



FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

**Regulação da produção de Interleucina-8 por oxisteróis
no Epitélio Pigmentado da Retina: Implicações para a
Degenerescência Macular Relacionada com a Idade.**

Ana Filipa Marques de Brito

Setembro de 2008

**Regulação da produção de Interleucina-8 por oxisteróis no
Epitélio Pigmentado da Retina: Implicações para a
Degenerescência Macular Relacionada com a Idade.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, realizada sob a orientação científica do Doutor Paulo Pereira (Universidade de Coimbra) e do Dr. Alexandre Fernandes (Universidade de Coimbra).

Ana Filipa Marques de Brito

Setembro de 2008

Agradecimentos:

Em primeiro lugar, queria agradecer ao Doutor Paulo Pereira por ter permitido a realização deste projecto, pela sua orientação, pela simpatia com que me recebeu, e principalmente por ter sido mais que um simples orientador.

Ao Alexandre Fernandes, um sincero agradecimento por tudo. Pelo que me ensinou, pela paciência que teve para comigo, por todo o trabalho feito em conjunto, pela amizade, e principalmente por acreditar que uma Engenheira pode aprender Biologia. O seu modo de trabalhar, a entrega e dedicação à ciência não descurando nunca o lado humano das relações serão com certeza um exemplo para toda a vida.

A todo o Grupo da Biologia do Envelhecimento, por me terem recebido de 'braços abertos', por todos os ensinamentos, e todos os momentos bem passados.

Ao Professor Doutor Miguel Morgado, por acreditar e lutar por Engenharia Biomédica.

E porque este trabalho é o culminar de 5 anos, a todas as pessoas que passaram pela minha vida em Coimbra. Em especial àqueles que comigo formaram uma 'família' (Carolina, Ana Luísa, Rafaela, Sílvia, Lipe, Marçal, Paula, Marisa, Bianca e Sérgio), obrigado pela companhia, pelos momentos bem passados, pelo caminho percorrido em conjunto, enfim por terem surgido na minha vida.

Por fim, mas em primeiro em grau de importância, a toda a minha família.

Em particular ao meu irmão por ter sido o meu primeiro mestre, e por acreditar em mim, por vezes até mais que eu própria, não me deixando nunca desistir. Aos meus pais, por tudo, por terem feito de mim a pessoa que hoje sou, por estarem presentes em todas as etapas da minha vida e me ajudarem a ultrapassar todos os obstáculos. E ao tio Zé, por ter moldado a minha personalidade desde pequena, por me ensinar a viver rodeada de alegria e afecto, e ser uma das pessoas que mais admirei ao longo da minha vida.

Índice

- 1 – Lista de abreviaturas *página 1*
- 2 – Resumo *página 3*
- 3 – Introdução *página 4*
 - 3.1 – Anatomia e fisiologia do olho humano *página 4*
 - 3.2 – Degenerescência macular relacionada com a idade *página 6*
 - 3.3 – Stress oxidativo e degenerescência macular relacionada com a idade *página 9*
 - 3.4 – Inflamação e DMRI *página 12*
 - 3.5 – Colesterol e os seus produtos de oxidação: relevância para a DMRI *página 14*
- 4 – Procedimento experimental *página 18*
 - 4.1 – Materiais *página 18*
 - 4.2 – Cultura celular e tratamentos *página 18*
 - 4.3 - Western Blotting *página 19*
 - 4.4 - Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) *página 20*
 - 4.5 – PCR em tempo real *página 20*
 - 4.6 – Análise estatística *página 21*
- 5 – Resultados *página 22*
 - 5.1 - 25-hidroxicolesterol aumenta a produção de IL-8 em células do RPE *página 22*
 - 5.2 - O aumento na produção de IL-8 pelo 25-OH não resulta de um processo oxidativo *página 23*
 - 5.3 - 25-OH activa a ERK em células do RPE *página 24*
 - 5.4 - O aumento da produção de IL-8 em resposta ao 25-OH é dependente da PI3K e da ERK *página 26*
- 6 – Discussão *página 29*
- 7 – Bibliografia *página 34*

1 - Lista de abreviaturas

acetil CoA - acetilcoenzima A

BSA – Albumina sérica bovina

CFH – Factor H do complemento

Chol - Colesterol

CNV – Neovascularização coroideia

DMEM-F12 – Dulbecco's modified eagle medium/Nutrient mixture F-12 ham

DMRI – Degenerescência macular relacionada com a idade

DMSO – Dimetilsulfóxido

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

ER – Retículo endoplasmático

ERK – Cinase regulada por sinais extracelulares

FBS – Soro fetal bovino

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GSH - Glutathione

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HRP – *Horseradish-peroxidase*

HMG-CoA – Redutase de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

IL – Interleucina

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

MAC – Complexo de ataque à membrana

MAPK – Proteína activadora mitogénica cinase

MCP-1 – Proteína quimiotáctica de monócitos-1

PBS – Tampão fosfato salino

PI3K – Fosfatidilinositol 3-cinase

ROS – Espécies reactivas de oxigénio

RPE – Epitélio pigmentado da retina

TNF- α – Factor de necrose tumoral alfa

UPP – Via da ubiquitina-proteassoma

VEGF – Factor de crescimento do endotélio vascular

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

7KC – 7-Cetocolesterol

7 β -OH – 7-beta-hidroxicolesterol

25-OH – 25- hidroxicolesterol

2 - Resumo

A inflamação é uma componente importante de várias doenças associadas ao envelhecimento, como a degenerescência macular relacionada com a idade (DMRI).

Os oxisteróis aumentam a produção de IL-8, uma citocina inflamatória importante, em diversos tipos celulares. Este aumento nos níveis de IL-8 poderá contribuir para as propriedades inflamatórias dos oxisteróis

No entanto, os mecanismos moleculares que regulam a expressão da IL-8 nestas condições não são ainda claros.

Assim, o objectivo deste trabalho foi identificar alguns dos mecanismos moleculares através dos quais os oxisteróis levam à produção de IL-8 em células do epitélio pigmentado da retina (RPE).

A exposição das células ARPE-19 a 25-OH resultou num aumento significativo da expressão e libertação de IL-8. Este efeito parece ser específico para este oxisterol e independente das suas eventuais propriedades oxidativas (pro-oxidante). Aparentemente o mecanismo através do qual o 25-OH leva ao aumento na produção de IL-8 envolve a activação da via ERK mediada pela PI3K. Consistente com este mecanismo, a inibição de cada uma destas vias diminuiu significativamente a produção de IL-8 em resposta ao 25-OH.

Na globalidade, os resultados aqui apresentados permitem propor um novo mecanismo molecular através do qual o 25-OH aumenta a produção de IL-8 em células do RPE.

Assim, este estudo pode constituir uma contribuição importante para esclarecer os mecanismos moleculares que conduzem à inflamação no RPE, que é uma componente importante para doenças degenerativas da retina associadas ao envelhecimento, incluindo a DMRI.

3 - Introdução

3.1 - Anatomia e fisiologia do olho humano

Anatomicamente, o globo ocular é constituído por três camadas concêntricas: a retina, a coróide e a esclera. No seu exterior existem seis músculos que são responsáveis pelos movimentos oculares (Edward et al., 2003; Kaplan, 2007; Parier, et al., 2008).

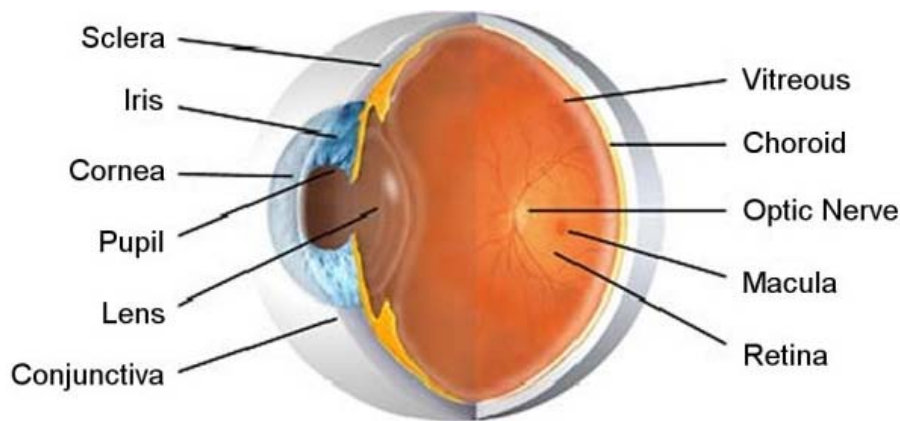


Figura. 1: Anatomia do olho humano (retirado de: www.freedomscientific.com)

A retina (camada mais interna do globo ocular) é constituída por vários tipos de células (figura 2). A camada mais externa da retina (isto é, a que está mais afastada do centro do olho) consiste exclusivamente em fotorreceptores (cones e bastonetes), responsáveis pelo processamento da informação visual. Junto aos fotorreceptores encontra-se o epitélio pigmentado da retina (RPE) que consiste numa única camada de células especializadas na manutenção e bom funcionamento dos fotorreceptores. O RPE por sua vez é adjacente à membrana de Bruch (membrana permeável situada entre o RPE e a coróide) (figura 2) (Forrester, 2003; Strauss, 2005; Jager et al., 2008).

A coróide, uma camada muito rica em vasos sanguíneos, localiza-se imediatamente a seguir à membrana de Bruch e fornece oxigénio e nutrientes ao RPE e aos fotorreceptores (figura 2) (**Parier et al., 2008; Forrester, 2003**).

O RPE desempenha um papel fundamental na manutenção da função visual. Para além de fazer parte da barreira hemato-retiniana, o RPE participa na reciclagem do retinal dos fotorreceptores (derivado da vitamina A que funciona como cromóforo para os pigmentos visuais), convertendo o *all-trans* retinal em *11-cis* retinal. Esta conversão permite a regeneração dos pigmentos visuais nos segmentos exteriores dos fotorreceptores.

Outra função importante do RPE é a fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores, permitindo a sua constante renovação (**Strauss, 2005; Rattner et al., 2006**). Esta elevada actividade fagocítica do RPE acontece durante toda a vida. Como consequência, ocorre uma acumulação de agregados proteicos e lipídicos (lipofuscina) no interior das células do RPE durante o envelhecimento. A lipofuscina funciona como fotossensibilizador, gerando espécies reactivas de oxigénio dentro das células na sequência da exposição à luz visível (**Kennedy et al., 1995; Sparrow et al., 2005**), podendo contribuir para a disfunção do RPE.

O RPE fornece ainda os nutrientes necessários à manutenção da integridade dos fotorreceptores e coriocapilares e desempenha um papel importante na imunidade do olho (**Strauss, 2005**).

Possuindo todas estas funções, o RPE é essencial na manutenção da função visual. Assim, a disfunção do RPE pode conduzir à degenerescência da retina, perda da função visual e, em última instância, à cegueira.

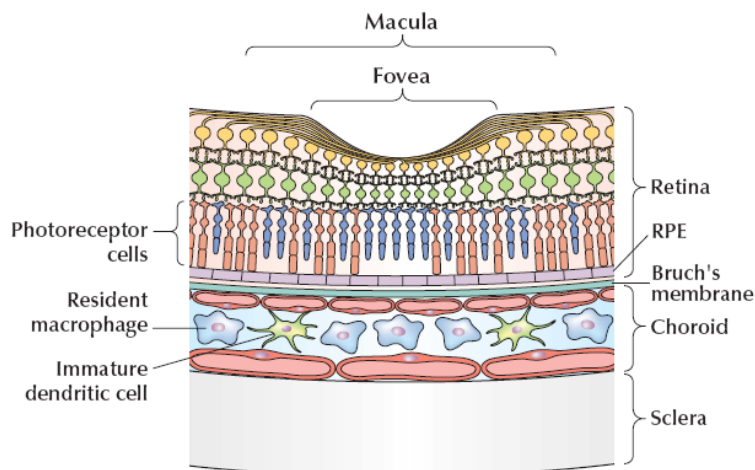


Figura 2: A retina humana. A mácula, e principalmente a sua parte central, a fóvea, possuem uma grande densidade de cones, essenciais para a acuidade visual. (retirado de: **Forrester, 2003**).

