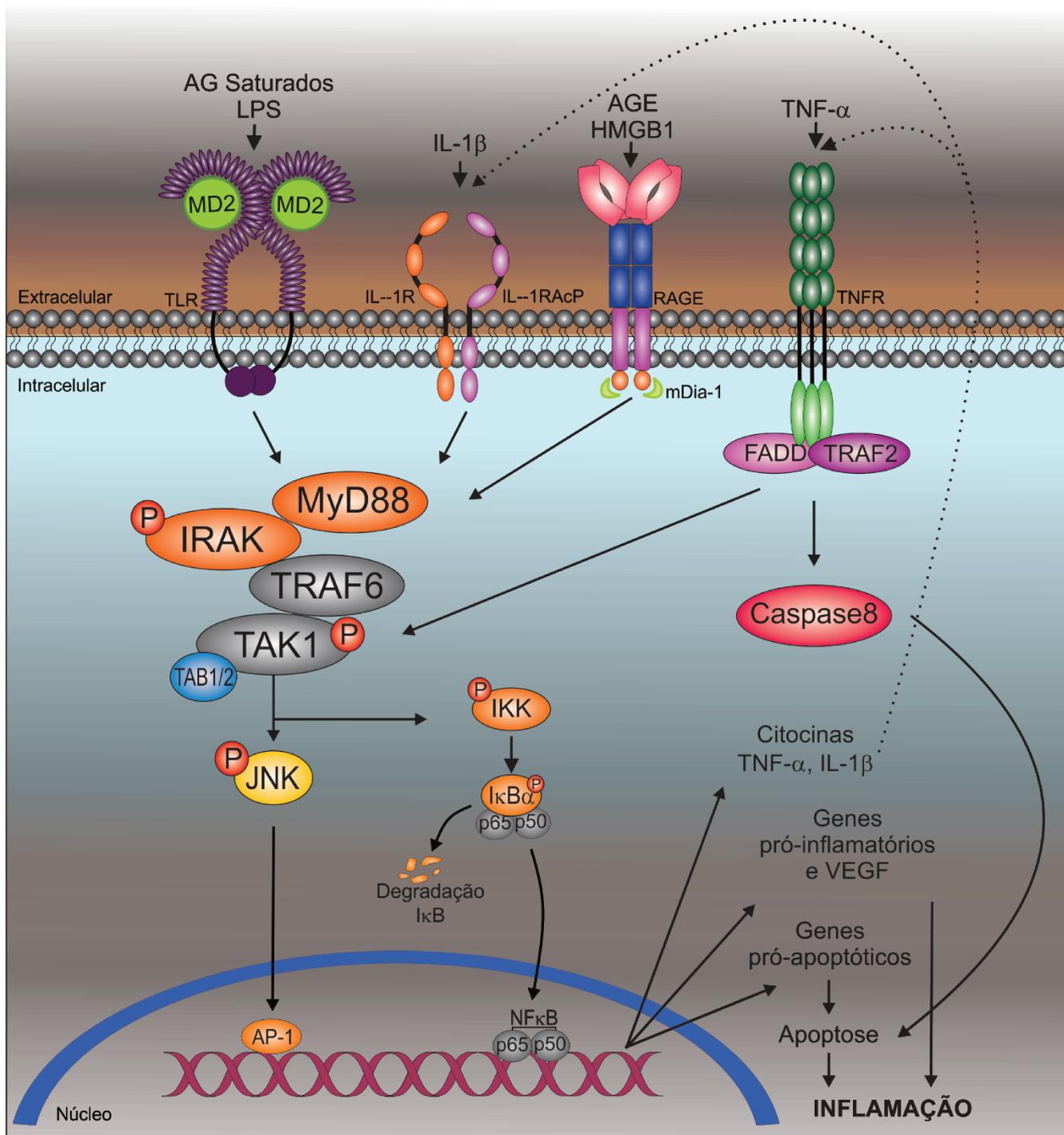


Figura 2 - Aspectos moleculares da RD. A sinalização coordenada pelos receptores TLR-4, RAGE, IL-1R e TNFR culminam na ativação e migração dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B ao núcleo celular, onde são capazes de controlar a expressão de um conjunto de proteínas responsáveis por perpetuar o ciclo inflamatório, levar ao aumento do estresse oxidativo e apoptose nos diversos tipos celulares retinianos.

1.7 Ácidos graxos ômega-3 (ω 3)

Ácidos graxos ω 3 são largamente reconhecidos na literatura e na clínica como agentes antitrombóticos e anti-inflamatórios há mais de 30 anos^{48,49}. Inicialmente foram apontados como inibidores da cascata inflamatória que derivava de prostaglandinas. Ao longo dos anos, pesquisas mostraram que o ômega-3 era capaz de interferir em pontos da cascata inflamatória anteriores às prostaglandinas⁵⁰. Por volta de 1990, foi apontado que tais ácidos eram capazes de inibir a expressão de proteínas como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), mas sem mecanismos descritos⁵¹⁻⁵³. Apenas em 2004 foi apontada potencialidade na inibição de proteínas como o I κ B- α e também do IKK, importantes proteínas da cascata inflamatória⁵⁴.

No entanto, em 2010 descobriu-se um receptor capaz de reconhecer tal ácido graxo, responsável por interferir na sinalização intracelular bloqueando a inflamação. Os receptores acoplados à proteína-G (GPCRs) têm sido amplamente estudados tendo em vista, principalmente, seu potencial farmacológico. Suas isoformas GPR40 e GPR120, tem mostrado poderosa ação anti-inflamatória em diversos tecidos através de seus principais ligantes não-farmacológicos, ácidos graxos poli-insaturados, ômega-3 e ômega-9^{49,55,56}, que ao se acoplarem ao receptor causam alteração conformacional no seu domínio intracelular, atraindo a proteína adaptadora β -arrestina-2, formando o complexo GPR/ β -arrestina.

Posteriormente, o complexo é internalizado e atrai para si as proteínas TAB1/2, comum às vias pró-inflamatórias do TNF- α e TLR-4. Com isso, ocorre a desarticulação dessas vias e a melhora da sensibilidade à insulina em diversos tecidos periféricos^{49,57-61} (Figura 3). A partir disso, outros ácidos graxos também foram descritos com potenciais anti-inflamatórios⁴⁹

Já há bastante tempo o ômega-3 é considerado um dos principais constituintes da retina, e sua deficiência na alimentação tem sido apontada como importante fator na redução da acuidade visual ou mesmo na perda da visão^{62,63}. Por outro lado, a reintrodução destes ácidos graxos na dieta pode, por vezes, reverter o processo de perda da visão ou, ao menos em parte, contribuir para estagnação no avanço da doença⁶⁴.

Apesar das evidências sobre os benefícios desses ácidos graxos sobre a função retiniana serem claras, ainda não há mecanismo descrito para explicar tais fenômenos.

Desse modo, nosso grupo de pesquisa acredita que os benefícios exercidos pelos ácidos graxos ômega-3 estão fortemente relacionados com a redução do tônus inflamatório, e provavelmente com a redução na síntese de fatores de crescimento, como o VEGF. Caso os receptores GPR120 e GPR40 sejam os reais mediadores desses efeitos, abre-se então uma avenida exploratória importante na terapêutica contra a retinopatia diabética, uma vez que diversos agonistas sintéticos e mais potentes têm sido produzidos. No entanto, apesar do estudo poder mostrar viabilidade de terapêutica medicamentosa, os ácidos graxos ômega-3 culminam por fortalecerem os instrumentos nutricionais na luta contra a progressão da retinopatia diabética.

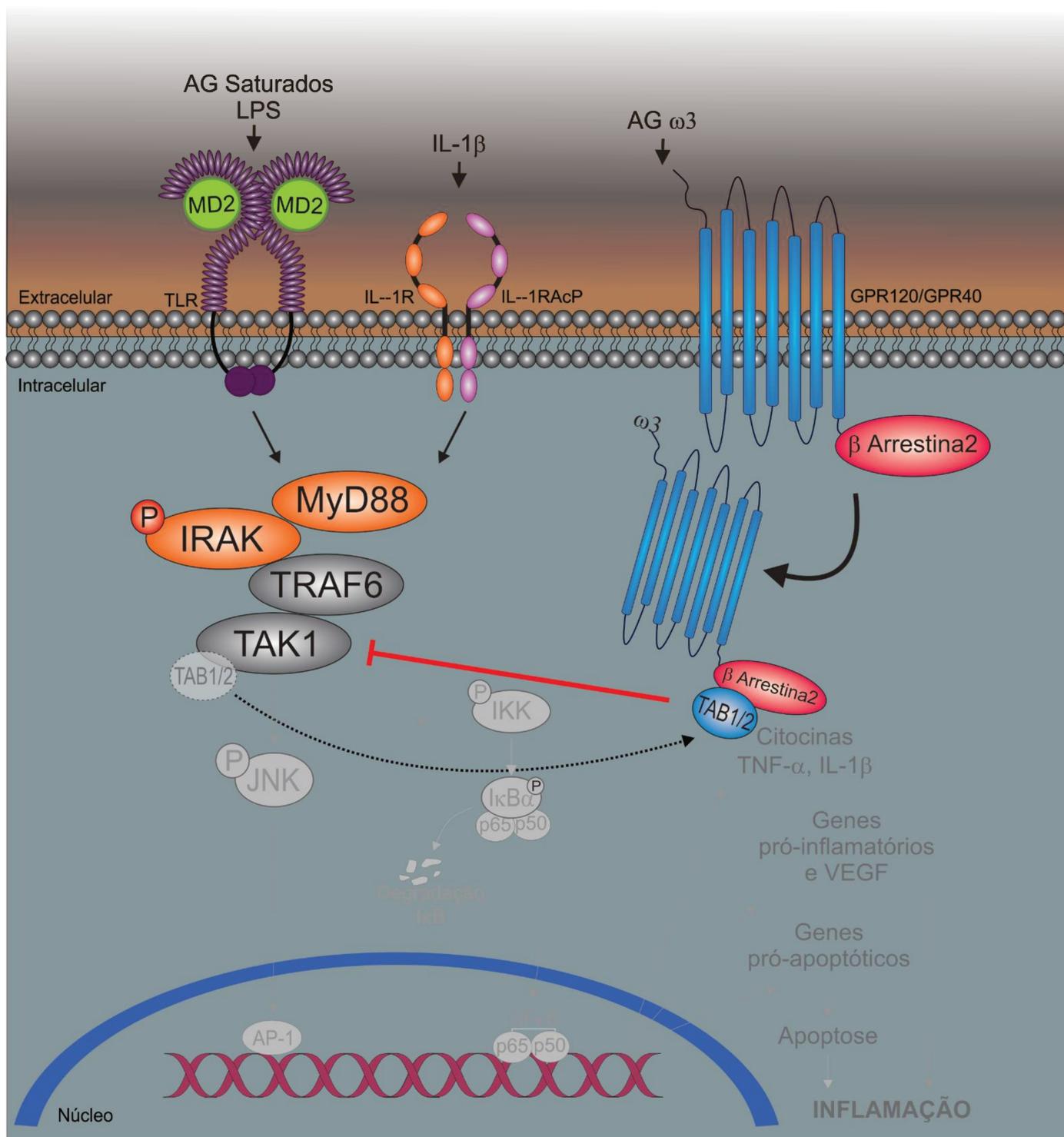


Figura 3 - Ácidos graxos ômega-3 e a desarticulação da sinalização inflamatória. Os ácidos graxos da família do ω 3 ao se ligarem aos seus receptores específicos, GPR120 e GPR40, atraem para si a proteína β -arrestina2 que, posteriormente, recruta para o complexo GPR/ β -arrestina2 a proteína TAB1/2, desarticulando a cascata inflamatória e impedindo a ativação e migração dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 ao núcleo celular.

