

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

**O papel da via de sinalização Wnt associada aos cílios primários na modulação do
metabolismo da glucose**

Maria Carolina Barreto Cunha

Orientador: Professor Doutor Bruno Carmona (ESTeSL)
Orientador: Professora Doutora Maria Helena Antunes Soares (ESTeSL)

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais
Lisboa, 2024

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

O papel da via de sinalização Wnt associada aos cílios primários na modulação do metabolismo da glucose

Maria Carolina Barreto Cunha

Orientador: Professor Doutor Bruno Carmona (ESTeSL)

Orientador: Professora Doutora Maria Helena Antunes Soares (ESTeSL)

Júri:

Presidente: Doutora Edna Soraia Ribeiro – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa – ESTeSL-IPL

Arguente: Doutora Alexandra Jorge Tavares – Instituto Gulbenkian de Ciência - IGC

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais
Lisboa, 2024

AGRADECIMENTOS

Para a realização da presente dissertação, contei com o apoio direto e indireto de algumas pessoas e instituições das quais sou imensamente grata.

Gostaria de agradecer à Escola Superior de Saúde de Lisboa, onde frequentei o Mestrado de Tecnologias Clínico- Laboratoriais e ao Centro de Química Estrutural - Pólo da Faculdade de Ciência da Universidade de Lisboa, onde desenvolvi este projeto.

Agradeço aos meus orientadores, Professor Bruno Carmona e Professora Helena Soares, pela orientação prestada, pelo incentivo, disponibilidade e apoio que sempre demonstraram.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Rita, Rui e Agnese pela parceria, por estarem sempre dispostos a ajudar e apoiar-me para que este projeto acontecesse.

Aos meus pais e irmãos por todo o amor, apoio e incentivo ao longo de toda a minha vida escolar e académica. Mesmo além-mar sinto-vos sempre perto de mim.

FINANCIAMENTO

O Centro de Química Estrutural é uma Unidade de Investigação financiada pela FCT através dos projetos UIDB/00100/2020 (<https://doi.org/10.54499/UIDB/00100/2020>) e UIDP/00100/2020 (<https://doi.org/10.54499/UIDP/00100/2020>). O Institute of Molecular Sciences é um Laboratório Associado financiado pela FCT através do projeto L/P/0056/2020 (<https://doi.org/10.54499/L/P/0056/2020>).

Este trabalho foi financiado pelo Instituto Politécnico de Lisboa através dos projetos IPL/IDI&CA2024/HyperCil_ESTeSL e IPL/IDI&CA2024/ENIGMA_ESTeSL.

RESUMO

Os cílios primários são organelos especializados, semelhantes a antenas, localizados na superfície das células eucariontes. Com a capacidade de regular inúmeras funções relevantes, como a sinalização e homeostasia celular, o seu mau funcionamento torna-se responsável por vários distúrbios e a caracterizar um grupo de doenças: As Ciliopatias (Mill et al., 2023). Além disso, disfunções nos cílios primários têm sido associadas a distúrbios metabólicos, incluindo resistência insulínica e o desenvolvimento da diabetes. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o papel dos cílios primários na resposta a níveis elevados de glucose em células hTERT-RPE-1. Foi também alvo do estudo a avaliação da via de sinalização Wnt, associada aos cílios primários e sua repercussão nestas condições. Assim sendo, foi-se estudado os níveis celulares de um dos elementos presentes nesta via, a proteína mediadora de transdução da sinalização DVL1. Para alcançar as metas propostas, organizamos o projeto da seguinte forma: As células hTERT-RPE-1 permaneceram por 48 horas em meio 5 mM de glucose. Após este período as mesmas células foram expostas a diferentes concentrações de glucose (5 mM, 25 mM e 5 mM glucose +20mM de manitol). No primeiro grupo de células fez-se a indução da montagem de cílios 24 horas antes do segundo grupo de células, sendo a montagem dessas estruturas neste grupo induzida após a exposição à glucose. Para esta indução foi feita a remoção do soro do meio celular utilizado. Observamos que a presença do cílio primário poderia estar relacionada ao maior nível de stress celular, proporcionalmente a variação dos níveis de DVL1 a nível nuclear, visualizados pela técnica de Imunofluorescência Indireta. Adicionalmente, analisamos através da técnica de PCR a expressão dos genes-alvo Myc, Otx2 e Mitf, responsáveis pela ativação ou supressão de diferentes processos biológicos relacionados a via de sinalização Wnt. Este trabalho evidencia que o cílio primário tem importância como reguladora da homeostase em resposta aos altos níveis de glucose nas células hTERT-RPE-1.