3.2 - Degenerescência macular relacionada com a idade

Devido ao aumento da esperança média de vida nas últimas décadas, as doenças associadas ao envelhecimento são cada vez mais prevalentes. Entre este tipo de patologias contam-se as doenças neurodegenerativas, alguns tipos de cancro, a aterosclerose e doenças da visão, como a degenerescência macular relacionada com a idade (DMRI) (**Knight, 2000; Malvitte et al., 2006; Tosato et al., 2007**).

A DMRI é uma doença complexa e multifactorial e uma das principais causas de cegueira nos países industrializados, especialmente na população acima dos 60 anos. Os mecanismos moleculares subjacentes a esta doença não são ainda totalmente claros e as opções terapêuticas correntes são ainda limitadas. (**Gorin et al., 1999; Forrester, 2003; Beatty et al., 2000; Nowak, 2006; Fernandes et al., 2007 Hooper et al., 2008**).

A DMRI é caracterizada pela perda de acuidade visual, perda de visão central, alteração da sensibilidade cromática e fotofobia. Esta patologia afecta a visão central

sem no entanto interferir com a visão periférica (figura 3) (Segato T et al., 1993; Hooper et al., 2008; Rattner et al., 2006).



Figura 3: A mesma figura vista por uma pessoa saudável (esquerda) ou por um doente com DMRI (direita). Tal como ilustra a foto à direita, a DMRI afecta a visão central (retirado de: www.nei.nih.gov/health/maculardegen/armd_facts.asp).

Fisiologicamente, a DMRI é uma patologia que afecta a parte central da retina, a mácula (figura 2). A mácula é extremamente rica em cones, e é a responsável pela visão central. Assim, quando as células da mácula degeneram a visão central é comprometida sem prejudicar a visão lateral ou periférica (Rattner et al., 2006; Hooper et al., 2008; Parier et al., 2008).

Uma das primeiras manifestações clínicas da DMRI observadas por exame do fundo do olho é o aparecimento de *drusen*, depósitos extracelulares de lípidos, proteínas e restos celulares que se acumulam na membrana de Bruch, tornando-a mais rígida e dificultando a difusão de oxigénio e nutrientes. (Anderson et al., 2002; Patel M et al, 2008; Patel PJ et al, 2008). Apesar de a acumulação de *drusen* fazer parte do processo natural de envelhecimento, a presença excessiva destes depósitos confere uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de DMRI (Abdelsalam et al., 1999; Anderson et al., 2002; Patel M et al, 2008).

A DMRI é dividida em dois tipos, a forma atrófica e a forma exsudativa.

A forma atrófica é a forma mais comum da DMRI, e representa 80 a 90% de todos os casos da doença, sendo responsável por cerca de 10 a 20% de todos os casos de perda acentuada de visão. A DMRI é uma doença de progressão lenta e caracterizada pela acumulação de *drusen*, apoptose das células do RPE (atrofia geográfica), e pela disfunção e degenerescência dos fotorreceptores (**Bird, 2003; Nowak, 2006; Patel M, et al., 2008**).

A forma exsudativa representa apenas 10 a 20% de todos os casos de DMRI, mas é responsável por 80 a 90% dos casos de perda acentuada de visão.

A principal característica da forma exsudativa da DMRI é a neovascularização coróideia (CNV), que consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir da coróide em direcção à retina (fig. 4). Estes novos vasos são extremamente permeáveis, levando a hemorragias sub-retinianas e conduzindo à perda de visão (**Malvitte et al., 2006; Rattner et al., 2006, Patel M et al., 2008; van Leeuwen et al, 2003**).

Entre os factores de risco para a DMRI incluem-se factores ambientais, nutricionais e genéticos. Um denominador comum a muitos destes factores é o stress oxidativo (**Beatty et al., 2000; Liang et al., 2003; van Leeuwen et al, 2003; Fernandes et al., 2007**). A inflamação parece também ter um papel importante na progressão da doença (**Anderson et al., 2002; Donoso et al., 2006; Patel et al, 2008**). No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais estes insultos conduzem ao desenvolvimento da DMRI não são ainda claros.

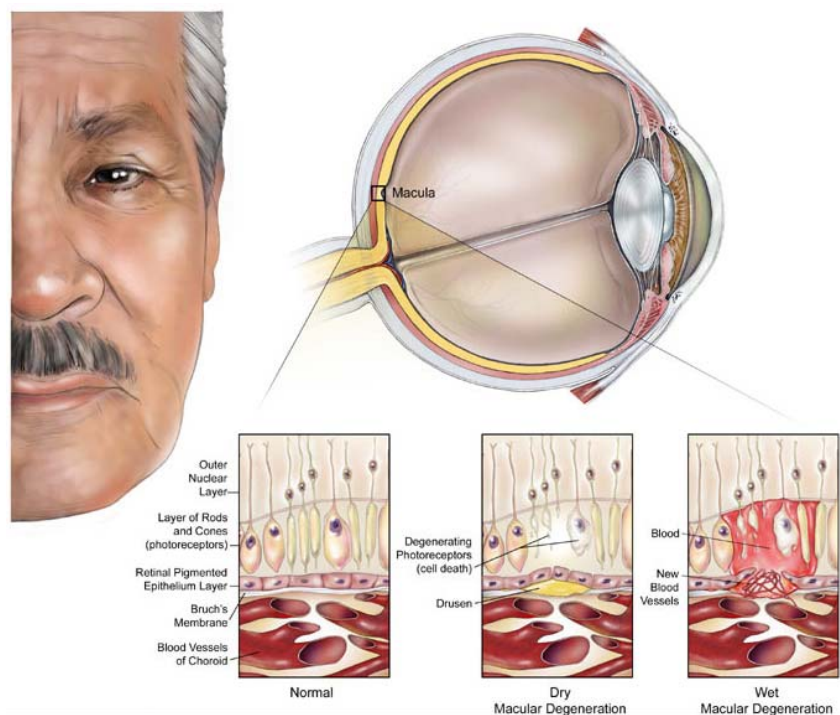


Figura 4: DMRI atrófica vs exsudativa. A forma atrófica é de progressão lenta e caracterizada pela acumulação de *drusen*, enquanto que na exsudativa ocorre a formação de novos vasos sanguíneos a partir da coróide até à retina (retirado de: www.nei.nih.gov/health/maculardegen/armd_facts.asp).

3.3 - Stress Oxidativo e degenerescência macular relacionada com a idade

As espécies reactivas de oxigénio (ROS) são produtos do metabolismo celular normal, sendo produzidas principalmente pela mitocôndria, e desempenham um papel importante em processos de sinalização celular (Cai et al., 2000; Dröge 2002; Valko et al., 2007).

As ROS são, na sua maioria, radicais livres, isto é, espécies que contém um ou mais pares de electrões desemparelhados em orbitais atómicas ou moleculares, o que lhes confere uma elevada reactividade química (Dröge, 2002; Valko et al., 2007).

Em condições fisiológicas normais, existe um equilíbrio entre as espécies oxidantes e antioxidantes (equilíbrio *redox*).

Assim, a produção de ROS é normalmente neutralizada pelos mecanismos antioxidantes da própria célula (Figura 5) (Beatty et al. 2000; Dröge, 2002; Olinski et al., 2007).

No entanto, em situações de stress, os níveis de ROS podem aumentar drasticamente, causando danos significativos em várias macromoléculas, nomeadamente lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. Entre os estímulos que aumentam a produção de ROS contam-se a radiação UV (particularmente importante em tecidos oculares, como a retina), o envelhecimento e a inflamação, entre outros (Beatty et al., 2000; Cai et al., 2000; Fernandes et al., 2007).

O stress oxidativo, que se refere a danos celulares causados por ROS, participa no desenvolvimento de várias doenças associadas ao envelhecimento, incluindo a DMRI (Winkler et al, 1999; Beatty et al., 2000; Fernandes et al., 2007).

Por outro lado, torna-se cada vez mais consensual a possibilidade do desenvolvimento da DMRI estar relacionado com uma disfunção do RPE (Beatty et al., 2000; Boulton et al., 2001; Zarbin, 2004).

Esta disfunção pode dever-se à grande susceptibilidade do RPE ao stress oxidativo. De facto, um conjunto de estudos sugere que as células do RPE sofrem danos significativos quando expostas a um insulto oxidativo (Beatty et al., 2000; Cai J et al, 2000; Liang et al, 2003).

A retina é particularmente susceptível ao stress oxidativo devido à sua elevada actividade metabólica e, conseqüentemente, elevado consumo de oxigénio, à sua composição rica em ácidos gordos polinsaturados e à exposição constante à luz visível. Assim, as células do RPE estão constantemente expostas a altos níveis de ROS, podendo ser alvo de lesões oxidativas. (Beatty et al., 2000; Cai et al, 2000; Boulton et al., 2001).

A acumulação de lipofuscina no RPE durante o envelhecimento constitui uma fonte adicional de stress oxidativo. A lipofuscina é uma mistura de agregados proteicos e lipídicos, resultante da digestão dos segmentos externos dos fotorreceptores pelo RPE (Kennedy, 1995; Sparrow et al., 2005). Tendo o A2E como principal fluoróforo, a lipofuscina funciona como fotossensibilizador, promovendo a produção de ROS nas células na sequência da exposição a luz visível (Rozanowska et al., 1995; Rozanowska et al., 1998; Sparrow et al., 2003; Sparrow et al., 2005).

A importância do stress oxidativo no desenvolvimento da DMRI é bem ilustrada em diversos estudos que demonstram que a exposição de células do RPE a um

insulto oxidativo resulta num aumento de produção de citocinas angiogénicas e de factores de crescimento, bem como outras características típicas da DMRI (Schlingemann, 2004; Higgins et al., 2003; Kannan et al., 2006; Fernandes et al., 2008).

Para fazer face à toxicidade das espécies reactivas de oxigénio, a retina possui um sistema de defesas antioxidantes (figura 5). Entre elas contam-se enzimas antioxidantes (como a dismutase do superóxido e a catalase) e vários compostos químicos, incluindo as vitaminas A, C e E. (Beatty et al., 2000; Cai J et al., 2000)

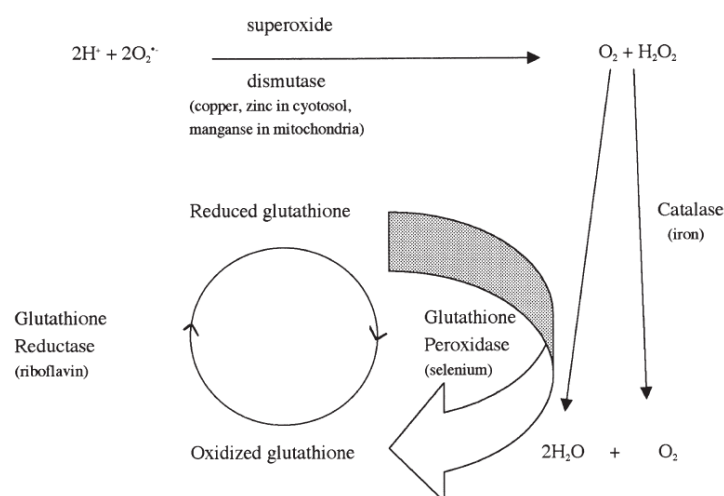


Figura 5: Papel das principais enzimas antioxidantes (dismutase do superóxido e catalase) na eliminação do radical superóxido e do peróxido de hidrogénio. (retirado de: Beatty et al., 2000).