2. Justificativa

Sendo a retinopatia diabética a maior responsável pela perda de visão em indivíduos adultos e uma das complicações mais comuns do diabetes, torna-se necessário a melhor compreensão da doença e seus mecanismos, bem como avaliação da ação dos ácidos graxos insaturados como importantes agentes terapêuticos na prevenção ou retardo na progressão da retinopatia diabética.

3. Objetivo Geral

Avaliar o efeito anti-inflamatório do óleo de semente de linhaça, rico em ômega-3, e investigar o papel dos receptores GPR120 e GPR40 na retina de camundongos obesos e resistentes à insulina.

3.1. Objetivos Específicos

- a. Avaliar o processo inflamatório retiniano induzido pelo consumo crônico de dieta rica em gordura saturada em animais obesos e resistentes à insulina mediado pelas proteínas IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10.
- b. Avaliar a expressão de fatores de crescimento (VEGF) na retina de animais obesos e resistentes à insulina.
- c. Avaliar o potencial anti-inflamatório do óleo de semente de linhaça, rico em ω 3, em animais obesos e resistentes à insulina.
- d. Mensurar a expressão dos receptores GPR120 e GPR40 após exposição a dieta rica em gordura saturada e a dieta substituída em 10% de gordura animal por óleo de semente de linhaça.
- e. Mapear a distribuição do GPR120/GPR40 através de imunofluorescência.
- f. Avaliar a função visual dos animais através de eletrorretinografia.

4. Materiais e Métodos

4.1. Modelo animal

Camundongos Swiss (n=180), foram adquiridos do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB), com 4 semanas de idade. Todos os animais foram mantidos individualmente em gaiolas de polietileno, com 12h no ciclo claro e 12h no ciclo escuro. O consumo alimentar foi avaliado a cada três dias e o peso corporal a cada sete dias. Todos os experimentos foram realizados com aprovação pelo comitê de ética da UNICAMP, registrado com o nº4197-1. O número de animais utilizados nos diferentes grupos experimentais foi definido de acordo com cada técnica experimental, e encontra-se discriminado no rodapé de cada resultado obtido.

4.2. Delineamento experimental

Os animais foram, inicialmente, separados em 2 grupos alimentados com: 1 – (CT) dieta padrão, ração comercial para roedores (Nuvilab®); 2 – (HF) dieta rica em gordura, por 9 semanas. Após esse período, os animais mantidos em dieta HF, foram randomizados nos grupos HF - dieta rica em gordura e, HF+ ω 3 - dieta substituída em 10% da gordura animal por óleo de linhaça (fonte de ômega-3), de acordo com a Tabela 1. Os animais foram mantidos nas seguintes dieta por mais 9 semanas. Posteriormente o teste de tolerância à insulina e à

glicose foram realizados. Ao final do período experimental os animais foram sacrificados e as retinas extraídas (Figura 4).

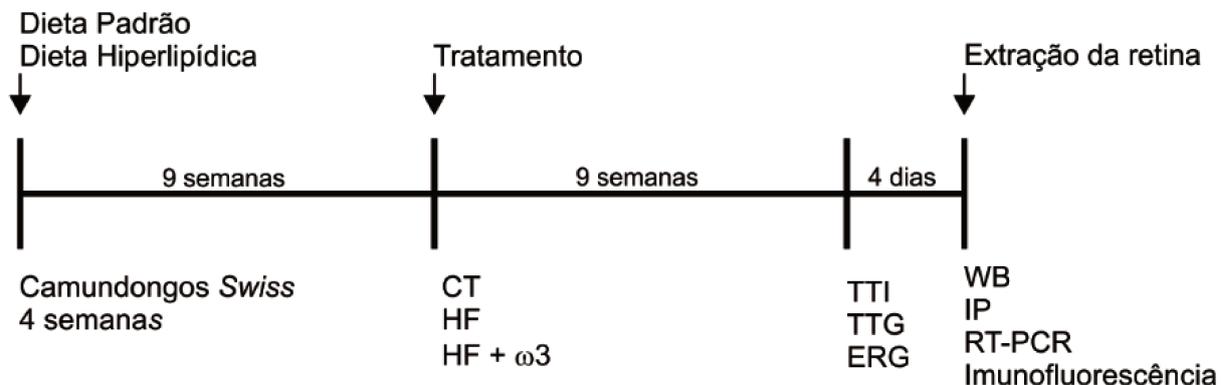


Figura 4 - Desenho experimental

4.3. *Time course* para determinar a ativação de GPR120 na retina

Camundongos *Swiss* machos, com 4 semanas de idade, foram submetidos à gavagem contendo 500 μ L de óleo de linhaça, para verificação do melhor tempo de ativação de GPR120 na retina. A extração tecidual foi realizada em diferentes tempos após a realização do procedimento: tempo 0h (imediatamente após a gavagem), 2 horas, 3 horas, 3 horas e 30 min e 4 horas após a gavagem. Posteriormente foi realizada a quantificação proteica e imunoprecipitação com anticorpo β -arrestina, a fim de verificar sua interação com o receptor GPR120.

Tabela 1. – Dietas experimentais baseada no proposto pela AIN.

Ingredientes	HF	HF+ω3
Amido de Milho Q.S.P.	115,500	115,500
Caseína	200,000	200,000
Amido de Milho Dextrinizado	132,000	132,000
Açúcar	100,000	100,000
Celulose Microfina	50,000	50,000
Óleo de Soja*	40,000	40,000
Óleo de Semente de Linhaça	-	104,000
Gordura Suína	312,000	208,000
Mix de Vitaminas	10,000	10,000
Mix de Minerais	35,000	35,000
L-cistina	3,000	3,000
Bitartarato de Colina	2,500	2,500
Total	1000	1000

Tabela 1: AIN – American Institute of Nutrition, 1993 (Reeves, 1993)⁶⁵. HF– Dieta Hiperlipídica. ω 3 – omega 3. Q.S.P. – Quantidade Suficiente Para. *40 mL de óleo de soja representa a quantidade obrigatória em todas as dietas para fornecimento dos ácidos graxos essenciais ao desenvolvimento normal dos animais experimentais.

4.4. Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TTI)

Após 8 horas de jejum os animais foram submetidos ao TTI. Os animais receberam a solução de insulina (1,5 U/Kg de peso corporal) e foram colhidas amostras de sangue nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos a partir da veia caudal para determinação de glicose utilizando o glicosímetro Accu-chek *active* (Roche). Para avaliar a intensidade de decaimento glicêmico, os dados foram analisados de acordo com a área sob a curva do gráfico. Para analisar a constante (k) de decaimento glicêmico dos grupos, os dados foram transformados em logaritmos naturais, e o valor de *slope* obtido da média dos

grupos representa o *k*. O programa estatístico utilizado para avaliação do teste foi o GraphPad InStat, v. 3.05.

4.5. Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TTG)

Após 8 horas de jejum os animais foram submetidos ao TTG, onde foi administrada uma solução de 20% de glicose (2 g/Kg de peso) e colhidas amostras de sangue nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos a partir da veia caudal para determinação de glicose com auxílio de um glicosímetro Accu-chek *active* (Roche). Para avaliar a intensidade de decaimento glicêmico, os dados foram analisados de acordo com a área sob a curva do gráfico.

4.6. Avaliação funcional da retina por eletrorretinografia (ERG)

A eletrorretinografia (ERG) foi realizada utilizando o Sistema UTAS-E3000 (UTAS-E3000, LKG Technologies Inc., Gaithersburg, MD) conforme descrito anteriormente por Duarte e colaboradores⁶⁶. Foi captado o registro da variação do potencial de ação produzido entre a córnea e a retina quando foram estimuladas por diferentes intensidades de luz. Os camundongos foram adaptados ao escuro *overnight* e posteriormente as pupilas dilatadas com Tropicamida (Alcon São Paulo, BR). Em seguida, foram anestesiados como Cloridrato de Xilazina (Lab. König, S.A., 75mg/kg) conjugada à Cloridrato de Cetamina (Fort Dodge, Iowa, USA, 7,5mg/kg) administrado por via intraperitoneal. Sobre efeito do anestésico, os animais foram submetidos a diferentes intensidades luminosas (-3,60, -2,60, -1,60, -0,60, 0,40, 1,40, 2,40 log cd s/m²). A avaliação foi realizada por análise dos traçados gráficos que caracterizaram as ondas de deflexão.

4.7. Extração Tecidual e Quantificação Proteica

Com o animal anestesiado, os dois globos oculares foram removidos por completo. Com o auxílio de uma lupa (Leica Wild[®], modelo m690), e bisturi oftálmico, foi feita uma incisão, onde a íris e as estruturas internas oculares como o vítreo e cristalino foram retirados. Posteriormente a retina foi removida com o auxílio de uma pinça. O tecido foi homogeneizado em tampão de imunoprecipitação, contendo 1% de Triton X 100, 100 mM de Tris (pH 7,4), 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10 mM de ortovanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina, a 4 °C com o auxílio de um sonicador. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 11000 rpm por 40 minutos para retirada do sobrenadante. No sobrenadante foi determinada a concentração de proteína através do método de Bradford ⁶⁷ e, posteriormente, foi realizada a determinação do extrato total e do ensaio de *immunoblotting*.

4.8. Imunoprecipitação

Após determinação da concentração das proteínas, foi realizada a imunoprecipitação com anticorpo específico para β -Arrestina-2. Após incubação, os imunocomplexos foram recuperados com Proteína A Sepharose, durante 2 horas, a 4 °C e decantados por centrifugação (11000 rpm) durante 15 min, também a 4 °C. O precipitado foi lavado 3 vezes, em intervalos de 5 min, com tampão de lavagem (2 mM ortovanadato de sódio; 100 mM Tris-HCl; 1mM RDTA; 0,5% Triton X-100). O sobrenadante foi descartado, restando apenas as proteínas imunoprecipitadas (imunocomplexos).

4.9. Immunoblotting

Os extratos protéicos ou os imunocomplexos foram ressuspensos em tampão de Laemmli, contendo 1M de DTT. Após rápida fervura, foram aplicados em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas em gel de acrilamida (SDS-PAGE) foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD. A ligação de anticorpo com proteínas não-específicas foi minimizada pela incubação prévia da membrana de nitrocelulose em tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado; 10 mmol/L de Tris; 150 mmol/L de NaCl; 0,02% de Tween 20) por 1 hora. Após isso, a membrana de nitrocelulose foi incubada *overnight* com anticorpo específico. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com anticorpos secundários, referentes ao primário. As bandas específicas foram marcadas por quimioluminescência, por meio de kit específico, e reveladas em fotodocumentador (Syngene G:BOX). A quantificação das bandas foi realizada com auxílio do software UN-SCAN-IT gel 6.1.