PALAVRAS-CHAVE: Cílio, glucose, DVL1, Myc, Otx2, Mitf

ABSTRACT

Primary cilia are specialized, antenna-like sensory organelles located on the surface of eukaryotic cells. With the ability to regulate numerous relevant functions, such as cell signaling and homeostasis, its malfunction becomes responsible for several disorders and characterizes a group of diseases: Ciliopathies (Mill et al., 2023.). Furthermore, dysfunctions in primary cilia have been associated with metabolic disorders, including insulin resistance and the development of diabetes. The present work aimed to evaluate the role of primary cilia in the response to high glucose levels in hTERT-RPE-1 cells. The aim of the study was also to evaluate the Wnt signaling pathway, associated with primary cilia and its repercussions in these conditions. Therefore, we studied the cellular levels of one of the elements present in this pathway, the DVL1 signaling transduction mediator protein. To achieve the proposed goals, we organized the project as follows: hTERT-RPE-1 cells remained for 48 hours in 5 mM glucose medium. After this period, the same cells were exposed to different concentrations of glucose (5 mM, 25 mM and 5 mM glucose + 20 mM mannitol). In the first group of cells, cilia assembly was induced 24 hours before the second group of cells, and the assembly of these structures in this group was induced after exposure to glucose. For this induction, serum was removed from the cell medium used. We observed that the presence of the primary cilium could be related to the higher level of cellular stress, proportionally to the variation in DVL1 levels at the perinuclear and nuclear level, visualized by the Indirect Immunofluorescence technique. Additionally, we analyzed, using the PCR technique, the expression of the target genes Myc, OTX2 and Mitf-Human, responsible for the activation or suppression of different biological processes related to the Wnt signaling pathway. This work shows that the primary cilium is important as a regulator of homeostasis in response to high glucose levels in hTERT-RPE-1 cells.

KEYWORD: Cilia, glucose, DVL1, Myc, Otx2, Mitf.