Contudo, o processo de envelhecimento parece diminuir a capacidade antioxidante do RPE. Assim, é plausível que, com a idade, as células do RPE se tornem mais susceptíveis aos insultos oxidativos (Cai et al, 2000; Liang, 2003).

Consistente com esta hipótese, um estudo recente demonstrou que ratinhos sem a dismutase do superóxido-CuZn apresentam fenótipos típicos da DMRI em humanos (Imamura et al., 2006).

Em conjunto, estas observações destacam o papel do stress oxidativo no desenvolvimento da DMRI.

3.4 - Inflamação e DMRI

A inflamação consiste numa resposta dos tecidos a lesões causadas por traumas ou infecções. Trata-se de uma complexa rede de interações moleculares e celulares que facilitam o retorno à homeostase fisiológica, e a reparação dos tecidos (Vasto et al., 2007).

Uma grande variedade de doenças associadas ao envelhecimento, incluindo a DMRI, aterosclerose, artrite reumatóide e certos tipos de tumores, envolve uma componente inflamatória. (Beatty et al. 2000; McGeer et al., 2004; McGeer et al., 2005; Moshfeghi et al., 2007; Vasto et al., 2007).

A activação de factores de transcrição sensíveis ao estado *redox* das células pode levar a um aumento na expressão de citocinas inflamatórias, funcionando como um elo entre o stress oxidativo e a inflamação durante o envelhecimento (figura 6) (Lavrovsky et al., 2000; Chung et al., 2006).

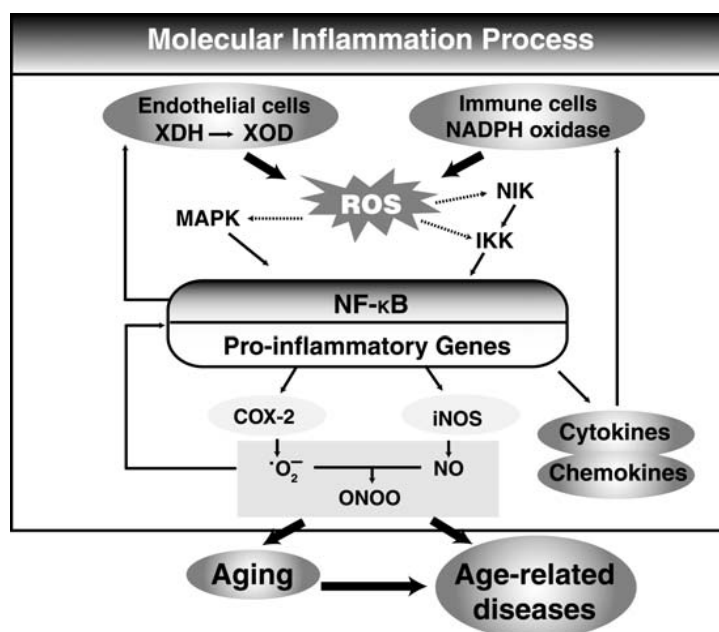


Figura 6: Efeitos do stress oxidativo na activação de mediadores inflamatórios durante o processo de envelhecimento (retirado de: Chung et al., 2006).

O sistema do complemento constitui uma parte fundamental da imunidade inata e tem como objectivo reconhecer e eliminar microorganismos invasores. Assim, uma disfunção neste sistema traduz-se na perda de reconhecimento imune (**Zipfel et al, 2006; Patel M et al, 2008**).

Alguns estudos recentes mostram que polimorfismos no factor H (um inibidor da via alternativa do complemento) e no factor B (um regulador positivo da via alternativa do complemento) estão associados a um aumento do risco para o desenvolvimento de DMRI (**Edwards et al. 2005; Gold et al., 2006; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005; Patel et al, 2008**), realçando a importância da componente inflamatória na patogénese da DMRI.

Curiosamente, um estudo recente sugere que o stress oxidativo no RPE pode levar à activação do complemento (**Zhou et al., 2006**). Por outro lado, a activação do complemento está associada a um aumento da expressão da interleucina-8 (IL-8) (**Fukuoka et al., 2001; Fukuoka et al, 2003**). A IL-8 é uma citocina inflamatória e pró-angiogénica importante (**Brat et al, 2005**) e a sua produção aumenta quando as células do RPE são expostas a segmentos externos de fotorreceptores oxidados (**Higgins et al., 2003**). Deve ainda salientar-se que um estudo recente do nosso laboratório sugere que a inactivação do proteassoma por oxidação pode constituir o elo molecular entre o stress oxidativo e o aumento na produção de IL-8 nas células do RPE (**Fernandes et al., 2008**), corroborando a ligação entre stress oxidativo e inflamação. Este aumento na produção de IL-8 pode contribuir, pelo menos em parte, para a componente inflamatória associada à progressão da DMRI (**Higgins et al., 2003; Kalayoglu et al., 2005**).

Existe ainda uma variedade de outros estudos, incluindo modelos animais de DMRI, que sugerem que a doença pode ter uma componente inflamatória significativa.

A proteína quimiotáctica de monócitos-1 (MCP-1) é uma quimiocina envolvida no recrutamento de macrófagos para zonas de inflamação (**Oppenheim et al., 1991**). No RPE, esta quimiocina desempenha um papel importante na remoção dos *drusen* (**Forrester JV, 2003**).

Recentemente, foi demonstrado que ratinhos deficientes em MCP-1 ou no seu receptor Ccr-2 desenvolvem fenótipos semelhantes aos observados na DMRI, incluindo acumulação de lipofuscina, formação de *drusen*, atrofia dos fotorreceptores e CNV (**Ambati et al., 2003**). A redução no recrutamento de macrófagos resulta na acumulação de componentes do complemento na retina. Uma vez que a deposição de

proteínas do complemento precede a acumulação de *drusen* e lipofuscina, é possível que os fenótipos observados se devam, pelo menos em parte, à activação do complemento e à deposição de complexos envolvidos na resposta imunitária (**Ambati et al., 2003**).

Na globalidade, estas e outras observações sugerem que a inflamação desempenha um papel importante na patogénese da DMRI.

3.5 - Colesterol e os seus produtos de oxidação: relevância para a DMRI

O colesterol é um componente importante da membrana plasmática das células eucarióticas. Tem como principais funções a manutenção da permeabilidade membranar e a regulação da sua fluidez (**Ikonen et al., 2008**). O colesterol também regula a função de proteínas membranares e participa em vários processos de sinalização celular (**Ikonen et al., 2008**). Para além disso, o colesterol é ainda necessário à biossíntese de várias hormonas, da vitamina D e de ácidos biliares. (**Ikonen et al., 2008**)

Uma vez que é apolar, o colesterol é transportado através da corrente sanguínea ligado a proteínas e outros lípidos, formando complexos denominados de lipoproteínas. Existem vários tipos de lipoproteínas, que podem ser classificadas de diversas maneiras. A classificação mais comum para as lipoproteínas baseia-se na sua densidade. Assim, existem lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL ou *Very Low-Density Lipoprotein*), lipoproteínas de baixa densidade (*Low Density Lipoproteins* ou LDL) e lipoproteínas de alta densidade (*High Density Lipoproteins* ou HDL) (**Olson, 1998**). As LDL são as principais transportadoras de colesterol no sangue, fornecendo-o aos tecidos periféricos, ao passo que as HDL estão envolvidas no processo inverso, ou seja, transporte de colesterol a partir dos tecidos periféricos para o fígado (**Olson, 1998**).

A nível celular, a síntese de colesterol ocorre no retículo endoplasmático (ER). O colesterol é sintetizado a partir da acetilcoenzima A (acetil CoA), através de uma cascata de reacções iniciadas pela HMG-CoA redutase (figura 7) (Sato et al, 1995).

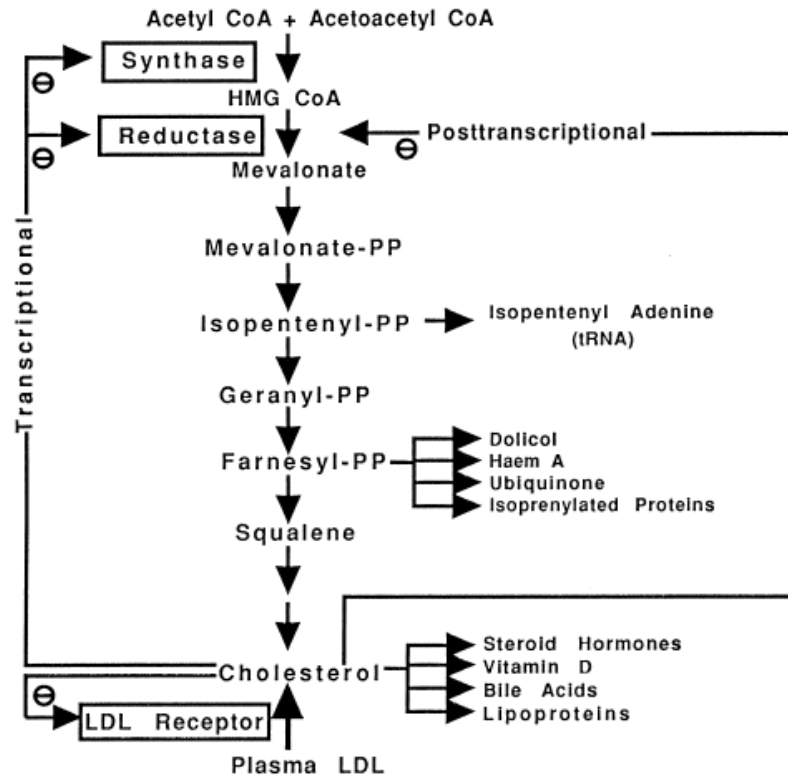


Figura 7: Biossíntese do colesterol. A nível celular, a síntese do colesterol ocorre através da cascata da HMG-CoA redutase. (retirado de: Sato et al, 1995).

O colesterol é facilmente oxidado, originando produtos designados por oxisteróis (Brown et al., 1999; Schroepfer, 2000) (Tabela 1). Estes produtos da oxidação do colesterol estão presentes no organismo numa quantidade bastante menor que o colesterol (cerca de mil vezes menos) e podem ser formados de forma enzimática ou não-enzimática (Brown et al., 1999; Schroepfer, 2000).

Os oxisteróis possuem um grande número de efeitos biológicos. Assim, os oxisteróis foram já implicados na regulação da transcrição genética, transdução do sinal, comunicação intercelular, diferenciação celular, integridade do citoesqueleto, função mitocondrial, entre outros (Schroepfer, 2000; Girão et al., 2003a; Girão et al.,

2003b; Girão et al., 2004). Para além destes efeitos, os oxisteróis alteram a homeostase do colesterol, incluindo a sua biossíntese e esterificação. (Kandutsch et al., 1975; Naseem et al., 1987; Brown et al., 1999). Ao contrário do colesterol, os oxisteróis são agentes citotóxicos. De facto, uma grande variedade de estudos demonstrou que os oxisteróis podem induzir apoptose em diversos tipos de células (Schroepfer, 2000; Wielkoszyński et al., 2006).