4.10. Real Time PCR quantitativo - RT-qPCR

Para análise de RT-qPCR, as amostras de retina foram removidas e imediatamente homogeneizadas em tampão de TRIzol® (*Life Technologies*) para o isolamento do RNA. Do RNA isolado as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e foi utilizado 3 µg de RNA para remoção de DNA genômico, através do kit *Recombinant DNase I - RNase-free* (*Takara*). Ao final desta etapa as amostras foram quantificadas novamente e utilizou-se 1 µg de RNA para a conversão em cDNA, através do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*). As reações de qPCR foram realizadas através do sistema TaqMan® (*Applied Biosystems*). Posteriormente, foi avaliada a expressão gênica

de TNF- α , IL-1 β , GPR120 e GPR40 e cada gene avaliado foi normalizado pelo gene endógeno GAPDH.

4.11. Imunofluorescência

Para as análises de Imunofluorescência, outros grupos experimentais foram destinados para tal procedimento. O globo ocular foi extraído e diretamente fixado em solução de glurataldeído e formaldeído à 2,5% e 2%, respectivamente, por 1 hora a 4 °C. Posteriormente, foram crioprotetidos em meio TissueTek O.C.T. Compound® para os ensaios de imunofluorescência. Em seguida, os tecidos foram seccionados a 20 μ m em criostato (Leica CM1850®) e as lâminas lavadas em tampão fosfato. Posteriormente, foram bloqueadas das ligações inespecíficas com soro de cabra 1% em tampão fosfato 1x por 1 hora. Após isso, as lâminas foram incubadas *por 2 horas* em soro 1% com os anticorpos específicos: anti-GPR120 (1:10, Santa Cruz *Biotechnology*) e anti-GPR40 (1:50, Santa Cruz *Biotechnology*). Após isso, as lâminas foram incubadas com o respectivo anticorpo secundário por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, as secções foram coradas com DAPI. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss®, Oberkochen, Germany) e as imagens digitais capturadas com o auxílio de um software específico (AxioVision®; Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA).

4.12. Análise Estatística

Os dados foram submetidos inicialmente ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, para dados simétricos, aplicou-se o teste de análise de variância (*One-way*, ANOVA), seguido do pós-teste de Bonferroni. Foram consideradas diferenças significantes entre os grupos as variações menores de 5% ($p < 0.05$).

5 Resultados

Para verificação do tempo de ativação do GPR120, foi realizado gavagem com óleo de linhaça e, posteriormente, as retinas foram extraídas em diversos tempos. De acordo com a Figura 5, é possível observar que o melhor tempo de ativação do receptor na retina ocorre a partir de 3 horas da administração do óleo de linhaça.

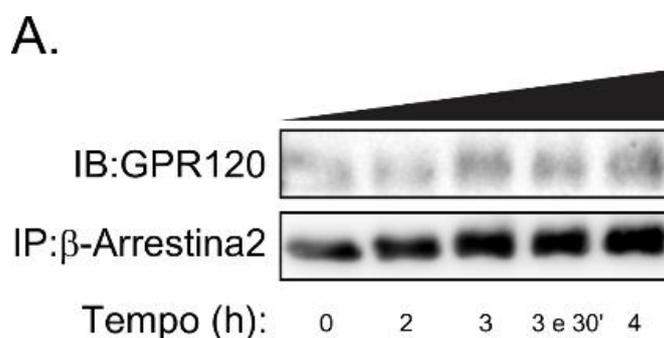


Figura 5 – Associação GPR120/β-arrestina2 após gavagem com óleo de semente de linhaça. *Time course* para verificar o tempo de ativação do receptor GPR120 após gavagem com 500 μL óleo de linhaça em camundongos *Swiss*. (0h; 3h; 3h30; 4h n=3; 2h n=2).

Em seguida, o tratamento com as diferentes dietas experimentais foi iniciado. Após 9 semanas, os animais expostos a dieta hiperlipídica (HF) apresentaram aumento da massa corporal quando comparados aos animais controle (Fig. 6A e A1). Além disso, os animais do grupo HF apresentaram aumento da glicemia de jejum e redução na taxa de decaimento de glicose (kITT) em relação ao grupo CT (Fig. 6B, B1 e C). Posteriormente, os animais do grupo HF foram distribuídos em um novo grupo experimental (HF+ω3), que passou a receber a dieta substituída em 10% de gordura saturada por óleo de semente de linhaça por 9 semanas.

Durante o período de tratamento, a ingestão alimentar foi avaliada e os animais do grupo HF apresentaram maior ingestão alimentar em kcal/dia quando comparados ao grupo CT. Entretanto, a dieta contendo óleo de semente de

linhaça não foi capaz de modular a ingestão alimentar dos animais HF+ ω 3 quando comparados ao grupo HF (Fig. 7A e B)

Ao final das 18 semanas, os animais expostos a dieta rica em gordura continuaram a apresentar aumento da massa corporal em relação ao grupo controle. Entretanto, não houve diferença na massa corporal e no depósito de gordura epididimal, entre os grupos HF e HF+ ω 3 (Fig.7C-F). Em relação a homeostase glicêmica, os animais expostos a dieta rica em óleo de linhaça apresentaram redução da glicemia de jejum quando comparados aos animais do grupo HF (Fig. 8A-C). Contudo, não foi verificada diferença na taxa de decaimento de glicose entre os grupos HF e HF+ ω 3. Além disso, os animais expostos a dieta rica em óleo de linhaça apresentaram menor área sob a curva quando comparados ao grupo HF após realização do teste de TTG (Fig. 8D e E).

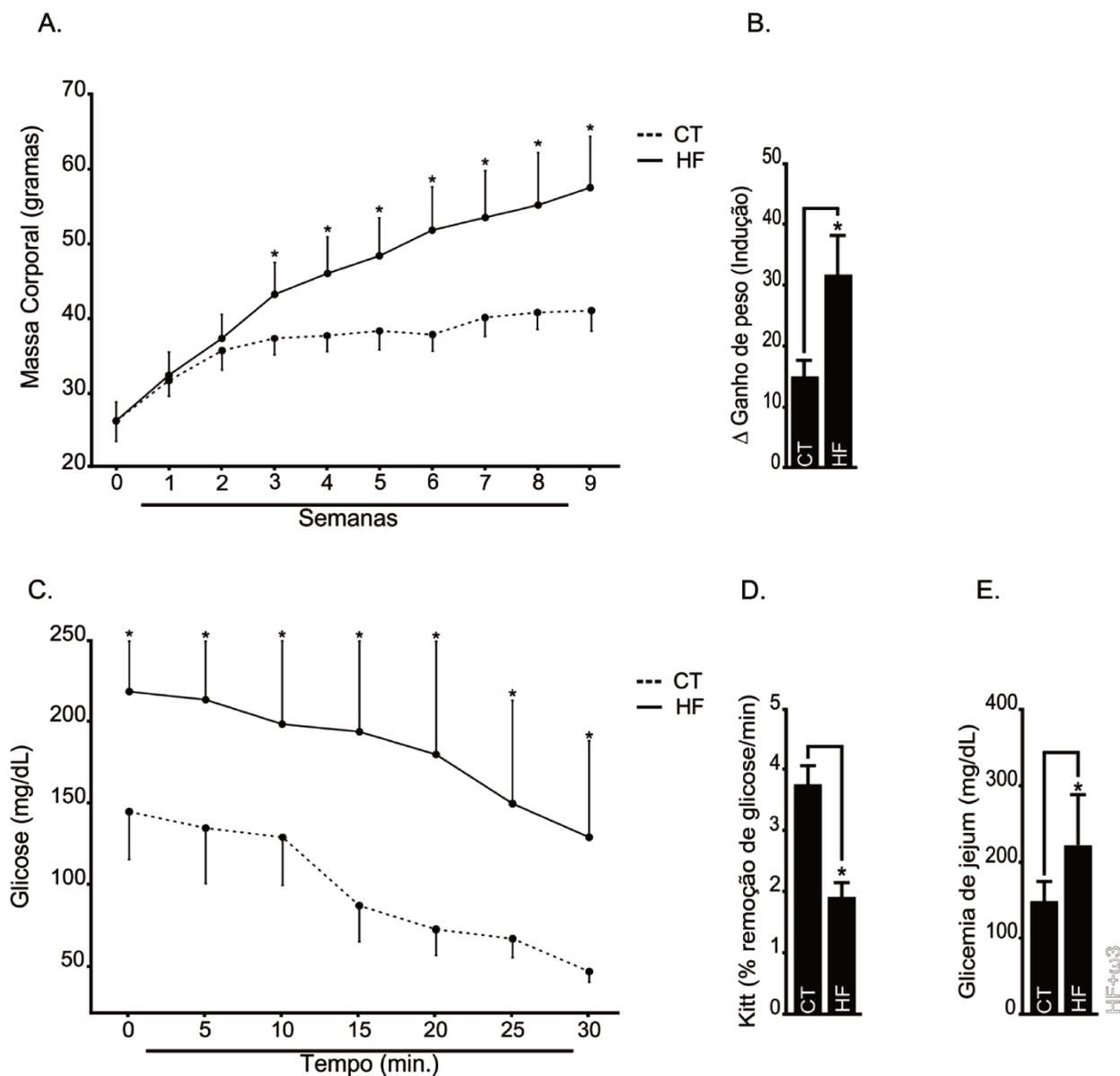


Figura 6 – Caracterização metabólica do modelo de indução de obesidade: evolução ponderal e homeostase glicêmica induzida pela dieta HF. Camundongos Swiss expostos a dieta padrão (CT) ou a dieta HF por 9 semanas. *A:* Variação da massa corporal ao longo do tratamento. *B:* Peso cumulativo (CT, n=10. HF, n=30). *C:* Teste de sensibilidade à insulina. *D:* Taxa de decaimento de glicose (KITT). *E:* Glicemia de jejum ao final de 9 semanas de tratamento (CT, n=5. HF, n=12). Os gráficos de barras e linhas representam a média e o desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. *= $P < 0,05$, teste *t* de Student.