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Anticorpos primários e secundários utilizados nos ensaios de microscopia de fluorescência, com indicação do animal onde foi produzido, diluição utilizada e fabricante.....	26
Tabela 2: Reagentes e os volumes na reação de PCR.....	29
Tabela 3: Gene estudado, sequências nucleotídicas dos primers utilizados.	29
Tabela 4: Reação de PCR e as condições utilizadas.	30
Tabela 5: Experiência 5 mM - Grupo 1 (indução da ciliação e após modificação das concentrações de glucose).	32
Tabela 6: Experiência 5 mM - Grupo 2 (modificação das concentrações de glucose e após indução da ciliação)	32
Tabela 7: Experiência 25 mM – Grupo 1 (com e sem FBS)	34
Tabela 8: Experiência 25 mM – Grupo 2 (com e sem FBS)	34
Tabela 9: Experiência 20 mM manitol + 5 mM de glucose – Grupo 1 (com e sem FBS)	35
Tabela 10: Experiência 20 mM de manitol + 5 mM de glucose – Grupo 2 (modificação das concentrações de glucose e após indução da ciliação)	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fontes de heterogeneidade na diabetes.	1
Figura 2: Visão geral do cílio primário e sinalização celular	9
Figura 3: Visão geral da via de sinalização Wnt. Adaptado de Sharma; Pruitt, 2020... 13	
Figura 4: Representação esquemática do olho e retina. A retina localiza-se na parte posterior do olho. As células epiteliais pigmentadas da retina organizam-se em monocamada entre a membrana de Bruch e os fotorreceptores da retina. Adaptado de Yang et. al, 2021.....	16
Figura 5: Esquema ilustrando a sinalização Wnt na retinopatia diabética. Adaptado de Sharma et al., 2022.	17
Figura 6: Figura esquemática do Protocolo Cultura celular (células hTERT- RPE1). ...	21
Figura 7: No grupo de estudo 1 utilizamos 6 poços e o cultivo celular foi feito em meio DMEM-F12 com 5mM de glucose.....	23
Figura 8 :Esquema do protocolo de PCR e a configuração dos meios de acordo com o tempo. Preparação de cultura celular semelhante ao protocolo de imunofluorescência. Foram cultivadas 1×10^5 células por poço.	28
Figura 9: Representação gráfica da quantificação de cílios nas diferentes concentrações de glucose (Grupo 1 e 2) e subgrupos (não ciliadas e ciliadas). A análise estatística está feita usando o 5mM não ciliado da Caixa 1 como controle experimental. Ns – não significativo.....	33
Figura 10: Quantificação de DVL1 no núcleo.....	39
Figura 11: Imagem adquirida por Imunofluorescência. Células do Grupo 1 e não ciliadas. Concentrações 5 mM, 25 mM e 20 mM de manitol + 5 mM de glucose.	40
Figura 12: Imagem adquirida por Imunofluorescência. Células do Grupo 1 ciliadas. Concentrações 5 mM, 25 mM e 20 mM de manitol + 5 mM de glucose.	40
Figura 13: Imagem adquirida por Imunofluorescência. Células do Grupo 2 não ciliadas. Concentrações 5 mM, 25 mM e 20 mM de manitol + 5 mM de glucose.	41
Figura 14: Imagem adquirida por Imunofluorescência. Células do Grupo 2 ciliadas. Concentrações 5 mM, 25 mM e 20 mM de manitol + 5 mM de glucose.	41
Figura 15: Representação gráfica da expressão do gene Myc em uma experiência realizada.....	43
Figura 16: Análise da electroforese em gel de agarose 2% (m/v) dos produtos de RT-PCR para quantificar a expressão do gene Myc.	44
Figura 17: Quantificação da expressão do gene Mitf. Representação gráfica da	

expressão do gene Mitf em células hTERT RPE-1 quando suplementadas com 5 mM, 25 mM e 20 mM de manitol + 5 mM de glucose.....	45
Figura 18: Análise da electroforese em gel de agorse 2% (m/v) dos produtos de RT-PCR para quantificar a expressão do gene Mitf.....	46
Figura 19: Análise da electroforese em gel de agorse 2% (m/v) dos produtos de RT-PCR para quantificar a expressão do gene Otx2.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ARL13B - Proteína 13B semelhante ao fator de ribosilação de ADP

DAPI - 4,6-diamidino-2-fenilindole

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DM1- Diabetes Mellitus 1

DM2- Diabetes Mellitus 2

DNA - Ácido desoxirribonucleico (de desoxirribonucleic acid)

cDNA- DNA complementar

DPBS - Duplecco's PBS

DVL1 – Proteína Disheveled 1

EDTA - Ácido etileno diamino tetra-acético

FBS - Soro bovino fetal (de fetal bovine serum)

FZD- Complexo proteico Frizzled

HH – Via Hedgehog

hTERT - Human telomerase reverse transcriptase

IFT – Transporte intraflagelar (de Intraflagellar Transport)

PCP- Polaridade celular planar

PBS - Tampão de fosfatos salino (de phosphate-buffered saline)

PCR - Reação em cadeia do polimerase (de polymerase chain reaction)

RNA - Ácido ribonucleico (de ribonucleic acid)

RPE-1 - Linha celular epitelial do pigmento da retina (de retinal pigment epithelial)