Deve ainda notar-se que os efeitos citotóxicos variam consoante o oxisterol e o tipo celular (Brown et al., 1999; Schroepfer, 2000; Malvitte et al., 2006).

Uma vez que resultam de um processo de oxidação do colesterol e que se acumulam em células ao longo do tempo, não é surpreendente que o envelhecimento de tecidos e órgãos esteja frequentemente associado à acumulação de oxisteróis. Com efeito, estes produtos de oxidação do colesterol parecem participar em doenças associadas ao envelhecimento, como a aterosclerose (Brown et al., 1999). A observação de que há uma acumulação de colesterol nas células do RPE e na membrana de Bruch durante o envelhecimento sugere o envolvimento dos oxisteróis na progressão da DMRI (Curcio et al., 2001; Curcio et al., 2005; Malvitte et al., 2006).

Tabela 1: Nomenclatura dos oxisteróis encontrados com mais frequência (Adaptado de: Brown et al., 1999)

Abbreviation	Common name(s)	IUPAC name
Cholestenone	Cholestenone	Cholest-4-en-3-one
α -EPOX	Cholesterol α -epoxide	Cholestan-5 α ,6 α -epoxy-3 β -ol
β -EPOX	Cholesterol β -epoxide	Cholestan-5 β ,6 β -epoxy-3 β -ol
α -TRIOL		Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol
4 α OH	4 α -Hydroxycholesterol	Cholest-5-en-3 β ,4 α -diol
4 β OH	4 β -Hydroxycholesterol	Cholest-5-en-3 β ,4 β -diol
6 β OH	6 β -Hydroxycholesterol	Cholest-5-en-3 β ,6 β -diol
7 α OH	7 α -Hydroxycholesterol	Cholest-5-en-3 β ,7 α -diol
7 β OH	7 β -Hydroxycholesterol	Cholest-5-en-3 β ,7 β -diol
7 α OOH	7 α -Hydroperoxy-cholesterol	Cholest-5-en-7 α -hydroperoxy-3 β -ol
7 β OOH	7 β -Hydroperoxy-cholesterol	Cholest-5-en-7 β -hydroperoxy-3 β -ol
7K	7-Ketocholesterol, 7-oxocholesterol	Cholest-5-en-3 β -ol-7-one
7Kdiene		Cholesta-3,5-diene-7-one
24OH	24-Hydroxycholesterol	Cholest-5-en-3 β ,24(<i>S</i>)-diol
25OH	25-Hydroxycholesterol	Cholest-5-en-3 β ,25-diol
27OH	26-Hydroxycholesterol, 27-Hydroxycholesterol	25 <i>R</i> -Cholest-5-en-3 β ,26-diol

O facto de os oxisteróis serem potentes mediadores inflamatórios poderá explicar a sua participação no desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento e com uma clara componente inflamatória, incluindo a DMRI. De facto, vários estudos demonstraram que os oxisteróis podem aumentar a produção de citocinas inflamatórias, como a IL-8, em vários tipos celulares, incluindo células do RPE (Lemaire-Ewing et al., 2008; Joffre et al., 2007; Rydberg et al., 2003; Liu et al, 1997).

Dado o potencial papel dos oxisteróis e da IL-8 na progressão da DMRI, o objectivo deste trabalho foi esclarecer os mecanismos moleculares através dos quais os oxisteróis levam à produção de IL-8 no RPE.

4 - Procedimento experimental

4.1 - Materiais

O meio de cultura DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham), os oxisteróis (25-hidroxicolesterol, 7-Cetocolesterol e 7-beta-hidroxicolesterol), o colesterol, a vitamina E, a glutatona, a BSA (albumina sérica bovina) ortovanadato de sódio e o anticorpo monoclonal contra a actina foram comprados à Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

O soro fetal bovino (FBS) e o antibiótico-antimicótico foram adquiridos à GIBCO (Grand Island, N.Y., USA).

Os inibidores MG132, UO126, FR180204 e LY294002 foram comprados à Calbiochem (La Jolla, Califórnia, E.U.A.).

A membrana de nitrocelulose para Western Blot foi comprada à Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).

Os anticorpos policlonais contra a ERK1/2 fosforilada, e ERK1/2 foram obtidos na Cell signaling Technology (Danvers, MA, USA). Os anticorpos secundários anti-mouse IgG e anti-rabbit IgG foram comprados à ZYMED Laboratories Inc. (San Francisco, CA, USA).

O ECL Western Blotting Detection kit foi adquirido à Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK).

O Duoset ELISA kit para a IL-8 é da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

O kit para extracção de RNA RNeasy mini e o SYBR Green PCR Master Mix são da Qiagen (Valencia, CA, USA).

4.2 - Cultura celular e tratamentos

A linha celular do epitélio pigmentado da retina ARPE-19 (Dunn et al., 1996) foi obtida na American Type Culture Collection (ATCC) e mantida a 37°C com atmosfera

de 5% de CO₂. As células foram mantidas em DMEM-F12 contendo 1% de penicilina-estreptomicina e 10% de FBS.

Antes dos tratamentos, as células foram lavadas com PBS (tampão fosfato salino) e posteriormente foi adicionado meio novo. Nas experiências para Western Blotting, o meio foi mudado no dia anterior às incubações.

Os oxisteróis (25-OH, 7-KC e 7-β-OH) e o colesterol foram preparados em etanol numa concentração de 10 mg/mL, e adicionados ao meio de cultura, de modo a obter uma concentração final de 20 µg/mL (50 µM). Células incubadas com etanol foram usadas como controlo.

U0126 (inibidor da MEK1/2), FR180204 (inibidor da ERK1/2) e LY294002 (inibidor da PI3K) foram preparados em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10mM, sendo diluídos para uma concentração final de 10µM em meio de cultura imediatamente antes da sua utilização. Os respectivos controlos foram incubados apenas com DMSO.

A glutationa foi preparada em água a 100 mM e a vitamina E foi preparada em DMSO a 50 mg/mL. Seguidamente foram diluídas para uma concentração final de 100µM (glutaciona) e 5µg/ml (vitamina E) em meio de cultura, imediatamente antes das incubações.

4.3 - Western Blotting

Após os tratamentos, as células foram lavadas com PBS, contendo 2 mM de ortovanadato de sódio (inibidor das fosfatases), e imediatamente recolhidas em tampão de Laemmli. Os lisados celulares foram depois desnaturados a 100°C durante 5 minutos e, posteriormente, sonicados 3 vezes por períodos de 5 segundos. As proteínas desnaturadas foram separadas por electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). As proteínas no gel foram depois transferidas para membranas de nitrocelulose, durante 1 hora a 100V. Em seguida, as membranas foram bloqueadas em 5% de leite durante 1 hora, e posteriormente incubadas com os anticorpos para a ERK1/2 fosforilada e ERK1/2 total (diluídas 1:1000 em TST contendo 5% de BSA) ou com o anticorpo para a actina (diluídas 1:5000 em TST contendo 5% de leite). Após a incubação com o anticorpo secundário

correspondente, as proteínas foram detectadas com o sistema ECL Western Blotting Detection kit.

4.4 - Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Os níveis de IL-8 libertada para o meio pelas células do RPE foram determinados por ELISA. Após os tratamentos, o meio de cultura foi recolhido e diluído 10 vezes para a determinação dos valores de IL-8. Uma placa de 96 poços foi revestida com um anticorpo monoclonal contra a IL-8. A placa foi imediatamente selada e deixada à temperatura ambiente durante a noite.

No dia seguinte, a placa foi lavada 3 vezes com 400 µL de tampão de lavagem (PBS contendo 0.05% de Tween-20) por poço. De seguida, foi bloqueada com PBS contendo 1% BSA durante 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, efectuaram-se novas lavagens e as amostras foram adicionadas à placa, sendo incubadas à temperatura ambiente durante 2 horas.

Depois de 3 lavagens, o anticorpo policlonal biotilado contra a IL-8 foi adicionado e incubado a 4°C durante a noite.

Após a incubação com estreptavidina-HRP durante 20 minutos à temperatura ambiente, a solução contendo o substrato (mistura 1:1 de reagente A – H₂O₂ – e reagente B – tetrametilbenzidina) foi adicionado às amostras. A reacção foi parada com H₂SO₄ 1M e a absorvância foi lida a 450 nm.

4.5 - PCR em tempo real

O RNA total foi extraído das células ARPE-19 utilizando o kit RNeasy mini (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizadas duas microgramas do RNA total de cada amostra para a transcrição reversa utilizando o sistema SuperScript First-Strand Synthesis para RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA,

E.U.A.). O *primer* directo para a IL-8 foi 5'-AAACCACCGGAAGGAACCAT-3' e o reverso foi 5'-CCTTCACACAGAGCTGCAGAAA-3'. Os níveis de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram utilizados para a normalização da quantidade total de RNAm. Para a quantificação do RNAm da GAPDH, o *primer* directo foi 5'-ATCACCATCTTCCAGGAGCGA-3' e o *primer* reverso foi 5'-CCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'.

O RT-PCR em tempo real foi realizado no sistema *ABI Prism 7000 Sequence Detection System*, utilizando o SYBR Green PCR Master Mix de acordo com as instruções do fabricante.

4.6 - Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o teste T de Student.

5 - Resultados

5.1 - 25-hidroxicolesterol aumenta a produção de IL-8 em células do RPE

Um número crescente de estudos indica que os produtos de oxidação do colesterol, ou oxisteróis, parecem estar associados à progressão de doenças com uma forte componente inflamatória, como a aterosclerose (Brown et al., 1999). A observação de que os oxisteróis aumentam a produção de IL-8, uma importante citocina inflamatória, em diversos tipos celulares (Joffre et al., 2007; Rydberg et al., 2003; Liu et al., 1997; Lemaire-Ewing et al., 2008) poderá justificar a ligação os oxisteróis e a inflamação.

De modo a esclarecer se os oxisteróis podem contribuir para a produção de citocinas inflamatórias no RPE, testou-se o efeito de vários oxisteróis na produção e libertação de IL-8.

A libertação de IL-8 para o meio, após tratamento com vários oxisteróis foi avaliada por ELISA.

Como se pode observar na figura 8A, após 24 horas de incubação, o 25-hidroxicolesterol (25-OH) leva a um aumento significativo na libertação de IL-8 relativamente ao controlo. Este efeito parece ser específico para o 25-OH, uma vez que outros oxisteróis testados, como o 7-Cetocolesterol (7-KC) e o 7-beta-hidroxicolesterol (7- β -OH), têm um efeito oposto, levando a uma redução nos níveis de IL-8 libertados para o meio.

O aumento na libertação de IL-8 foi induzido por 25-OH foi acompanhado por um aumento significativo nos níveis RNA de para a IL-8 (Figura 8B), sugerindo que este oxisterol regula a produção de IL-8 ao nível da transcrição.

A observação de que a adição de colesterol não tem qualquer efeito na produção de IL-8 pelas células ARPE-19 (Figura 8C) parece sugerir que apenas os produtos da oxidação do colesterol (como o 25-OH) induzem o aumento na produção desta citocina.