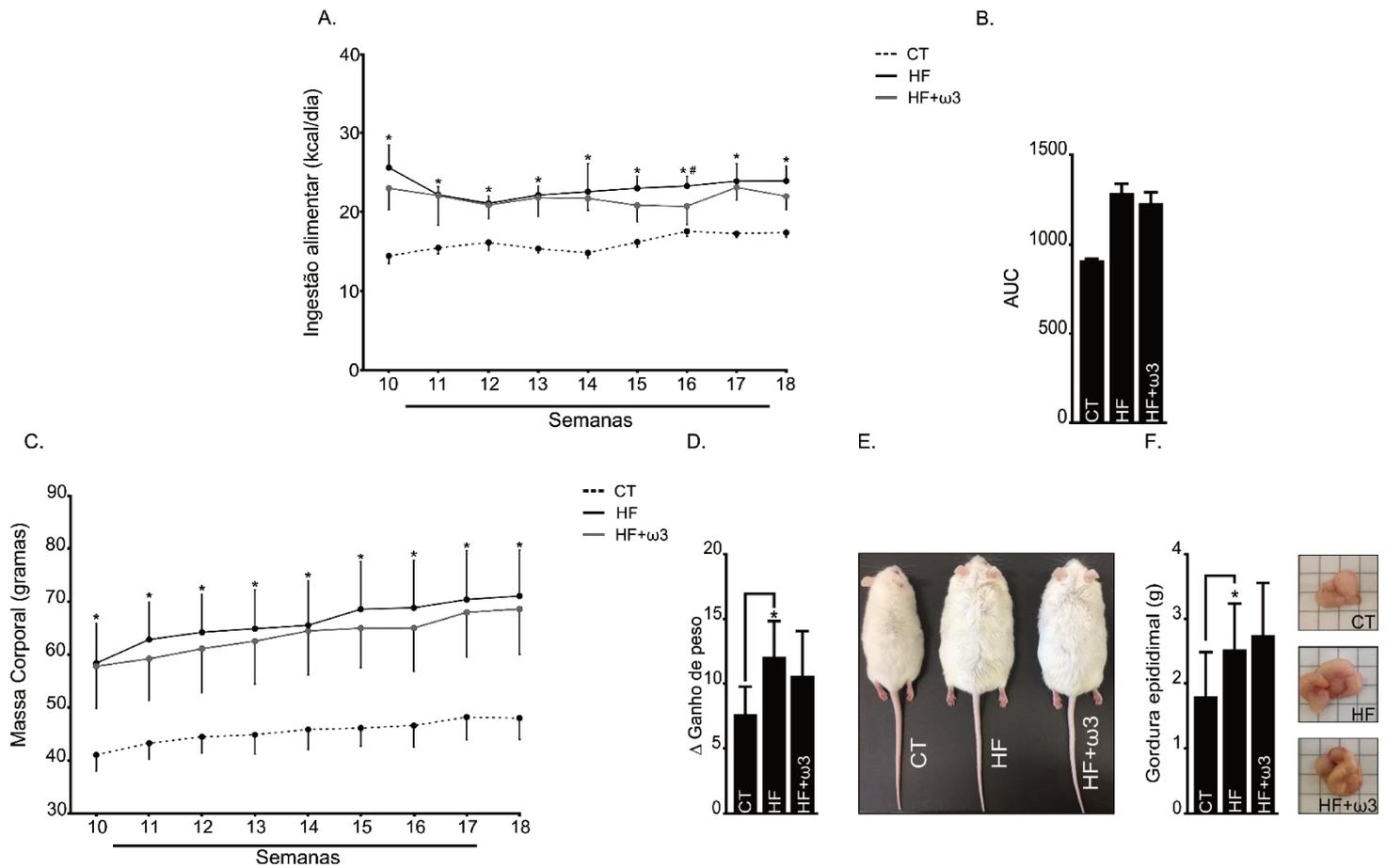


Figura 7 – Evolução ponderal e ingestão alimentar após tratamento com dieta HF+ ω 3. Camundongos Swiss expostos à dieta padrão (CT), dieta HF e dieta HF+ ω 3 por 9 semanas. *A:* Variação da ingestão alimentar durante as 9 semanas de exposição às diferentes dietas experimentais. *B:* Ingestão alimentar em kcal/dia entre os diferentes grupos experimentais ao final das 18 semanas. *C:* Variação da massa corporal ao longo do tratamento. *D:* Peso cumulativo ao final do período experimental (CT, n=10. HF, n=10. HF+ ω 3, n=10) *E:* Imagem representativa dos animais ao final do período experimental. *F:* Peso da gordura epididimal junto à imagem representativa dos coxins adiposos (CT, n=10. HF, n=9. HF+ ω 3, n=10).

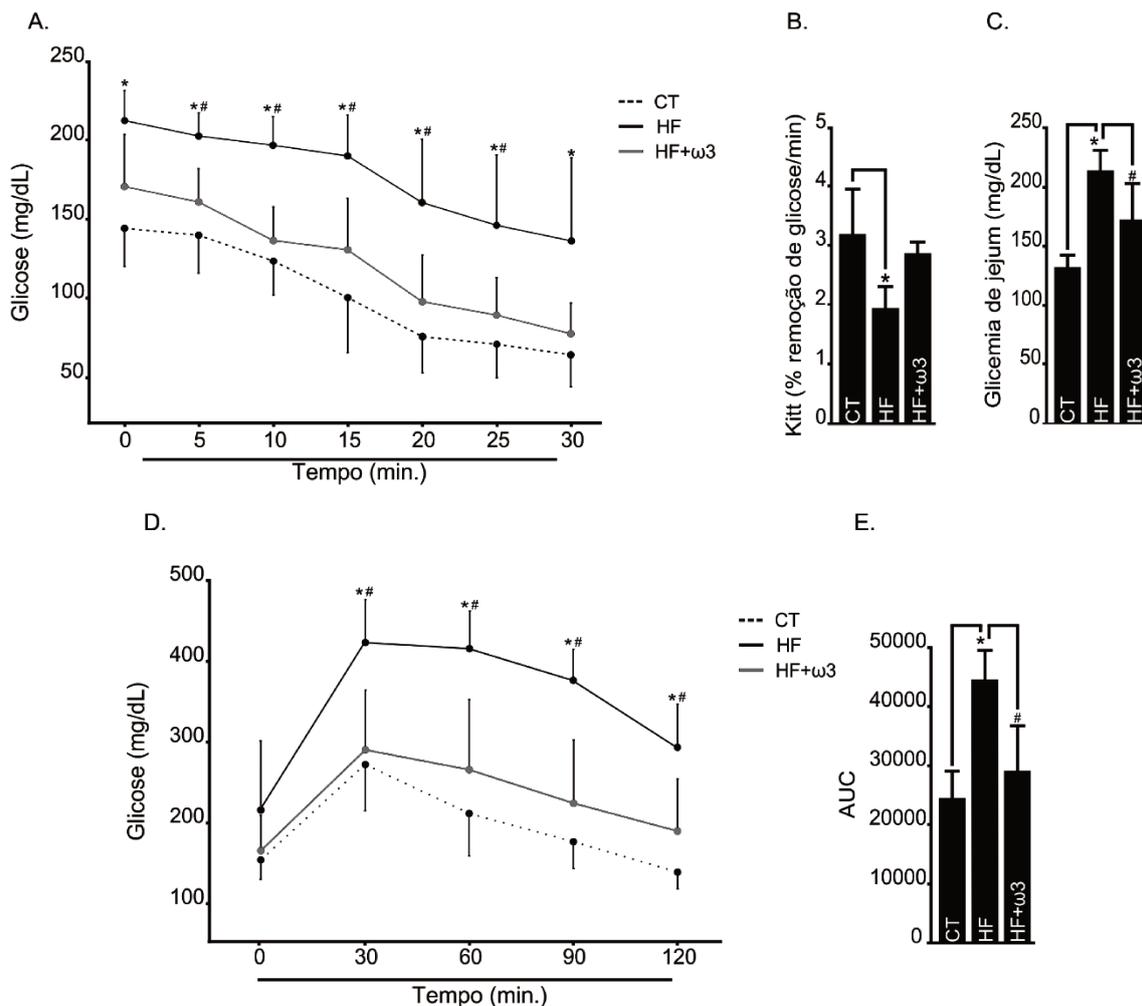
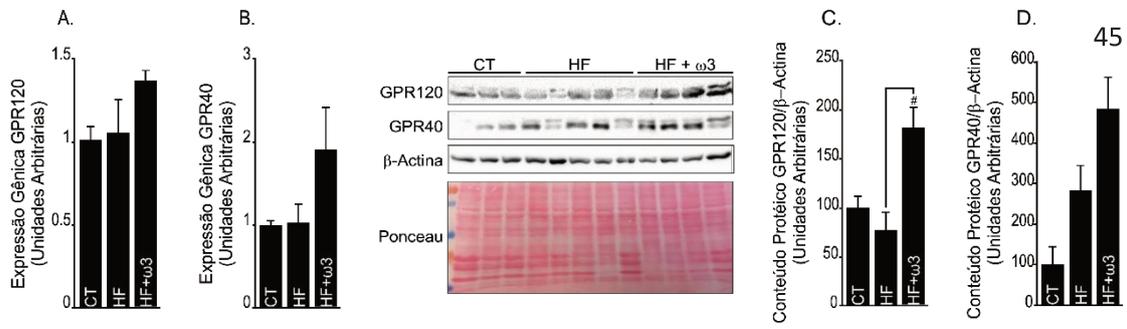


Figura 8 – Homeostase glicêmica após tratamento com dieta HF+ ω 3. A: Teste de sensibilidade à insulina. B: Taxa de decaimento de glicose (kITT). C: Glicemia de jejum após o tratamento. D Teste de tolerância à glicose. E: Área sob a curva (AUC) obtido após o TTG (CT, n=5. HF, n=5. HF+ ω 3, n=4). Os gráficos de barras e linhas representam a média e o desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. $P < 0.05$, teste t de Student. *CT vs HF; #HF vs HF+ ω 3.

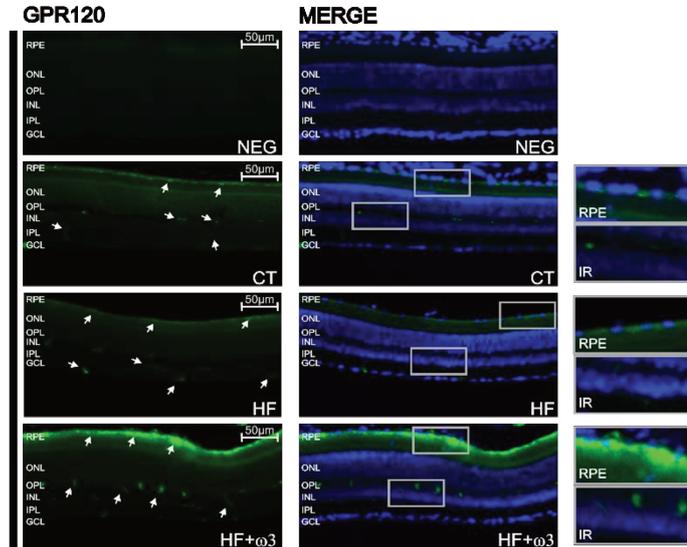
Posteriormente às análises de caracterização fisiológica, deu-se início as análises moleculares. Primeiramente, avaliamos a expressão gênica dos receptores para ácidos graxos e verificamos que as diferentes dietas experimentais não foram capazes de modular o conteúdo de transcritos de GPR120 (Fig. 9A) e GRP40 (Fig. 9B). Entretanto verificou-se que o tecido retiniano era capaz de expressar tais proteínas. Quanto ao conteúdo proteico dos receptores, o grupo HF+ ω 3 apresentou aumento no conteúdo de GPR120

em relação ao grupo HF (Fig. 9C). Entretanto, as diferentes dietas experimentais não foram capazes de modular o conteúdo proteico de GPR40 (Fig. 9D).

Além disso, avaliamos a localização dos receptores no tecido retiniano e verificou-se que ambos os receptores, GPR120 e GPR40 estão distribuídos por toda a retina, sendo observados tanto no epitélio pigmentado retiniano (RPE), quanto na retina interna (IR). Sendo o GPR120 (Fig. 9E), aparentemente mais expresso na camada epitelial, com alguns pontos na camada interna e o GPR40 (Fig. 9F) distribuído de maneira mais uniforme em toda a extensão do tecido.



E.



F.