Wnt – via Wnt

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos epidemiológicos e fisiopatológicos na DM2	1
1.2 Cílio primário, ciliogénese e ciliopatias	4
1.3 O papel dos cílios primários na Diabetes	10
1.4 Sinalização através do cílio: via Wnt	11
1.5 Retinopatia Diabética e o papel dos cílios primários	15
1.6 Sinalização Wnt e retinopatia diabética	17
2. OBJETIVO.....	19
2.1 Objetivos Específicos	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Condições de cultura celular	20
3.2 Protocolo experimental	21
3.2.2 Grupo 1: Avaliação da ciliogénese	21
3.2.1 Grupo 2: impacto do FBS.....	22
3.2.3 Fixação e Análise.....	24
3.2.4 Controlo experimental	25
3.3 Microscopia de Imunofluorescência	25
3.4 Protocolo de Imunofluorescência	25
3.5 Extração de RNA	26
3.6 Protocolo de PCR	29
3.6 Análise de dados	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Impacto de diferentes concentrações de glucose na montagem de cílios primários em células hTERT-RPE-1	31
4.2 Impacto de diferentes concentrações de glucose na expressão da proteína DVL1 em hTERT-RPE-1	36
4.3 Expressão dos genes Myc, Otx2 e Mitf em condições de níveis elevados de glucose e na presença e ausência de cílios primários em células hTERT-RPE-142	

5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	56
REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos e fisiopatológicos na diabetes mellitus tipo 2

A diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico caracterizado por níveis elevados de glicose no sangue, decorrente de deficiências na produção de insulina, na ação dessa hormona, ou em ambas. Esse distúrbio resulta de uma complexa interação entre fatores genéticos e comportamentais (Kluth et al., 2019). A DM possui várias subclassificações, incluindo o tipo 1 (DM1) e o tipo 2 (DM2), que são os principais subtipos (Figura 1). Cada tipo apresenta fisiopatologia, manifestações clínicas e abordagens terapêuticas distintas, mas ambos têm potencial para causar hiperglicemia (Sapra & Bhandari, 2023).



Figura 1 Fontes de heterogeneidade na diabetes.

Legenda: Fontes de heterogeneidade na diabetes. (1) Defeitos genéticos; (2) Diabetes gestacional; (3) Diabetes Tipo 1; (4) Diabetes Tipo 2; (5) Outros fatores. Adaptado de Tobias et al., 2024.

A hiperglicemia crônica, característica da diabetes, está associada a uma série de danos, disfunções e falências de órgãos-alvo, sendo responsável pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares, insuficiência renal, retinopatia diabética, neuropatia diabética e outras condições debilitantes (Harreiter et al., 2019). A DM2 é uma das doenças crônicas mais prevalentes globalmente, representando cerca de 90% dos casos diagnosticados da diabetes e estando associada a complicações significativas para a saúde pública e a elevados custos socioeconômicos. Diferentemente da diabetes tipo 1 (DM1), no qual ocorre uma deficiência de insulina devido à destruição autoimune

das células β pancreáticas, a DM2 resulta de uma combinação de resistência à insulina e comprometimento progressivo da secreção de insulina (Rodrigues Oliveira et al., 2023).

A DM2 afeta cerca de 463 milhões de adultos entre 20 e 79 anos, conforme indicado pela Federação Internacional de Diabetes (IDF, 2021). Os fatores que desempenham um papel central no aumento da incidência da diabetes tipo 2 é amplamente atribuído ao crescimento da obesidade, ao estilo de vida sedentário e ao envelhecimento populacional. Em Portugal, a prevalência da diabetes é uma das mais elevadas da União Europeia, alcançando aproximadamente 9,8% da população na faixa etária referida, enquanto a média nos países da UE é de 6,2% (OECD, 2020).