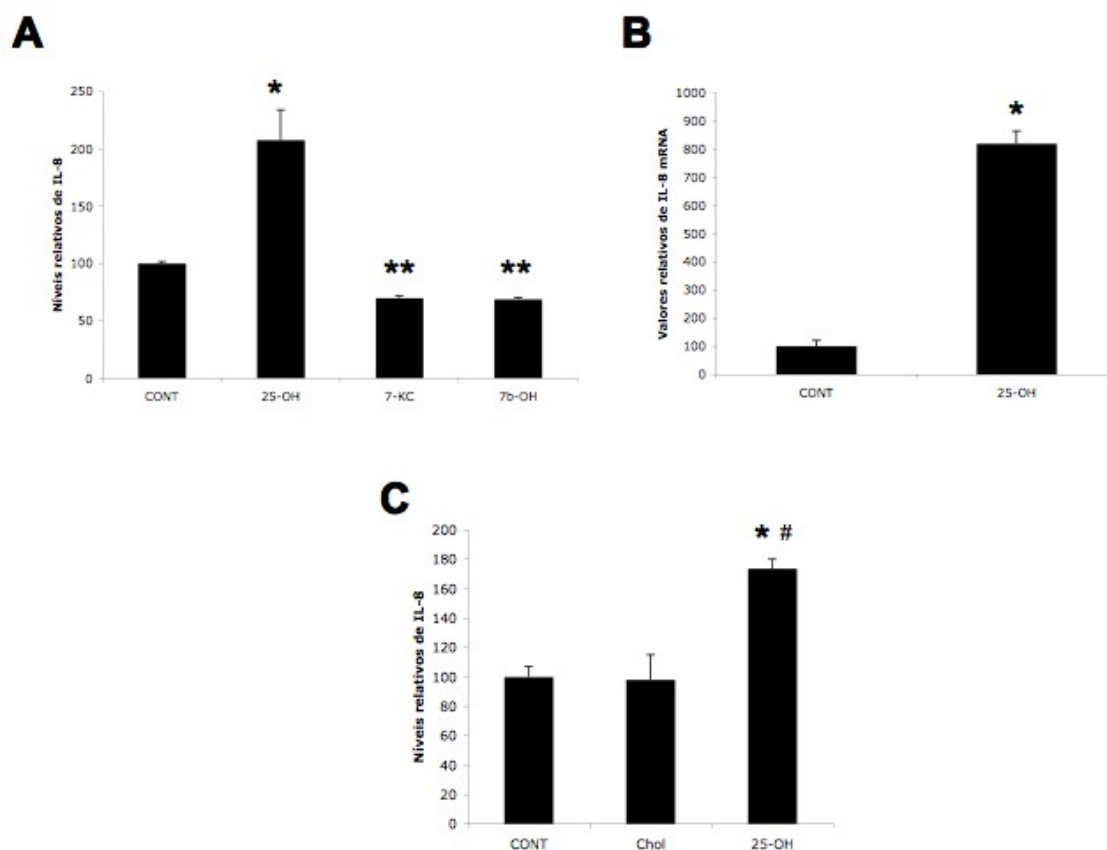


Figura 8: 25-hidroxicolesterol aumenta a produção de IL-8 em células do RPE. As células ARPE-19 foram incubadas com diferentes oxisteróis (20 µg/mL) (figura A) ou com colesterol (Chol) (20 µg/mL) durante 24 horas. Os controles foram incubados apenas com etanol. Os níveis de IL-8 no meio foram determinados por ELISA (painéis A,e C) e os níveis de RNA foram avaliados por RT-PCR em tempo real (painel B). Os resultados apresentados são a média ± S.D. de três experiências independentes. * p<0.001 e **p<0.05 quando comparado com o grupo controle; #p<0.001 quando comparado com o colesterol.

5.2 - O aumento na produção de IL-8 pelo 25-OH não resulta de um processo oxidativo

Resultados recentes do nosso laboratório sugerem que o stress oxidativo aumenta a produção de IL-8 nas células do RPE (Fernandes et al., 2008). Além disso, um estudo recente indica que o 25-OH leva a um aumento na produção de ROS em células do RPE (Joffre et al., 2007). Com base nestas observações seria possível sugerir que o 25-OH aumenta a produção de IL-8 através da produção de espécies

reactivas de oxigénio. Para testar essa hipótese, as células ARPE-19 foram pré-incubadas com diversos antioxidantes e de seguida tratadas com 25-OH.

A figura 9 mostra que o 25-OH aumenta a produção de IL-8 nas células do RPE. No entanto, nenhum dos antioxidantes testados (glutathiona e vitamina E) preveniu este efeito.

Estes resultados sugerem que o efeito do 25-OH na produção de IL-8 é independente do eventual efeito oxidativo que este oxisterol possa ter em modelos celulares.

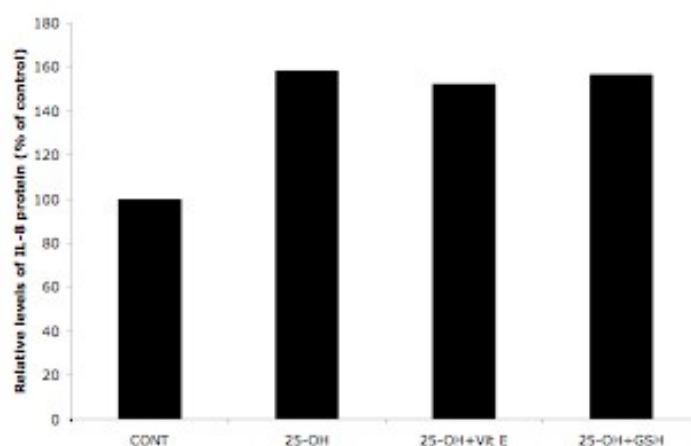


Figura 9: O aumento na produção de IL-8 pelo 25-OH não é um processo oxidativo. As células ARPE-19 foram incubadas com glutathiona (100 μ M) e vitamina E (5 μ g/mL) durante 6 horas e, subsequentemente, tratadas com 25-OH (20 μ g/mL) durante 24 horas. O controlo foi incubado apenas com DMSO e etanol. Os níveis de IL-8 no meio foram determinados por ELISA. Os resultados apresentados são a média de duas experiências independentes.

5.3 - 25-OH activa a ERK em células do RPE

Os resultados descritos anteriormente indicam que o 25-OH aumenta a produção de IL-8 nas células do RPE.

Um estudo recente demonstrou que o aumento na produção de IL-8 pelo 25-OH em macrófagos pode ser mediado pela via ERK1/2 (também designada por p44/42 MAPK) (Lemaire-Ewing et al., 2008).

Para determinar o efeito do 25-OH na activação desta via em células do RPE, as células ARPE-19 foram incubadas com 25-OH durante diferentes períodos de tempo e os níveis de ERK1/2 fosforilada foram analisados, uma vez que a fosforilação destas proteínas resulta na sua activação (Cobb et al., 1995; Seger et al., 1995).

Como se pode observar na figura 10A, a forma fosforilada da ERK2 não é detectável nos controlos (figura 10A, linhas 1 a 5). No entanto, na presença de 25-OH, a ERK2 fosforilada é detectada após 1 hora de incubação (Figura 10 A, comparar linhas 2 e 6). Após 3 horas de incubação com 25-OH, os níveis de ERK2 fosforilada aumentam relativamente aos observados à 1 hora (Figura 10A, comparar linhas 6 e 7). No entanto, ao fim de 6 horas de incubação com 25-OH, os níveis de ERK2 fosforilada diminuem quando comparada com os níveis detectados às 3 horas, sugerindo que o 25-OH poderá ter um efeito bifásico na activação da ERK2 em células do RPE. Ao fim de 12 horas, a fosforilação da ERK2 aumenta novamente, atingindo aí o efeito mais forte (Figura 10A, linha 9). Em contraste, os níveis de ERK1/2 total não variam significativamente em nenhuma das condições experimentais.

Após uma exposição mais prolongada do filme, é possível observar que, apesar de ambas as isoformas da ERK (ERK1 e ERK2) poderem ser activadas em resposta ao 25-OH, a ERK2 parece ser preferencialmente activada (Figura 10B).

Apesar destes resultados sugerirem que o 25-OH activa a ERK1/2 em células do RPE, o mecanismo molecular que resulta nesta activação é ainda desconhecido.

Estudos anteriores demonstraram que a activação da ERK pode ser dependente da PI3K (Chen e tal., 2001; Chen et al., 2002). Por outro lado, a via da PI3K é uma das vias de sinalização que pode ser activada em resposta aos oxisteróis (Millanvoye-Van et al., 2004).

Assim, é possível que a activação da ERK em resposta ao 25-OH em células do RPE seja mediada pela PI3K. Para testar essa hipótese, as células ARPE-19 foram pré-incubadas com LY294002, um inibidor da PI3K, durante 1 hora, e posteriormente tratadas com 25-OH durante 12 horas. Os resultados obtidos e apresentados na figura 10C mostram que o 25-OH activa a ERK2 em células do RPE (Figura 10C, comparar linhas 1 e 2), e que a activação da ERK2 em células incubadas com 25-OH é dependente da PI3K, uma vez que na presença de LY294002 não se observa fosforilação da ERK2 induzida pelo 25-OH (Figura 10C, comparar linhas 2 e 4).

Em conjunto, estes resultados sugerem que a activação da ERK pelo 25-OH em células do RPE ocorre através da activação da PI3K.

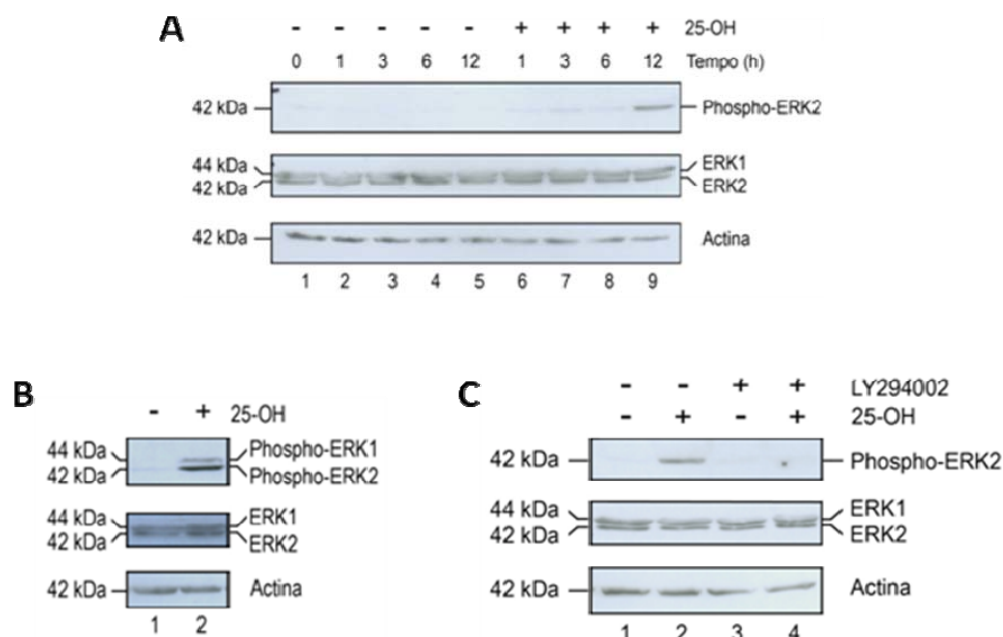


Figura 10: A activação da ERK no RPE em resposta ao 25-OH é dependente da PI3K. As células ARPE-19 foram incubadas na presença ou ausência de 25-OH durante 0, 1, 3, 6 e 12 horas (painel A) ou apenas 12 horas (painel B). Os níveis endógenos de ERK1/2 fosforilada, ERK1/2 total e actina foram detectados por Western Blot. Painel C: As células ARPE-19 foram pré-incubadas com LY294002 durante 1 hora e, posteriormente, incubadas com 25-OH durante 12 horas. Os controlos foram incubados apenas com etanol (painéis A e B) ou DMSO e etanol (painel C). Os níveis endógenos de ERK1/2 fosforilada, ERK1/2 total e actina foram detectados por Western Blot. As figuras são representativas de três experiências independentes com resultados semelhantes.