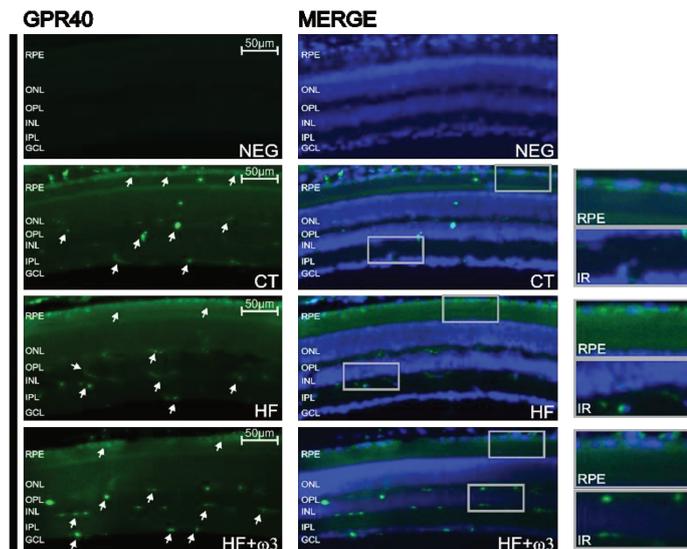


Figura 9- Receptores para ácidos graxos após tratamento com dieta HF+ω3. A: Expressão gênica de GPR120 (CT, n=4; HF, n=4; HF+ω3, n=4) B: Expressão gênica de GPR40 (CT, n=3; HF, n=4; HF+ω3, n=6) C: Conteúdo proteico de GPR120 (CT, n=3; HF, n=5; HF+ω3, n=4) D: Conteúdo proteico de GPR40 (CT, n=3; HF, n=5; HF+ω3, n=4) E: Localização de GPR120 no tecido retiniano F: Localização de GPR40 no tecido retiniano. Os gráficos de representam a média e o desvio padrão (±) de cada grupo experimental. $P < 0.05$. ANOVA, *one way*, pós teste Bonferroni. * = CT vs HF, # = HF vs HF+ω3. RPE: *Retinal pigment epithelium*; ONL: *Outer nuclear layer*; OPL: *Outer plexiform layer*; INL: *Inner nuclear layer*; IPL: *Inner plexiform layer*; GCL: *Ganglion cell layer*; IR: *Inner retina*.

Em seguida, foram analisadas a expressão gênica e o conteúdo de proteínas envolvidas com o sinal inflamatório e dos receptores de ácidos graxos GPR120/GPR40. Em relação a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, observamos que o conteúdo de RNAm de TNF- α e IL-1 β nos animais do grupo HF foi significativamente maior em relação ao grupo CT. Por outro lado, o grupo HF+ ω 3 apresentou redução na expressão dessas citocinas em relação ao grupo HF (Fig. 10A e B).

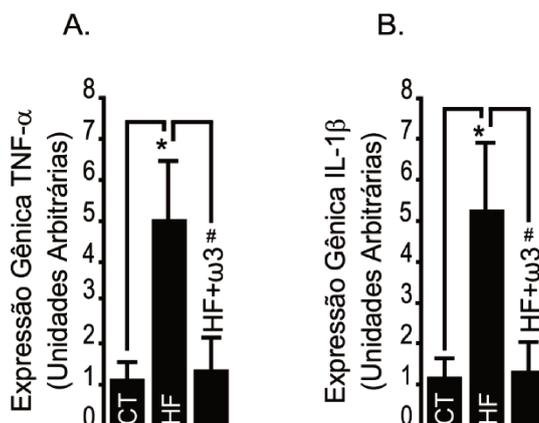


Figura 10 – Expressão gênica de citocinas inflamatórias após tratamento com dieta HF+ ω 3. Expressão gênica de TNF- α (A) e IL-1 β (B) (CT, n=4; HF, n=4, HF+ ω 3, n=5). Os gráficos representam média e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. $P < 0,05$. *One-way* ANOVA, pós teste Bonferroni. *CT vs HF, #HF vs HF+ ω 3.

Em seguida foram analisados o conteúdo proteico de IL-1B, TNF- α , IL-10, a fosforilação da proteína TAK-1 e VEGF. O grupo exposto a dieta hiperlipídica apresentou aumento no conteúdo de IL-1 β em relação ao grupo CT (Fig. 11A). Entretanto, os animais do grupo HF+ ω 3 apresentaram redução no conteúdo dessa proteína quando comparados aos animais do grupo HF. Além disso, o grupo HF+ ω 3, também apresentou menor conteúdo proteico de TNF- α (17 kDa), na sua forma clivada, em comparação ao grupo HF (Fig. 11B). Com relação a fosforilação da proteína TAK-1, animais expostos à dieta hiperlipídica apresentaram maior fosforilação de TAK1 quando comparados ao grupo CT.

Entretanto, os animais expostos à dieta HF+ ω 3 apresentaram redução no conteúdo de p-TAK1, evidenciando o mecanismo de ação do GPR120 (Fig. 11E).

Quanto ao fator de crescimento VEGF, marcador clássico de retinopatia diabética, foi observado aumento no conteúdo proteico de VEGF na retina de animais do grupo HF quando comparados ao grupo CT. Em contrapartida, os animais do grupo HF+ ω 3 apresentaram menor conteúdo proteico de VEGF em comparação ao grupo HF (Fig. 11F). Além disso, não houve diferença no conteúdo proteico de IL-10 e TNF- α (26 kDa) entre os diferentes grupos experimentais (Fig. 11C e D).

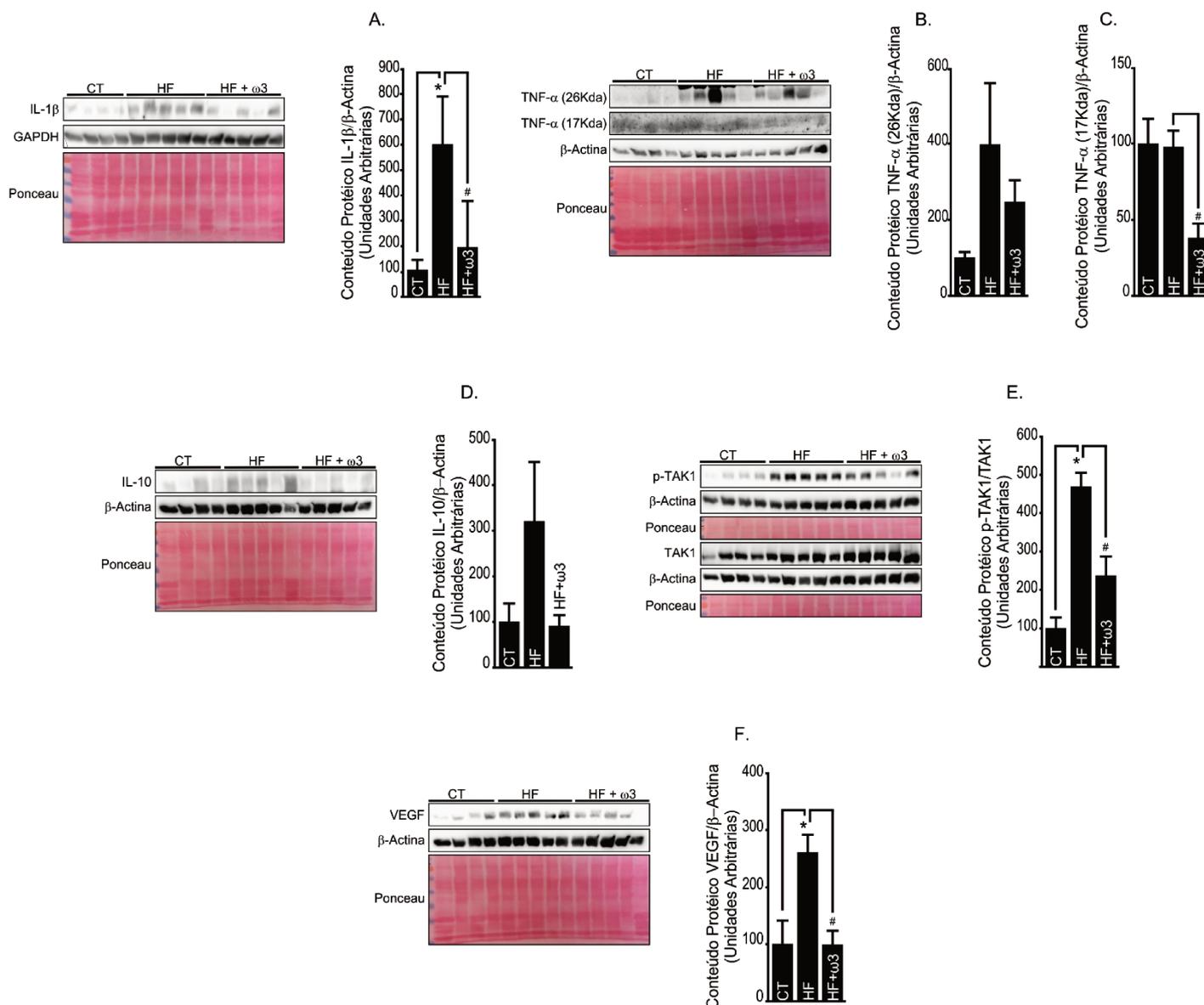


Figura 11 – Conteúdo proteico de citocinas, p-TAK1 e VEGF após tratamento com dieta HF+ ω 3. A: Conteúdo proteico de IL-1 β (CT, n=3; HF, n=5; HF+ ω 3, n=5) B: Conteúdo proteico de TNF- α (26Kda) (CT, n=3; HF, n=5; HF+ ω 3, n=5). C: Conteúdo proteico de TNF- α (17Kda) (CT, n=3; HF, n=5; HF+ ω 3, n=5). D: Conteúdo proteico de IL-10 (CT, n=4; HF, n=5; HF+ ω 3, n=5). E: Fosforilação de TAK1 (CT, n=4; HF, n=5; HF+ ω 3, n=5). F: Conteúdo proteico de VEGF (CT, n=4; HF, n=5; HF+ ω 3, n=5). Os gráficos de representam a média e o desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. $P < 0.05$. ANOVA, *one way*, pós teste Bonferroni. *=CT vs HF, #=HF vs HF+ ω 3.

Por fim, foi realizado o teste de eletrorretinografia para análise funcional da retina, com o objetivo de verificar se a dieta rica em óleo de semente de linhaça era capaz de prevenir os possíveis danos causados pelo consumo de dieta rica em gordura saturada. No entanto, não foram observadas alterações nas amplitudes de onda A, B e C (resposta de cones, bastonetes e células

epiteliais) entre os diferentes grupos experimentais quando expostos à diferentes intensidades luminosas (Fig. 12A, C, D e E). Entretanto, os animais expostos à dieta HF apresentaram uma diminuição no potencial oscilatório em comparação ao grupo CT, caracterizando prejuízo nas camadas internas da retina (Fig. 12 B e E). Em contrapartida, os animais expostos à dieta rica em óleo de semente de linhaça, não apresentaram prejuízos funcionais, evidenciando o papel protetor do ômega-3 em retardar a progressão da retinopatia diabética (Fig. 12 F).