A prevalência da DM2 tem registado um crescimento contínuo, afetando atualmente cerca de 415 milhões de pessoas em todo o mundo, com projeções indicando que esse número poderá alcançar 642 milhões até 2040. De acordo com Magliano (2021), aproximadamente metade das pessoas adultas com diabetes, entre 20 e 79 anos, desconhece que possui a doença. Esse número corresponde a 44,7% do total de indivíduos nessa faixa etária com diabetes, o que representa aproximadamente 239,7 milhões de pessoas. Em outras palavras, uma grande parte dos indivíduos com diabetes permanece sem diagnóstico, o que implica desconhecimento da própria condição de saúde e, conseqüentemente, ausência de tratamento adequado.

A etiologia da hiperglicémia na DM2 é multifatorial e envolve mecanismos complexos (Rizza, 2010). Indivíduos com DM2 frequentemente apresentam uma redução progressiva na sensibilidade à insulina, acompanhada pela falência das ilhotas pancreáticas em manter a produção adequada desse hormônio, de modo a compensar o declínio na resposta celular. Essas manifestações fisiopatológicas surgem nas fases iniciais da doença e desempenham um papel essencial em sua progressão (Kahn et al., 2014).

Na DM2, a resistência à insulina destaca-se como o principal fator patogénico, caracterizando-se pela redução da resposta das células musculares, hepáticas e adiposas ao hormônio. Esse fenómeno compromete a captação de glucose, resultando em hiperglicémia. Com o avanço da resistência, as células beta pancreáticas tornam-se incapazes de compensar, levando à insuficiência na secreção de insulina e ao agravamento da condição.

A fisiopatologia do DM2 afeta significativamente o músculo esquelético, o fígado e o tecido adiposo. O músculo esquelético, sendo o principal órgão envolvido na eliminação da glucose após as refeições, sofre uma limitação acentuada nessa função

quando ocorre resistência à insulina, a comprometer a depuração de glucose em indivíduos com DM2. Em nível celular, a resistência à insulina no músculo manifesta-se por: 1) comprometimento no recrutamento de transportadores de glucose GLUT4 para a membrana plasmática, mediado pela insulina; 2) capacidade reduzida de armazenamento de glicogênio; 3) menor eficiência na oxidação da glucose; e 4) disfunção mitocondrial (Chen et al., 2021).

No contexto hepático, a resistência à insulina contribui para um aumento na produção de glucose durante o jejum, consequência da falha na supressão da gliconeogênese, mecanismo regulado pela insulina. Essa resistência também se evidencia após a ingestão de alimentos, quando ocorre uma supressão ineficaz da gliconeogênese e da glicogenólise, resultando em produção excessiva de glucose pelo fígado. Por fim, no tecido adiposo, a resistência à insulina é marcada por uma redução na absorção de glucose e de lipídios mediada pela insulina, além da incapacidade de suprimir a lipólise e a inflamação. Esses fatores levam ao aumento dos níveis de ácidos graxos livres e citocinas inflamatórias no plasma (Sobczak, et al., 2019).

No fígado, esta resistência leva ao aumento da gliconeogênese, promovendo uma produção exacerbada de glucose. Outros processos metabólicos também são afetados, como o aumento da lipólise no tecido adiposo, a inflamação sistêmica e a disfunção no metabolismo lipídico, que contribuem para o agravamento da resistência à insulina. Além disso, fatores genéticos e ambientais, como uma dieta inadequada, o sedentarismo e distúrbios do ritmo circadiano, contribuem para a crescente incidência global da DM2.

A obesidade é um fator de risco primário para o desenvolvimento da DM2, dado que influencia diretamente os processos metabólicos e a sensibilidade à insulina. Em indivíduos obesos, o excesso de tecido adiposo promove um estado de inflamação crônica e altera a secreção de adipocinas, proteínas bioativas produzidas pelo tecido adiposo, o que agrava a resistência à insulina e o comprometimento do metabolismo da glucose, aspectos essenciais para a patogênese da DM2 (Volta et al., 2017).