5.4 - O aumento da produção de IL-8 em resposta ao 25-OH é dependente da PI3K e da ERK

Os resultados anteriores indicam que o 25-OH leva a um aumento na produção de IL-8, e activa a ERK através da PI3K.

Resultados recentes do nosso laboratório sugerem que a via PI3K pode regular a produção de IL-8 em células do RPE (Fernandes et al., *unpublished data*). Para testar o envolvimento desta via na regulação da produção de IL-8 em resposta ao 25-

OH, determinou-se o efeito de um inibidor da PI3K na produção de IL-8 induzida por 25-OH.

A figura 11A indica que a produção de IL-8 induzida pelo 25-OH nas células do RPE é dependente da PI3K, uma vez que o LY294002 preveniu o aumento dos níveis de IL-8 induzido pelo 25-OH.

Mesmo na ausência de 25-OH, a inibição da PI3K resulta numa diminuição na produção de IL-8 por parte das células do RPE.

Com foi referido anteriormente, a via da ERK também parece estar implicada na produção de IL-8 em resposta aos oxiesteróis (**Lemaire-Ewing et al., 2008**).

A figura 11B demonstra que o 25-OH aumenta a produção de IL-8 nas células do RPE através da via ERK, dado que o U0126, inibidor das MEK, cinases que fosforilam a ERK1/2, é capaz de prevenir o aumento nos níveis de IL-8 induzido pelo 25-OH.

Mesmo em células controlo, o inibidor levou a um decréscimo na produção de IL-8.

A utilização de FR180204, um inibidor específico da ERK1/2, também preveniu o efeito do 25-OH ao nível da produção de IL-8 (figura 11C), corroborando o envolvimento da ERK na regulação da produção de IL-8 em resposta ao 25-OH.

Em conjunto, estes resultados indicam que o 25-OH aumenta a produção de IL-8 em células do RPE de uma forma dependente das vias PI3K e ERK.

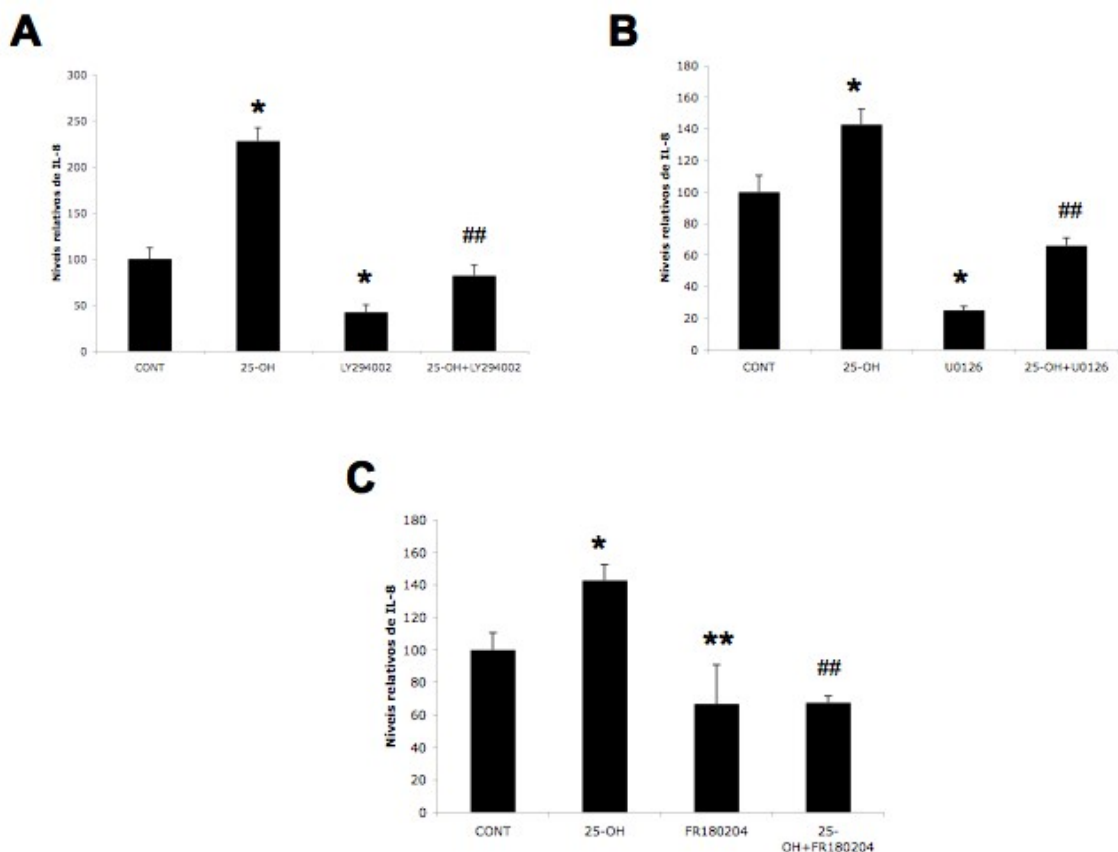


Figura 11: A produção de IL-8 em resposta ao 25-OH é dependente da PI3K e ERK. As células ARPE-19 foram pré-incubadas na presença ou ausência de 10 μ M de LY294002 (painel A), U0126 (painel B) ou FR180204 (painel C) uma hora antes da incubação na presença ou ausência de 25-OH (20 μ g/mL) durante 24 horas., Os controles foram incubados apenas com DMSO e etanol. Os níveis de IL-8 libertada para o meio foram determinados por ELISA. Os resultados apresentados são a média \pm S.D. de três experiências independentes. * $p < 0.001$ e ** $p < 0.05$ quando comparado com o grupo controle; ## $p < 0.001$ quando comparado com o 25-OH

6 - Discussão

Recentemente tem sido proposto que a inflamação pode desempenhar um papel importante na progressão de doenças degenerativas da retina, incluindo a DMRI.

Com efeito, alguns estudos recentes demonstraram que polimorfismos no Factor H (CFH) e no factor B do complemento (reguladores da via alternativa do complemento) estão associados a um aumento do risco para desenvolver DMRI (Edwards et al., 2005; Gold et al., 2006; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005).

Estudos com ratinhos deficientes em MCP-1, uma quimiocina envolvida no recrutamento de macrófagos para zonas de inflamação (Oppenheim, 1991), mostraram ainda que estes modelos animais desenvolvem fenótipos semelhantes aos observados na DMRI, incluindo acumulação de lipofuscina e *drusen*, atrofia dos fotorreceptores e CNV (Ambati et al., 2003).

Recentemente, Zhou e colaboradores demonstraram que o stress oxidativo leva à activação do complemento (Zhou et al., 2006). Uma vez que a activação do complemento conduz a um aumento na produção de IL-8 (Fukuoka et al., 2001; Fukuoka et al., 2003), é possível que o stress oxidativo a que o RPE está exposto possa contribuir para o aumento na componente inflamatória observada na DMRI.

Apesar disto, os mecanismos moleculares subjacentes ao stress oxidativo que conduzem ao aumento da inflamação não são ainda claros.

Um trabalho recente desenvolvido no nosso laboratório sugere que a inactivação da via ubiquitina-proteossoma (UPP) no RPE pode ser o elo molecular entre stress oxidativo, inflamação e DMRI (Fernandes et al., 2007).

Com efeito, resultados obtidos em células do RPE mostraram que há inactivação do proteossoma em condições de stress oxidativo (Zhang et al., 2008) e que esta inactivação resulta no aumento dos níveis de IL-8 (Fernandes et al., 2008). A inactivação do proteossoma no RPE conduz ainda a um aumento da produção do VEGF (Fernandes et al., 2006) e a uma diminuição nos níveis de MCP-1 (Fernandes et al., 2006) e do CFH (Fernandes, unpublished data).

No seu conjunto, estes resultados indicam que a inibição do proteossoma no RPE parece reproduzir algumas das características observadas na DMRI.

Os nossos resultados recentes indicam ainda que a inibição do proteossoma em células do RPE leva à activação de vias de sinalização celular como a p38 MAPK e a PI3K, contribuindo para o aumento nos níveis de IL-8 (**Fernandes et al., unpublished data**).

Na globalidade, estes resultados indicam que o stress oxidativo a que o RPE está sujeito pode resultar na disfunção do proteossoma, alterações em vias de sinalização celular e, conseqüentemente, em fenótipos celulares semelhantes aos observados na DMRI.

No entanto, como já foi referido, existem situações em que o aumento na produção de IL-8 em células sujeitas a stress não está relacionado com a inibição do proteossoma.

Os oxisteróis, que são produtos da oxidação do colesterol, aumentam a produção de IL-8 em diversos tipos celulares (**Lemaire-Ewing et al., 2008; Joffre et al., 2007; Rydberg et al., 2003; Liu et al., 1997**) e estão implicados em diversas doenças associadas ao envelhecimento com uma forte componente inflamatória (**Brown et al., 1999**).

A acumulação destes compostos durante o envelhecimento em vários tecidos oculares, incluindo o cristalino (**Girão et al., 1998**) e a retina (**Curcio et al., 2001; Curcio et al., 2005**) sugere que os oxisteróis podem ser relevantes para a componente inflamatória associada à DMRI.

No entanto, os mecanismos moleculares que regulam a expressão das citocinas inflamatórias, como a IL-8, nestas condições não são ainda claros.

Os resultados aqui apresentados demonstram que a exposição de células ARPE-19 ao 25-OH aumenta a expressão e libertação de IL-8 (Figura 8). O 25-OH também leva à activação das vias PI3K e ERK (Figura 10). Consistente com este mecanismo, a inibição de cada uma destas vias diminuiu significativamente a produção de IL-8 em resposta ao 25-OH (Figura 11).

Estes resultados indicam que o 25-OH aumenta a produção de IL-8 em células do RPE através de um mecanismo que envolve a activação da PI3K e ERK, tal como está ilustrado na figura 12. Segundo o modelo proposto, o 25-OH leva à activação da PI3K. Esta, por sua vez, promove a fosforilação e activação da ERK. Uma vez activada, a ERK leva a um aumento na produção de IL-8 através de um mecanismo ainda desconhecido.

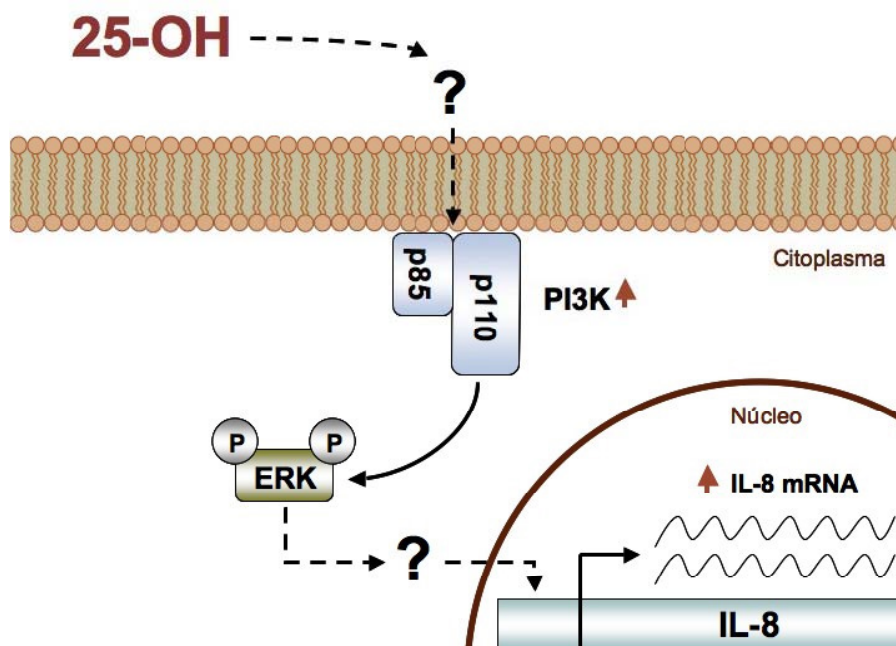


Figura 12 - Modelo esquemático para o aumento da produção de IL-8 em resposta ao 25-OH em células do RPE. Neste modelo, o 25-OH leva à activação da PI3K. Esta, por sua vez, promove a fosforilação e activação da ERK. Uma vez activada, a ERK leva a um aumento na produção de IL-8 através de um mecanismo ainda desconhecido.