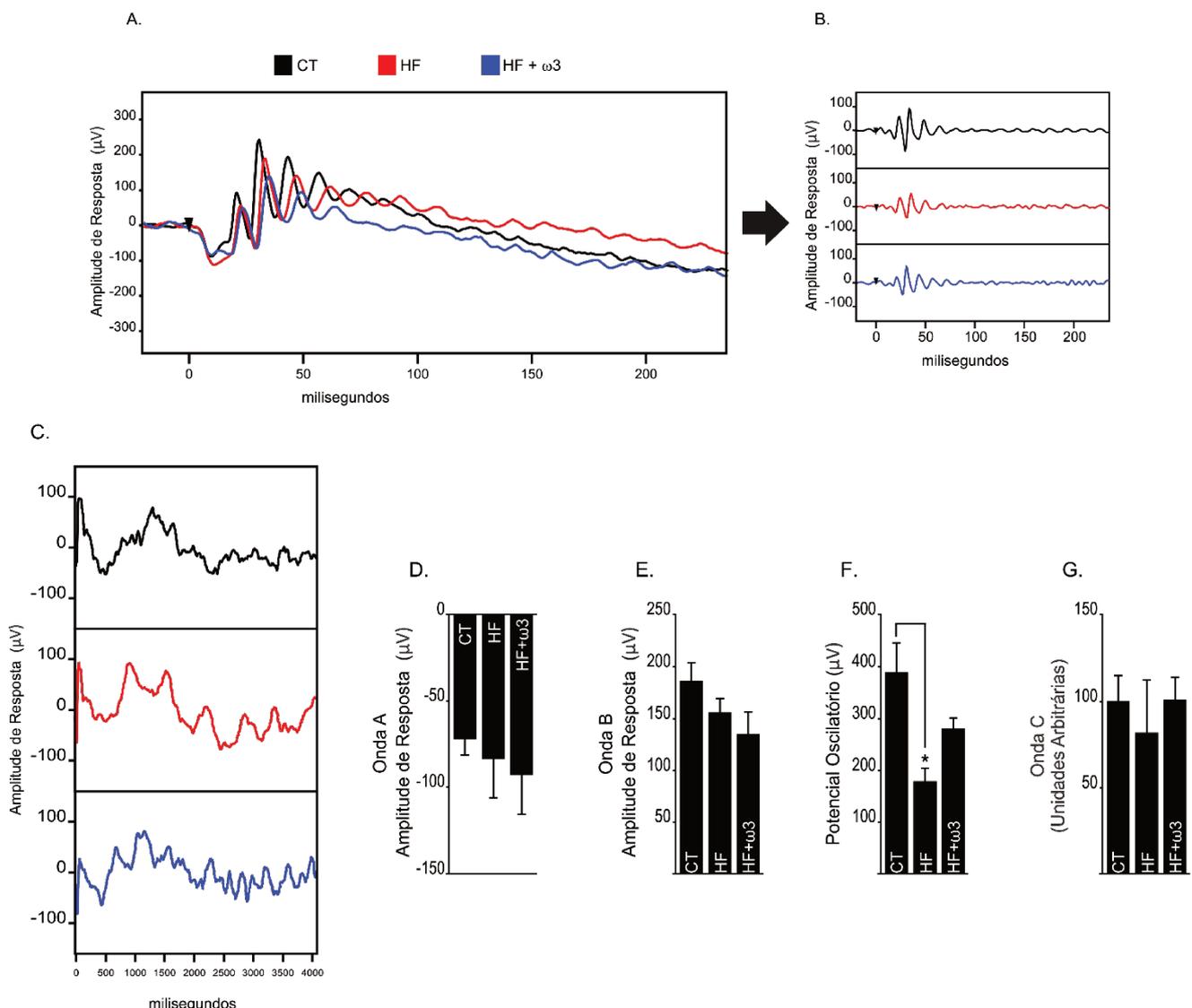


Figura 12 – Avaliação funcional retiniana através do teste de eletrorretinografia (ERG). A: Imagem representativa de ondas A e B obtidas a partir do teste de ERG nos diferentes grupos experimentais. B: Imagem representativa do potencial oscilatório a 0.25 cd.s/m^2 nos diferentes grupos experimentais. C: Imagem representativa de onda C. D: Amplitude de onda A. E: Amplitude de onda B. F: Potencial oscilatório. G: Amplitude de onda C. Os gráficos representam média e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. $P < 0.05$. One-way ANOVA, pós teste Bonferroni. * = CT vs HF.

6. Discussão

A atividade anti-inflamatória atribuída aos ácidos graxos ômega-3 é especulada na literatura científica desde meados de 1980⁶⁸, mas com desfechos mecanísticos moleculares mostrados apenas a partir de 2010⁶⁹. Em relação ao tecido retiniano, alvo do presente estudo, sabe-se que os ácidos graxos ômega-3 são os lipídios mais abundantes na retina⁷⁰ e que o consumo diário de fontes alimentares contendo em torno de 500 mg de ω 3 é capaz de diminuir a incidência de retinopatia diabética (RD) em indivíduos adultos, portadores de DM²⁷¹. Contudo, a relação desse tipo lipídico específico trazendo benefícios ao tecido retiniano ainda não apresenta detalhamento molecular bem caracterizado. Portanto, os resultados obtidos neste projeto trazem luz à tal mecanística, podendo contribuir para ações nutricionais mais efetivas.

Para tentar compreender os mecanismos desencadeados pelos ácidos graxos ω 3 na retina, camundongos foram expostos a três tipos de dieta: dieta padrão comercial, dieta rica em gordura de origem animal, contendo 35% de gordura saturada, e uma dieta substituída em 10% de gordura por óleo de semente de linhaça. Os resultados obtidos mostraram que a dieta rica em gordura saturada foi capaz de induzir aumento da massa corporal, glicemia de jejum e gerar à resistência à insulina, mostrando-se eficiente na indução de obesidade e dano metabólico. De forma semelhante, camundongos *Swiss* têm sido amplamente utilizados como um bom modelo experimental do processo obesogênico e comorbidades associadas⁷²⁻⁷⁴, mimetizando os distúrbios metabólicos observados em humanos sob o modelo de dieta ocidental^{75,76}.

Em contrapartida, a dieta substituída em 10% de gordura animal por óleo de semente de linhaça foi capaz de reduzir a glicemia de jejum e de proteger os animais do desenvolvimento de intolerância à glicose mesmo sem alterar os estoques adiposos e a massa corporal dos animais. Diversos estudos mostraram o potencial do óleo de semente de linhaça e também dos ácidos graxos DHA e EPA na melhora da homeostase glicêmica em animais obesos, evidenciando o potencial terapêutico desse nutriente no tratamento da obesidade e do DM2^{55,56,69}. Na obesidade e doenças associadas, o estímulo de vias inflamatórias culmina na ativação das serinas quinases (JNK e IKK) que reduzem a transdução da via de sinalização da insulina⁷⁷⁻⁷⁹. Contudo, os ácidos graxos da família do ω 3 são capazes de restabelecer a homeostase glicêmica por desarticular a cascata inflamatória, restaurando a sinalização da insulina e aumentando a captação de glicose em tecidos periféricos⁸⁰.

Nesse sentido, o potencial anti-inflamatório dos ácidos graxos ω 3 no desenvolvimento da retinopatia vêm sendo descrito em alguns trabalhos que apresentaram como objetivo analisar o efeito da suplementação de EPA e DHA em animais espontaneamente diabéticos ou induzidos à retinopatia^{81,82}. Tais evidências demonstraram o efeito protetor do ômega-3 no desenvolvimento da RD independente da fonte de ômega-3 e do modelo de indução a obesidade utilizado. Ainda, estudos realizados com cultura de células mostraram que a utilização de ômega-3 é capaz de inibir a ativação de micróglia e controlar a autofagia^{83,84}.

Apesar de diversos estudos descreverem o potencial terapêutico dos GPCRs, GPR120 e GPR40, e de terem sido identificados em diversos tecidos e tipos celulares como o sistema nervoso central, macrófagos, tecido adiposo,

intestino e fígado⁸⁵⁻⁸⁹, até onde sabemos, a presença dos receptores ainda não foi descrita do tecido retiniano. Portanto, de forma inédita, nossos resultados demonstram que esses receptores estão presentes na retina, onde principalmente o GPR120 é capaz de reconhecer seu agonista lipídico. Ainda, foi avaliada a capacidade da dieta contendo óleo de linhaça em aumentar o conteúdo proteico de GPR120. De maneira semelhante, Cheshmehkani e colaboradores (2015) também observaram o aumento de GPR120 no cólon de animais suplementados com óleo de semente de linhaça⁹⁰. O mecanismo pelo qual ácidos graxos insaturados induzem aumento na expressão de receptores GPR120 ou 40 ainda é mal explicado na literatura. Isso se deve, provavelmente, a dois fatos, 1) as respostas são tecido-dependentes⁹¹; 2) através do fator de transcrição C/EBP, o qual é ativado por ácidos graxos saturados e, de acordo com a literatura, é o fator de transcrição de GPR120⁹². Mas a evidência que mostra isso ainda carece de maiores explicações.

Apesar de alguns estudos descreverem o potencial terapêutico dos receptores GPR120 e 40, este trabalho também apresenta de forma inédita a exploração do seu papel no tecido retiniano. Sabe-se que a ingestão de fontes de ω 3 parece ser capaz de prevenir ou retardar o surgimento de retinopatia diabética em humanos⁹³. Além disso, estudos realizados em modelos experimentais mostrarem que a ingestão ou suplementação com ácidos graxos da família do ω 3 resultou em retardo no desenvolvimento da doença, diminuição do tônus inflamatório e angiogênese^{81,94}. Sabe-se que o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) no vítreo⁹⁵ e na retina⁹⁶ está associado com a gênese da RD, e que além de perpetuar o processo inflamatório, níveis elevados de IL-1 β e TNF- α precedem os danos funcionais e

estruturais que ocorrem nos estágios mais avançados da RD^{41,97}. De maneira interessante, a dieta contendo óleo de semente de linhaça utilizada no presente trabalho foi capaz de atenuar o processo inflamatório, de acordo com achados na literatura, apresentando-se como potencial alvo terapêutico na prevenção e tratamento da RD.

Outro marcador clássico de RD avaliado, foi o conteúdo de VEGF. Aiello e colaboradores, em 1994, mostraram o aumento de VEGF no vítreo de pacientes diabéticos⁹⁸ e desde então diversos estudos na literatura destacaram o papel do fator de crescimento na progressão da retinopatia, controlando processos de angiogênese, neurodegeneração, migração e proliferação célula, além de aumentar a permeabilidade vascular tanto em ensaios clínicos^{45,99-101}, quanto em modelos experimentais^{102,103}. Nesse contexto, resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, onde verificou-se maiores níveis de VEGF na retina de animais obesos e diabéticos.

Sendo assim, diversos fármacos têm sido desenvolvidos, no intuito de conter os efeitos deletérios que o excesso de produção de VEGF traz à retina de pacientes diabéticos. Dessa maneira a utilização de ácidos graxos ômega-3 torna-se uma alternativa, pois diversos estudos recentes têm buscado compreender os efeitos do ômega-3 sobre o VEGF¹⁰⁴. Nesse sentido, um estudo experimental mostrou que a administração de ácido α -linolênico por cinco dias foi capaz de reduzir os níveis de VEGF na retina de animais induzidos ao diabetes por estreptozotocina¹⁰². No presente trabalho, a dieta contendo de óleo de semente de linhaça também foi capaz de reduzir os níveis de VEGF.

Além de reduzir a expressão de citocinas e VEGF, as diferentes dietas experimentais foram capazes de modular a atividade da proteína TAK-1. Já é

bem descrito na literatura que a proteína TAK-1 pode ser ativada por diversos ligantes que interagem com os receptores TLRs, RAGEs, IL-1R e TNFR e é necessária para a migração dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 ao núcleo e perpetuação do sinal inflamatório^{20,105,106}. Além disso, sabe-se que os ácidos graxos ômega-3, via GPR120 e 40, são capazes de interferir na via de sinalização da TAK-1, desarticulando a cascata inflamatória^{56,57,87,107}. Sendo assim, a diminuição da atividade da proteína TAK-1 encontrada no presente estudo torna-se mais uma evidência de que os efeitos positivos dos ácidos graxos ômega-3 sobre a retina dos camundongos ocorreram via GPCRs.