Dos oxisteróis testados, o 25-OH é aquele que tem o efeito mais robusto em termos de produção de IL-8 (Figura 8A). Esta observação é consistente com estudos anteriores que mostram que este oxisterol é o mais potente na indução de genes associados ao processo inflamatório (Rydberg et al., 2003; Liu et al., 1997).

Deve ainda salientar-se que o aumento na produção de IL-8 pelo 25-OH parece ser um processo independente da oxidação (Figura 9). Este resultado está de acordo com um estudo anterior onde a adição de vitamina E não impediu a produção de IL-8 induzida por 25-OH em células ARPE-19 (Joffre et al., 2007).

Para além disso, resultados preliminares do nosso laboratório demonstram que os oxisteróis (25-OH e 7-KC) não têm efeito na actividade do proteossoma.

Assim, estes resultados indicam que a presença de oxisteróis conduz a um aumento na produção de IL-8, através de um mecanismo que não envolve stress oxidativo ou consequente inibição do proteossoma.

O aumento na produção de IL-8 pelas células ARPE-19 em resposta ao tratamento com 25-OH resulta da activação da ERK. Este efeito parece ser específico

para a ERK, uma vez que o 25-OH não teve qualquer efeito na activação de outras MAPKs testadas, como a p38 MAPK ou JNK. Um estudo recente mostrou um efeito semelhante em macrófagos (**Lemaire et al., 2008**), o que permite corroborar a hipótese proposta neste estudo para o RPE.

O mecanismo molecular pelo qual o 25-OH conduz à activação da PI3K e consequente activação da ERK em células do RPE não é ainda claro.

Um candidato possível para mediar os efeitos do 25-OH nas células do RPE é a OSBP (*oxysterol binding protein*). As OSBPs são uma família de proteínas que ligam colesterol e que estão envolvidas em diversos aspectos celulares, como o transporte de vesículas, metabolismo dos lípidos e sinalização celular (**Lehto et al., 2003**).

O 25-OH é o oxisterol que liga as OSBP com maior afinidade (**Massey, 2006**). Mais, estas proteínas têm um papel importante na activação da ERK (**Wang et al., 2005**), o que torna plausível a hipótese de que as OSBP possam estar a mediar os efeitos do 25-OH na activação destas vias de sinalização.

Outro mecanismo que pode justificar a acção do 25-OH é a sua capacidade de interferir com o a homeostase do colesterol. De facto, vários estudos indicam que o 25-OH pode induzir alterações nos domínios ricos em colesterol (*lipid rafts*) das membranas de células em cultura (**Naseem et al., 1987; Kandutsch et al., 1975**). Para além disso, a depleção do colesterol das membranas resulta na activação da ERK mediada pela PI3K (**Chen et al., 2001**). É, portanto, possível que o 25-OH exerça os seus efeitos através da depleção do colesterol.

Os factores de transcrição responsáveis pelo aumento da produção da IL-8 nestas condições são ainda desconhecidos.

O NF- κ B, um dos principais factores de transcrição envolvidos da regulação da IL-8 (**Hoffmann et al., 2002**), parece não estar envolvido na produção de IL-8 pelo 25-OH em células do RPE, uma vez que a inibição desta via não tem um efeito significativo na produção de IL-8 pelas células em resposta ao oxisterol (resultados preliminares).

O factor de transcrição AP-1 surge como um candidato possível para a regulação da IL-8 nestas condições. De facto, o AP-1 está envolvido na regulação da produção de IL-8 em diversos tipos celulares (**Hoffmann et al., 2002**). Por exemplo, um estudo recente sugere que o 25-OH aumenta a produção de IL-8 em macrófagos através da activação do AP-1 (**Lemaire-Ewing et al., 2008**).

Finalmente deve referir-se que são ainda necessários estudos adicionais que permitam esclarecer os mecanismos através dos quais o 25-OH regula a produção de IL-8 em células do RPE.

Esta clarificação poderá constituir uma contribuição importante para a identificação e caracterização dos mecanismos moleculares que conduzem à inflamação no RPE, uma componente importante para o desenvolvimento da DMRI.

7 – Bibliografia

Abdelsalam A, Del Priore L, Zarbin MA: Drusen in age-related macular degeneration: pathogenesis, natural course, and laser photocoagulation-induced regression. *Surv Ophthalmol*. 1999 Jul-Aug;44(1):1-29.

Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV: A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol*. 2002 Sep;134(3):411-31.

Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, Rollins BJ, Ambati BK: An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med*. 2003 Nov;9(11):1390-7

Arcaro A, Aubert M, Espinosa del Hierro ME, Khanzada UK, Angelidou S, Tetley TD, Bittermann AG, Frame MC, Seckl MJ: Critical role for lipid raft-associated Src kinases in activation of PI3K-Akt signalling. *Cell Signal*. 2007 May;19(5):1081-92.

Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M: The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. 2000 Sep-Oct;45(2):115-34.

Bian ZM, Elnor SG, Yoshida A, Elnor VM: Differential involvement of phosphoinositide 3-kinase/Akt in human RPE MCP-1 and IL-8 expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Jun;45(6):1887-96.

Bird AC: The Bowman lecture. Towards an understanding of age-related macular disease. *Eye*. 2003 May;17(4):457-66.

Boulton M, Rózanowska M, Rózanowski B: Retinal photodamage. *J Photochem Photobiol B*. 2001 Nov 15;64(2-3):144-61.

Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG: The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol*. 2005 Apr;7(2):122-33.

Brown AJ, Jessup W: Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1999 Jan;142(1):1-28

Cai J, Nelson KC, Wu M, Sternberg P Jr, Jones DP: Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog Retin Eye Res*. 2000 Mar;19(2):205-21.

Chen X, Resh MD: Activation of mitogen-activated protein kinase by membrane-targeted Raf chimeras is independent of raft localization. *J Biol Chem*. 2001 Sep 14;276(37):34617-23.

Chen X, Resh MD: Cholesterol depletion from the plasma membrane triggers ligand-independent activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*. 2002 Dec 20;277(51):49631-7. Epub 2002 Oct 22.

Chung HY, Sung B, Jung KJ, Zou Y, Yu BP: The molecular inflammatory process in aging. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Mar-Apr;8(3-4):572-81

Cobb MH, Goldsmith EJ: How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem*. 1995 Jun 23;270(25):14843-6.

Curcio CA, Millican CL, Bailey T, Kruth HS: Accumulation of cholesterol with age in human Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Jan;42(1):265-74.

Curcio CA, Presley JB, Malek G, Medeiros NE, Avery DV, Kruth HS: Esterified and unesterified cholesterol in drusen and basal deposits of eyes with age-related maculopathy. *Exp Eye Res.* 2005 Dec;81(6):731-41. Epub 2005 Jul 11.

Donoso LA, Kim D, Frost A, Callahan A, Hageman G: The role of inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol.* 2006 Mar-Apr;51(2):137-52.

Dröge W: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47-95.

Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM: ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res.* 1996 Feb;62(2):155-69.

Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA: Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science.* 2005 Apr 15;308(5720):421-4. Epub 2005 Mar 10.

Edward DP, Kaufman LM: Anatomy, development, and physiology of the visual system. *Pediatr Clin North Am.* 2003 Feb;50(1):1-23.

Fernandes AF, Guo W, Zhang X, Gallagher M, Ivan M, Taylor A, Pereira P, Shang F: Proteasome-dependent regulation of signal transduction in retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2006 Dec;83(6):1472-81.

Fernandes AF, Pereira P: Oxidative Stress, Inflammation and Age-Related Macular Degeneration: a Bizarre Love Triangle. *Experientia Ophthalmologica* 2007, 33(1): 1-9

Fernandes AF, Zhou J, Zhang X, Bian Q, Sparrow JR, Taylor A, Pereira P, Shang F: Oxidative inactivation of the proteasome in RPE: A potential link between oxidative stress and upregulation of IL-8. *J Biol Chem.* 2008 May 23

Forrester JV: Macrophages eyed in macular degeneration. *Nat Med.* 2003 Nov;9(11):1350-1.

Fu Q, Goodrum JF, Hayes C, Hostettler JD, Toews AD, Morell P: Control of cholesterol biosynthesis in Schwann cells. *J Neurochem.* 1998 Aug;71(2):549-55.

Fukuoka Y, Medof EM: C5a receptor-mediated production of IL-8 by the human retinal pigment epithelial cell line, ARPE-19. *Curr Eye Res.* 2001 Nov;23(5):320-5.

Fukuoka Y, Strainic M, Medof ME: Differential cytokine expression of human retinal pigment epithelial cells in response to stimulation by C5a. *Clin Exp Immunol.* 2003 Feb;131(2):248-53.

Girão H, Mota MC, Ramalho J, Pereira P: Cholesterol oxides accumulate in human cataracts. *Exp Eye Res.* 1998 May;66(5):645-52.

Girão H, Shang F, Pereira P: 7-ketocholesterol stimulates differentiation of lens epithelial cells. *Mol Vis.* 2003 Oct 6;9:497-501.

Girão H, Pereira P, Ramalho J, Quinlan R, Prescott A: Cholesterol oxides mediated changes in cytoskeletal organisation involves Rho GTPases small star, filled. *Exp Cell Res.* 2003 Dec 10;291(2):502-13.

Girão H, Catarino S, Pereira P: 7-Ketocholesterol modulates intercellular communication through gap-junction in bovine lens epithelial cells. *Cell Commun Signal.* 2004 Jun 1;2(1):2.

Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs K, Cramer K, Neel J, Bergeron J, Barile GR, Smith RT; AMD Genetics Clinical Study Group, Hageman GS, Dean M, Allikmets R:

Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006 Apr;38(4):458-62.

Gorin MB, Breitner JC, De Jong PT, Hageman GS, Klaver CC, Kuehn MH, Seddon JM: The genetics of age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 1999 Nov 3;5:29.

Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, Hageman JL, Stockman HA, Borchardt JD, Gehrs KM, Smith RJ, Silvestri G, Russell SR, Klaver CC, Barbazetto I, Chang S, Yannuzzi LA, Barile GR, Merriam JC, Smith RT, Olsh AK, Bergeron J, Zernant J, Merriam JE, Gold B, Dean M, Allikmets R: A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 May 17;102(20):7227-32.

Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, Spencer KL, Kwan SY, Nouredine M, Gilbert JR, Schnetz-Boutaud N, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA: Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science.* 2005 Apr 15;308(5720):419-21.

Higgins GT, Wang JH, Dockery P, Cleary PE, Redmond HP: Induction of angiogenic cytokine expression in cultured RPE by ingestion of oxidized photoreceptor outer segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Apr;44(4):1775-82.

Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M: Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol.* 2002 Nov;72(5):847-55.

Hooper P, Jutai JW, Strong G, Russell-Minda E: Age-related macular degeneration and low-vision rehabilitation: a systematic review. *Can J Ophthalmol.* 2008 Apr;43(2):180-7.

Ikonen E, Jansen M: Cellular sterol trafficking and metabolism: spotlight on structure. *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Aug;20(4):371-7.

Imamura Y, Noda S, Hashizume K, Shinoda K, Yamaguchi M, Uchiyama S, Shimizu T, Mizushima Y, Shirasawa T, Tsubota K: Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jul 25;103(30):11282-7.

Jager RD, Mieler WF, Miller JW. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2008 Jun 12;358(24):2606-17.

Joffre C, Leclère L, Buteau B, Martine L, Cabaret S, Malvitte L, Acar N, Lizard G, Bron A, Creuzot-Garcher C, Bretillon L. Oxysterols induced inflammation and oxidation in primary porcine retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res.* 2007 Mar;32(3):271-80.

Joseph A, Li Y, Koo HC, Davis JM, Pollack S, Kazzaz JA: Superoxide dismutase attenuates hyperoxia-induced interleukin-8 induction via AP-1. *Free Radic Biol Med.* 2008 Jul 22.

Kalayoglu MV, Bula D, Arroyo J, Gragoudas ES, D'Amico D, Miller JW: Identification of *Chlamydia pneumoniae* within human choroidal neovascular membranes secondary to age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005 Nov;43(11):1080-90.

Kannan R, Zhang N, Sreekumar PG, Spee CK, Rodriguez A, Barron E, Hinton DR: Stimulation of apical and basolateral VEGF-A and VEGF-C secretion by oxidative stress in polarized retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis.* 2006 Dec 22;12:1649-59.

Kandutsch AA, Chen HW: Regulation of sterol synthesis in cultured cells by oxygenated derivatives of cholesterol. *J Cell Physiol.* 1975 Apr;85(2 Pt 2 Suppl 1):415-24.

Kaplan HJ: Anatomy and function of the eye. *Chem Immunol Allergy.* 2007;92:4-10.

Kennedy CJ, Rakoczy PE, Constable IJ: Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye*. 1995;9 (Pt 6):763-71.

Kilsdonk EP, Yancey PG, Stoudt GW, Bangerter FW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH: Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem*. 1995 Jul 21;270(29):17250-6.

Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris FL, Ott J, Barnstable C, Hoh J: Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 2005 Apr 15;308(5720):385-9.

Klein U, Gimpl G, Fahrenholz F: Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry*. 1995 Oct 24;34(42):13784-93.

Knight JA: The biochemistry of aging. *Adv Clin Chem*. 2000;35:1-62.

Lavrovsky Y, Chatterjee B, Clark RA, Roy AK: Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases. *Exp Gerontol*. 2000 Aug;35(5):521-32.

Lehto M, Oikkonen VM: The OSBP-related proteins: a novel protein family involved in vesicle transport, cellular lipid metabolism, and cell signalling. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Feb 20;1631(1):1-11.

Lemaire-Ewing S, Prunet C, Montange T, Vejux A, Berthier A, Bessède G, Corcos L, Gambert P, Néel D, Lizard G: Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biol Toxicol*. 2005 Mar;21(2):97-114.

Lemaire-Ewing S, Berthier A, Royer MC, Logette E, Corcos L, Bouchot A, Monier S, Prunet C, Raveneau M, Rébé C, Desrumaux C, Lizard G, Néel D: 7beta-Hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol-induced interleukin-8 secretion involves a calcium-dependent activation of c-fos via the ERK1/2 signaling pathway in THP-1 cells : Oxysterols-induced IL-8 secretion is calcium-dependent. *Cell Biol Toxicol*. 2008 Mar 4.

Liang FQ, Godley BF: Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*. 2003 Apr;76(4):397-403

Liu Y, Hultén LM, Wiklund O: Macrophages isolated from human atherosclerotic plaques produce IL-8, and oxysterols may have a regulatory function for IL-8 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Feb;17(2):317-23.

Malvitte L, Montange T, Joffre C, Vejux A, Maïza C, Bron A, Creuzot-Garcher C, Lizard G: Analogies between atherosclerosis and age-related maculopathy: expected roles of oxysterols. *J Fr Ophtalmol*. 2006 May;29(5):570-8.

Massey JB: Membrane and protein interactions of oxysterols. *Curr Opin Lipidol*. 2006 Jun;17(3):296-301.

McGeer PL, McGeer EG: Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Dec;1035:104-16.

McGeer EG, Klegeris A, McGeer PL: Inflammation, the complement system and the diseases of aging. *Neurobiol Aging*. 2005 Dec;26 Suppl 1:94-7

Metherall JE, Ridgway ND, Dawson PA, Goldstein JL, Brown MS: A 25-hydroxycholesterol-resistant cell line deficient in acyl-CoA: cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem*. 1991 Jul 5;266(19):12734-40.

Millanvoeye-Van Brussel E, Topal G, Brunet A, Do Pham T, Deckert V, Rendu F, David-Duflho M: Lysophosphatidylcholine and 7-oxocholesterol modulate Ca²⁺ signals and inhibit the phosphorylation of endothelial NO synthase and cytosolic phospholipase A2. *Biochem J*. 2004 Jun 1;380(Pt 2):533-9.

Morin RJ, Peng SK: The role of cholesterol oxidation products in the pathogenesis of atherosclerosis. *Ann Clin Lab Sci*. 1989 Jul-Aug;19(4):225-37.

Moshfeghi DM, Blumenkranz MS: Role of genetic factors and inflammation in age-related macular degeneration. *Retina*. 2007 Mar;27(3):269-75.

Naseem SM, Heald FP: Cytotoxicity of cholesterol oxides and their effects on cholesterol metabolism in cultured human aortic smooth muscle cells. *Biochem Int*. 1987 Jan;14(1):71-84.

Nowak JZ: Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacol Rep*. 2006 May-Jun;58(3):353-63.

Olinski R, Siomek A, Rozalski R, Gackowski D, Foksinski M, Guz J, Dziaman T, Szpila A, Tudek B: Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases. *Acta Biochim Pol*. 2007;54(1):11-26. Epub 2007 Jan 9.

Olson RE: Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *J Nutr*. 1998 Feb;128(2 Suppl):439S-443S.

Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K: Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:617-48.

Parier V, Soubrane G: Age-related macular degeneration. *Rev Med Interne*. 2008 Mar;29(3):215-23.

Patel M, Chan CC: Immunopathological aspects of age-related macular degeneration. *Semin Immunopathol*. 2008 Apr;30(2):97-110.

Patel PJ, Chen FK, Rubin GS, Tufail A: Intersession repeatability of visual acuity scores in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Jun 19.

Peng SK, Morin RJ: Effects on membrane function by cholesterol oxidation derivatives in cultured aortic smooth muscle cells. *Artery*. 1987;14(2):85-99.

Rattner A, Nathans J: Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Nov;7(11):860-72. Epub 2006 Oct 11.

Rydberg EK, Salomonsson L, Hultén LM, Norén K, Bondjers G, Wiklund O, Björnheden T, Ohlsson BG: Hypoxia increases 25-hydroxycholesterol-induced interleukin-8 protein secretion in human macrophages. *Atherosclerosis*. 2003 Oct;170(2):245-52.

Roebuck KA: Regulation of interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res*. 1999 May;19(5):429-38.

Rózanowska M, Jarvis-Evans J, Korytowski W, Boulton ME, Burke JM, Sarna T: Blue light-induced reactivity of retinal age pigment. In vitro generation of oxygen-reactive species. *J Biol Chem*. 1995 Aug 11;270(32):18825-30.

Rózanowska M, Wessels J, Boulton M, Burke JM, Rodgers MA, Truscott TG, Sarna T: Blue light-induced singlet oxygen generation by retinal lipofuscin in non-polar media. *Free Radic Biol Med*. 1998 May;24(7-8):1107-12.

Sarkar D, Fisher PB: Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett*. 2006 May 8;236(1):13-23. Epub 2005 Jun 22.

Sato R, Takano T: Regulation of intracellular cholesterol metabolism. *Cell Struct Funct.* 1995 Dec;20(6):421-7.

Schlingemann RO: Role of growth factors and the wound healing response in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2004 Jan;242(1):91-101.

Schroepfer GJ Jr: Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev.* 2000 Jan;80(1):361-554.

Seger R, Krebs EG: The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995 Jun;9(9):726-35.

Sparrow JR, Fishkin N, Zhou J, Cai B, Jang YP, Krane S, Itagaki Y, Nakanishi K: A2E, a byproduct of the visual cycle. *Vision Res.* 2003 Dec;43(28):2983-90.

Sparrow JR, Boulton M: RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp Eye Res.* 2005 May;80(5):595-606.

Strauss O: The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 2005 Jul;85(3):845-81.

Segato T, Midenza E, Blarmino MC: Age-related macular degeneration. *Aging (Milano).* 1993 Jun;5(3):165-76.

Tosato M, Zamboni V, Ferrini A, Cesari M: The aging process and potential interventions to extend life expectancy. *Clin Interv Aging.* 2007;2(3):401-12.

Wang PY, Weng J, Anderson RG: OSBP is a cholesterol-regulated scaffolding protein in control of ERK 1/2 activation. *Science.* 2005 Mar 4;307(5714):1472-6.

Wielkoszyński T, Gawron K, Strzelczyk J, Bodzek P, Zalewska-Ziob M, Trapp G, Srebniak M, Wiczowski A: Cellular toxicity of oxysterols. *Bioessays.* 2006 Apr;28(4):387-98.

Winkler BS, Boulton ME, Gottsch JD, Sternberg P: Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 1999 Nov 3;5:32.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.

van Leeuwen R, Klaver CC, Vingerling JR, Hofman A, de Jong PT: Epidemiology of age-related maculopathy: a review. *Eur J Epidemiol.* 2003;18(9):845-54.

Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, Listi F, Nuzzo D, Lio D, Caruso C: Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev.* 2007 Jan;128(1):83-91.

Yancey PG, Rodriguez WV, Kilsdonk EP, Stoudt GW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH: Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *J Biol Chem.* 1996 Jul 5;271(27):16026-34.

Yin J, Choufou X, McLachlan C, McGuire M, White G, King N, Hambly B: Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by cholesterol and its oxides in vitro and in vivo. *Atherosclerosis.* 2000 Feb;148(2):365-74.

Yoshida A, Yoshida S, Khalil AK, Ishibashi T, Inomata H: Role of NF-kappaB-mediated interleukin-8 expression in intraocular neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998 Jun;39(7):1097-106.

Zhang X, Zhou J, Fernandes AF, Sparrow JR, Pereira P, Taylor A, Shang F: The proteasome: a target of oxidative damage in cultured human retina pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Aug;49(8):3622-30.

Zarbin MA: Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. Arch Ophthalmol. 2004 Apr;122(4):598-614.

Zipfel PF, Heinen S, Józsi M, Skerka C: Complement and diseases: defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases. Mol Immunol. 2006 Jan;43(1-2):97-106.

Zhou J, Jang YP, Kim SR, Sparrow JR: Complement activation by photooxidation products of A2E, a lipofuscin constituent of the retinal pigment epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Oct 31;103(44):16182-7.

www.freedomscientific.com

www.nei.nih.gov/health/maculardegen/armd_facts.asp