Por fim, avaliamos a função retiniana através do teste de eletrorretinografia (ERG). No ERG as ondas A e B mostram a função de fotorreceptores, e alterações nas amplitudes de onda só são detectáveis nos estágios mais avançados de retinopatia, esses estágios são comumente observados em modelos animais de degeneração retiniana mais severos, como por exemplo com a utilização de estreptozotocina⁶⁶ ou animais transgênicos mais propensos ao desenvolvimento a doença¹⁰⁸.

No caso de indução à retinopatia por dieta hiperlipídica, Rajagopal e colaboradores não observaram alterações em ondas A e B mesmo após 12 meses de exposição à dieta⁹⁷. Entretanto, a utilização de uma dieta com maior teor de gordura saturada (60%) mostrou-se capaz de gerar déficits funcionais na retina de camundongos, tanto em ondas A e B, quanto no que diz respeito ao potencial oscilatório (OP)¹⁰⁹. No presente estudo não observamos alterações em relação a amplitude de onda A e B ao final das 18 semanas de exposição à dieta, acredita-se que esse fato ocorreu devido ao curto período de tempo de exposição a dieta HF aliado a porcentagem de gordura saturada utilizada.

Entretanto, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram redução no OP de animais obesos, indicando alteração funcional na camada interna da retina, caracterizando danos às células amácrimas e ganglionares, levando à diminuição na sensibilidade visual^{110,111}. Além disso, diversos estudos na literatura destacaram tais alterações como característica dos estágios iniciais de retinopatia¹¹². Por outro lado, o óleo de semente de linhaça foi capaz de proteger contra os danos causados pelo consumo de dieta hiperlipídica, retardando assim a perda de função de células internas da retina.

Desse modo, é possível concluir que o consumo de ômega-3 torna-se alternativa interessante abordagem para o tratamento de RD, uma vez que até o presente momento a terapêutica convencional se dá através de fotocoagulação a laser, que a longo prazo é capaz de causar efeitos adversos como diminuição do campo de visão ou ainda redução da sensibilidade a cores¹¹³. Devido às limitações da terapêutica convencional, diversos fármacos de ação inibidora específica para os receptores de VEGF, IL-1 β e TNF- α vêm sendo desenvolvidos. Entretanto, a maioria desses fármacos apresentam elevado grau invasivo, pois são administrados via intravitreal, além de apresentarem alto custo financeiro, impossibilitando sua utilização por maior parte da população^{47,114,115}.

Dessa forma, nossos resultados corroboram os estudos acerca do tema, evidenciando o papel anti-inflamatório dos ácidos graxos ω 3, além de descrever a presença dos receptores para tais ácidos graxos na retina o que pode possibilitar maior compreensão dos mecanismos envolvidos na gênese da RD e na utilização dos ácidos graxos da família do ω 3 como terapia não farmacológica para prevenção dessa doença.

7. Conclusão

Pode-se concluir que a dieta rica em gordura foi capaz de induzir resistência à insulina e intolerância à glicose, mimetizando os mesmos achados em humanos e em outros modelos experimentais. Esse modelo experimental também foi eficiente na indução do processo inflamatório retiniano, aumento no conteúdo de VEGF, fator de crescimento envolvido com a progressão da RD, além de levar a diminuição na sensibilidade visual dos animais. Em contrapartida, a utilização de óleo de semente de linhaça foi capaz de modular o conteúdo proteico do receptor GPR120 e reverter os potenciais danos causados pelo consumo da dieta hiperlipídica. Desse modo, tais evidências apontam que alimentos fontes de ácidos graxos ômega-3 apresentam potencial terapêutico para retardar o processo inflamatório retiniano e retardar a progressão da retinopatia diabética em modelo animal.

Referências Bibliográficas

1. International Diabetes Federation, Seventh Edition. (2015).
2. Nolan, C. J., Damm, P. & Prentki, M. Type 2 diabetes across generations: From pathophysiology to prevention and management. in *The Lancet* **378**, 169–181 (2011).
3. Mellitus, D. Definition , Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications Part 1 : Diagnosis and Classification of. *World Health* **15**, 539–53 (1999).
4. Wang, Y. C., McPherson, K., Marsh, T., Gortmaker, S. L. & Brown, M. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet* **378**, 815–825 (2011).
5. Haslam, D. W. & James, W. P. T. Obesity. in *Lancet* **366**, 1197–1209 (2005).
6. Who, W. H. O. *World Health Statistics. WHO World Health Organization* **27**, (2012).
7. American diabetes association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **35 Suppl 1**, 64–71 (2012).
8. Keihani, S. *et al.* Abdominal obesity phenotypes and risk of cardiovascular disease in a decade of follow-up: The Tehran Lipid and Glucose Study. *Atherosclerosis* **238**, 256–263 (2015).
9. Gallagher, E. J. & LeRoith, D. Obesity and Diabetes: The Increased Risk of Cancer and Cancer-Related Mortality. *Physiol. Rev.* **95**, 727–748 (2015).
10. Khazrai, Y. M., Defeudis, G. & Pozzilli, P. Effect of diet on type 2 diabetes mellitus: a review. *Diabetes/Metabolism Res. Rev.* **30**, 24–33 10p (2014).
11. Hotamisligil, G., Shargill, N. & Spiegelman, B. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Science (80-.)*. **259**, 87–91 (1993).
12. Zhang, X., Dong, F., Ren, J., Driscoll, M. & Culver, B. High dietary fat

- induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. *Exp. Neurol.* (2005). doi:10.1172/JCI59660.adjacent
13. Morari, J. *et al.* Fractalkine (CX3CL1) is involved in the early activation of hypothalamic inflammation in experimental obesity. *Diabetes* **63**, 1–39 (2014).
 14. Kennedy, A., Martinez, K., Chuang, C.-C., LaPoint, K. & McIntosh, M. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J. Nutr.* **139**, 1–4 (2009).
 15. Donath, M. Y. Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 465–76 (2014).
 16. Emanuela, F. *et al.* Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome. *J. Nutr. Metab.* **2012**, (2012).
 17. Xu, H. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **112**, 1821–1830 (2003).
 18. Baker, R. G., Hayden, M. S. & Ghosh, S. NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease. *Cell Metab.* **13**, 11–22 (2011).
 19. Syeda, S., Patel, A. K., Lee, T. & Hackam, A. S. Reduced photoreceptor death and improved retinal function during retinal degeneration in mice lacking innate immunity adaptor protein MyD88. *Exp. Neurol.* **267**, 1–12 (2015).
 20. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511 (2004).
 21. Rajamani, U. & Jialal, I. Hyperglycemia Induces Toll-Like Receptor-2 and -4 Expression and Activity in Human Microvascular Retinal Endothelial Cells : Implications for Diabetic Retinopathy. **2014**, 7–10 (2014).
 22. Kawai, T. & Akira, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* **34**, 637–650 (2011).

23. Lucas, K. & Maes, M. Role of the toll like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: Possible treatments targeting the TLR4 pathway. *Molecular Neurobiology* **48**, 190–204 (2013).
24. Gárate, I. *et al.* Stress-induced neuroinflammation: Role of the toll-like receptor-4 pathway. *Biol. Psychiatry* **73**, 32–43 (2013).
25. Blasius, A. L. & Beutler, B. Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity* **32**, 305–315 (2010).
26. Zakov, Z. N. Managing diabetic retinopathy. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* **57**, 609–612 (1990).
27. Cheung, N., Mitchell, P. & Wong, T. Y. Diabetic retinopathy. *Lancet* **376**, 124–36 (2010).
28. Who, W. H. O. Prevention of blindness from diabetes mellitus: report of a WHO consultation in Geneva. (2005).
29. Cheung, N., Mitchell, P. & Wong, T. Y. Diabetic retinopathy. *Lancet* **376**, 124–136 (2010).
30. Frank, R. N. Diabetic Retinopathy and Systemic Factors. **22**, 151–156 (2015).
31. Hendrick, A. M. & Gibson, M. V. Diabetic Retinopathy. **42**, 451–464 (2015).
32. Hall, John E. (John Edward), 1946. *Tratado de Fisiología Médica*. (Elsevier, 2011).
33. Mannu, G. S. Retinal phototransduction. *Neurosciences* **19**, 275–280 (2014).
34. Fuhrmann, S., Zou, C. & Levine, E. M. Retinal pigment epithelium development, plasticity, and tissue homeostasis. *Experimental Eye Research* **123**, 141–150 (2014).
35. Gupta, M. P., Herzlich, A. A., Sauer, T. & Chan, C. C. Retinal anatomy and pathology. *Dev. Ophthalmol.* **55**, 7–17 (2015).
36. Goldman, D. Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nat.*

- Publ. Gr.* (2014). doi:10.1038/nrn3723
37. Li, L., Eter, N. & Heiduschka, P. The microglia in healthy and diseased retina. (2015). doi:10.1016/j.exer.2015.04.020
 38. Vetter, S. W. *Glycated Serum Albumin and AGE Receptors. Advances in Clinical Chemistry* (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/bs.acc.2015.07.005
 39. Zong, H., Ward, M. & Stitt, A. W. AGEs , RAGE , and Diabetic Retinopathy. 244–252 (2011). doi:10.1007/s11892-011-0198-7
 40. Tang, J. & Kern, T. S. Progress in Retinal and Eye Research Inflammation in diabetic retinopathy. *Prog. Retin. Eye Res.* **30**, 343–358 (2011).
 41. Kern, T. S. Contributions of Inflammatory Processes to the Development of the Early Stages of Diabetic Retinopathy. *Exp. Diabetes Res.* **2007**, 1–14 (2007).
 42. Grigsby, J. G. *et al.* The Role of Microglia in Diabetic Retinopathy. **2014**, (2014).
 43. Eshaq, R. S., Aldalati, A. M. Z., Alexander, J. S. & Harris, N. R. Diabetic retinopathy: Breaking the barrier. *Pathophysiology* 1–13 (2017). doi:10.1016/j.pathophys.2017.07.001
 44. Article, O. The Levels of the Circulating Cellular Adhesion Molecules ICAM-1 , VCAM-1 and Endothelin-1 and the Flow-mediated Vasodilatation Values in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus with Early-stage Diabetic Retinopathy. 2173–2178 (2013). doi:10.2169/internalmedicine.52.8572
 45. Aiello, L. P. & Wong, J. S. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int. Suppl.* **77**, S113–S119 (2000).
 46. Homayouni, M. Vascular endothelial growth factors and their inhibitors in ocular neovascular disorders. *J. Ophthalmic Vis. Res.* **4**, 105–114 (2009).
 47. Reich, O. *et al.* Anti-VEGF treatment patterns and associated health care

- costs in Switzerland: findings using real-world claims data. *Risk Manag. Healthc. Policy* **8**, 55–62 (2015).
48. Dyerberg, J. & Bang, H. O. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet* **2**, 433–435 (1979).
 49. Oh, D. Y. *et al.* GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell* **142**, 687–698 (2010).
 50. Novak, T. E., Babcock, T. A., Jho, D. H., Helton, W. S. & Espat, N. J. NF- κ B inhibition by ω -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF- α transcription. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **284**, L84–L89 (2003).
 51. Lo, C. J., Chiu, K. C., 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.* **82**, 216–221 (1999).
 52. De Caterina, R., Cybulsky, M. I., Clinton, S. K., Gimbrone, M. a & Libby, P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb.* **14**, 1829–1836 (1994).
 53. Somers, S. D. & Erickson, K. L. Alteration of tumor necrosis factor-alpha production by macrophages from mice fed diets high in eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acids. *Cell Immunol* **153**, 287–297 (1994).
 54. Sinha, S., Perdomo, G., Brown, N. F. & O'Doherty, R. M. Fatty acid-induced insulin resistance in L6 myotubes is prevented by inhibition of activation and nuclear localization of nuclear factor κ B. *J. Biol. Chem.* **279**, 41294–41301 (2004).
 55. Cintra, D. E. *et al.* Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One* **7**, (2012).
 56. Oliveira, V. *et al.* Diets containing alpha-linolenic (omega 3) or oleic (omega 9) fatty acids rescues obese mice from insulin resistance. *Endocrinology* en.2014-1880 (2015). doi:10.1210/en.2014-1880

57. Oh, D. Y. & Olefsky, J. M. Omega 3 fatty acids and GPR120. *Cell Metab.* **15**, 564–565 (2012).
58. Burns, R. N. & Moniri, N. H. Agonism with the omega-3 fatty acids ??-linolenic acid and docosahexaenoic acid mediates phosphorylation of both the short and long isoforms of the human GPR120 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 1030–1035 (2010).
59. Sánchez-Reyes, O. B. *et al.* Free fatty acids and protein kinase C activation induce GPR120 (free fatty acid receptor 4) phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* **723**, 368–374 (2014).
60. Watson, S.-J., Brown, A. J. H. & Holliday, N. D. Differential signaling by splice variants of the human free fatty acid receptor GPR120. *Mol. Pharmacol.* **81**, 631–42 (2012).
61. Yonezawa, T. *et al.* Free fatty acids-sensing G protein-coupled receptors in drug targeting and therapeutics. *Curr. Med. Chem.* **20**, 3855–71 (2013).
62. Neuringer, M., Connor, W. E., Lin, D. S., Barstad, L. & Luck, S. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 4021–5 (1986).
63. Connor, W. E. & Neuringer, M. The effects of n-3 fatty acid deficiency and repletion upon the fatty acid composition and function of the brain and retina. *Prog. Clin. Biol. Res.* **282**, 275–294 (1988).
64. Simón, M. V. *et al.* Synthesis of docosahexaenoic acid from eicosapentaenoic acid in retina neurons protects photoreceptors from oxidative stress. *J. Neurochem.* (2015). doi:10.1111/jnc.13487
65. Reeves, P. G., Nielsen, F. H. & Fahey, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **123**, 1939–1951 (1993).
66. Duarte, D. A. *et al.* Polyphenol-enriched cocoa protects the diabetic retina from glial reaction through the sirtuin pathway. *J. Nutr. Biochem.* **26**, 64–

- 74 (2015).
67. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
 68. Salmon, B. J. A. Supplementation of the diet with eicosapentaenoic acid: a possible approach to the treatment of thrombosis and inflammation By JOHN A. SALMON and TAKASHI. 385–389 (1980).
 69. Oh, D. Y. *et al.* GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* **142**, 687–98 (2010).
 70. SanGiovanni, J. P. & Chew, E. Y. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog. Retin. Eye Res.* **24**, 87–138 (2005).
 71. Sala-Vila, A. *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). doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.2906
 72. Vitto, M. F. *et al.* Reversion of steatosis by SREBP-1c antisense oligonucleotide did not improve hepatic insulin action in diet-induced obesity mice. *Horm. Metab. Res.* **44**, 885–890 (2012).
 73. Tobar, N. *et al.* Diacerein improves glucose tolerance and insulin sensitivity in mice on a high-fat diet 1747. *Endocrinology* **152**, 4080–4093 (2011).
 74. de Melo, C. L. *et al.* Oleanolic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet. *Chem. Biol. Interact.* **185**, 59–65 (2010).
 75. Moreira, P. I. High-sugar diets, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **16**, 440–445 (2013).
 76. Myles, I. A. Fast food fever: reviewing the impacts of the Western diet on immunity. *Nutr. J.* **13**, 61 (2014).

77. Milanski, M. *et al.* Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J. Neurosci.* **29**, 359–370 (2009).
78. De Souza, C. T. *et al.* Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* **146**, 4192–4199 (2005).
79. Olefsky, J. M. & Glass, C. K. Macrophages, Inflammation and Insulin Resistance. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 1–28 (2010).
80. Oh, D. Y. *et al.* A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nat. Med.* **20**, 942–7 (2014).
81. Georgiou, T. *et al.* Neuroprotective Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in a Rat Model of Anterior Ischemic Optic Neuropathy. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **58**, 1603 (2017).
82. Tikhonenko, M. *et al.* N-3 Polyunsaturated Fatty Acids Prevent Diabetic Retinopathy by Inhibition of Retinal Vascular Damage and Enhanced Endothelial Progenitor Cell Reparative Function. *PLoS One* **8**, 1–10 (2013).
83. Johansson, I. *et al.* 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 (2015).
84. Wang, L. *et al.* DHA Inhibited AGEs-Induced Retinal Microglia Activation Via Suppression of the PPAR α /NF κ B Pathway and Reduction of Signal Transducers in the AGEs/RAGE Axis Recruitment into Lipid Rafts. *Neurochem. Res.* **40**, 713–722 (2015).
85. Satapati, S. *et al.* GPR120 Suppresses Adipose Tissue Lipolysis and Synergizes with GPR40 in Anti-Diabetic Efficacy. *J. Lipid Res.* jlr.M075044 (2017). doi:10.1194/jlr.M075044
86. Trayhurn, P. & Denyer, G. Mining microarray datasets in nutrition:

- Expression of the GPR120 (n-3 fatty acid receptor/sensor) gene is down-regulated in human adipocytes by macrophage secretions. *J. Nutr. Sci.* **1**, 1–3 (2012).
87. Dragano, N. R. V. *et al.* Polyunsaturated fatty acid receptors, GPR40 and GPR120, are expressed in the hypothalamus and control energy homeostasis and inflammation. *J. Neuroinflammation* **14**, 91 (2017).
 88. Ulven, T. & Christiansen, E. Dietary Fatty Acids and Their Potential for Controlling Metabolic Diseases Through Activation of FFA4/GPR120. *Annu. Rev. Nutr.* **35**, 239–263 (2015).
 89. Ishii, S., Hirane, M., Kato, S., Fukushima, N. & Tsujiuchi, T. Opposite effects of GPR120 and GPR40 on cell motile activity induced by ethionine in liver epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **456**, 135–138 (2015).
 90. Cheshmehkani, A. *et al.* Fish oil and flax seed oil supplemented diets increase FFAR4 expression in the rat colon. *Inflamm. Res.* **64**, 809–815 (2015).
 91. Oliveira, V. *et al.* Diets containing alpha-linolenic (omega 3) or oleic (omega 9) fatty acids rescues obese mice from insulin resistance. *Endocrinology* en.2014-1880 (2015). doi:10.1210/en.2014-1880
 92. Chen, K., Zhou, J., Zhang, F., Zhang, F. & Zhang, R. Transcription factor C / EBP β promotes the transcription of the porcine GPR120 gene. *J Mol Endocrinol.* **56(2)**, 91–100 (2015).
 93. Sala-Vila, A. *et al.* Dietary Marine ω -3 Fatty Acids and Incident Sight-Threatening Retinopathy in Middle-Aged and Older Individuals With Type 2 Diabetes. *JAMA Ophthalmol.* **134**, 1142 (2016).
 94. Connor, K. M. *et al.* Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat. Med.* **13**, 868–873 (2007).
 95. Demircan, N., Safran, B. G., Soylu, M., Ozcan, a a & Sizmaz, S. Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor

- (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye (Lond)*. **20**, 1366–9 (2006).
96. Kowluru, R. A. & Odenbach, S. Role of interleukin-1 β in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.* **88**, 1343–1347 (2004).
 97. Rajagopal, R. *et al.* Functional Deficits Precede Structural Lesions in Mice with High-Fat Diet-Induced Diabetic Retinopathy. *Diabetes* 1–35 (2016). doi:10.2337/db15-1255
 98. Aiello, L. P. *et al.* Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1480–7 (1994).
 99. Mahdy, R. a, Nada, W. M., Hadhoud, K. M. & El-Tarhony, S. a. The role of vascular endothelial growth factor in the progression of diabetic vascular complications. *Eye (Lond)*. **24**, 1576–1584 (2010).
 100. Wakabayashi, Y. *et al.* Correlation of vascular endothelial growth factor with chemokines in the vitreous in diabetic retinopathy. *Retina* **30**, 339–344 (2010).
 101. Abu El-Asrar, A. M. *et al.* Angiogenesis regulatory factors in the vitreous from patients with proliferative diabetic retinopathy. *Acta Diabetol.* **50**, 545–551 (2013).
 102. Shen, J. hui, Ma, Q., Shen, S. grong, Xu, G. T. & Das, U. N. Effect of ??-Linolenic acid on Streptozotocin-induced diabetic retinopathy indices in vivo. *Arch. Med. Res.* **44**, 514–520 (2013).
 103. Zhu, S.-H. *et al.* Paeoniflorin Suppressed High Glucose-Induced Retinal Microglia MMP-9 Expression and Inflammatory Response via Inhibition of TLR4/NF- κ B Pathway Through Upregulation of SOCS3 in Diabetic Retinopathy. *Inflammation* (2017). doi:10.1007/s10753-017-0571-z
 104. Sapielha, P. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids preserve retinal function in type 2 diabetic mice. *Nutr. Diabetes* **2**, e36 (2012).
 105. Ibrahim, Z. A., Armour, C. L., Phipps, S. & Sukkar, M. B. RAGE and TLRs: Relatives, friends or neighbours? *Mol. Immunol.* **56**, 739–744

- (2013).
106. Bierhaus, A. *et al.* Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Molecular Medicine* **83**, 876–886 (2005).
 107. Cintra, D. E. *et al.* Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One* **7**, (2012).
 108. Hombrebueno, J. R., Chen, M., Penalva, R. G. & Xu, H. Loss of synaptic connectivity, particularly in second order neurons is a key feature of diabetic retinal neuropathy in the Ins2Akita mouse. *PLoS One* **9**, (2014).
 109. Chang, R. C. hen. A. *et al.* High-Fat Diet-Induced Retinal Dysfunction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **56**, 2367–2380 (2015).
 110. Lam, B. L. *Full-Field Electroretinogram*. **1**, (Taylor & Francis Group; Florida, 2005).
 111. Kawasaki, K., Yonemura, K., Yokogawa, Y., Saito, N. & Kawakita, S. Correlation between ERG oscillatory potential and psychophysical contrast sensitivity in diabetes. *Doc. Ophthalmol.* **64**, 209–215 (1987).
 112. Kakiuchi, D. *et al.* Oscillatory potentials in electroretinogram as an early marker of visual abnormalities in vitamin A deficiency. *Mol. Med. Rep.* **11**, 995–1003 (2015).
 113. Yun, S. H. & Adelman, R. A. Recent developments in laser treatment of diabetic retinopathy. *Middle East Afr. J. Ophthalmol.* **22**, 157–163 (2015).
 114. Edema, M. Aflibercept, Bevacizumab, or Ranibizumab for Diabetic Macular Edema. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1193–1203 (2015).
 115. Giganti, M. *et al.* Adverse events after intravitreal infliximab (Remicade). *Retina* **30**, 71–80 (2010).