Na última década, o estudo dos organelos celulares e a sua influência no desenvolvimento de diversas patologias tornou-se central para a compreensão aprofundada da etiologia das doenças humanas e para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Neste contexto, os avanços científicos e tecnológicos têm ampliado as perspectivas para o diagnóstico, gestão e tratamento da diabetes. A medicina

de precisão, neste sentido, é considerada o padrão-ouro para o futuro das intervenções médicas mais individualizadas (Anvarian et al., 2019; Tobias et al., 2023).

1.2 Cílio primário, ciliogênese e ciliopatias

As células constituem a unidade estrutural e funcional dos seres vivos, sendo a menor unidade estrutural básica e apresentando uma organização molecular que lhes permite desempenhar funções essenciais, como crescer, reproduzir-se e adaptar-se ao meio ambiente (Bouzon et al., 1999). Os organismos vivos podem ser classificados em procariotas, com estruturas menos complexas, e eucariotas, que apresentam maior complexidade estrutural e expressão genética.

As células eucariotas possuem uma organização interna complexa, composta por duas partes principais: o citoplasma, envolto pela membrana citoplasmática e contendo uma variedade de organelas, como o retículo endoplasmático, complexo de Golgi, ribossomos e centríolos; e o núcleo, que abriga o genoma e é responsável pela codificação de proteínas e enzimas que regulam a estrutura e funcionamento celular e, conseqüentemente, do organismo (Ridley et al., 2011).

O citoplasma celular exerce várias funções essenciais para a sobrevivência e funcionalidade das células. Ele proporciona suporte estrutural por meio de uma rede tridimensional de filamentos proteicos (microtúbulos, filamentos intermediários e microfilamentos de actina), conferindo forma e rigidez à membrana plasmática e à superfície celular. O citoplasma facilita também o movimento celular, por meio da contração das fibras do citoesqueleto do fluxo citoplasmático. Além dessas funções, o citoplasma é responsável pelo transporte de substâncias, reações metabólicas, armazenamento de moléculas sinalizadoras e início da síntese proteica (Alberts et al., 2002).

O citoesqueleto é uma estrutura essencial que garante suporte, organização e estabilidade à célula e suas organelas. Composto por microfilamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários, cada tipo de filamento possui composição e funções específicas, contribuindo para processos como transporte intracelular, motilidade, divisão celular e manutenção da forma celular. Além disso, o citoesqueleto forma uma rede dinâmica e interativa, capaz de se reorganizar em resposta a sinais intra e extracelulares (Alberts et al., 2002; Gould, 2021).

Os microtúbulos, por exemplo, são fundamentais não apenas na manutenção da estrutura celular, mas também na formação de cílios e flagelos. Em condições de estresse mecânico, o citoesqueleto pode se contrair, gerando forças que resistem à pressão externa. Ele também se conecta à matriz extracelular e a células vizinhas por meio de junções de aderência, formando projeções especializadas. Assim, o citoesqueleto atua como um sensor de forças mecânicas, como o estresse de cisalhamento de fluidos e variações na rigidez do ambiente, ajustando a resposta celular às demandas físicas do meio. Assim, o citoesqueleto está estrategicamente posicionado para detectar forças mecânicas, como o stress de cisalhamento de fluidos, tensões nos anexos da matriz extracelular e variações na rigidez do ambiente, que comprimem, esticam e tensionam tanto as células quanto suas conexões extracelulares (Gould et al., 2021).

A formação dos cílios, conhecida como ciliogênese, e o crescimento ciliar ocorrem durante a diferenciação celular. Os cílios se originam e crescem a partir de estruturas especializadas chamadas corpos basais. Dependendo do tipo celular, a montagem do cílio ocorre dentro da célula ou na superfície celular. O cílio primário contém estruturas como fibras de transição e pés basais, derivadas dos apêndices distal e subdistal do centríolo mãe, que forma o corpo basal. Essas fibras de transição auxiliam na ancoragem do corpo basal à membrana plasmática, enquanto os pés basais ancoram os microtúbulos citoplasmáticos (Labat-de-Hoz et al., 2021). Os centríolos filhos também originam-se a partir desse centríolo.

Enquanto a maioria das células ciliadas montam apenas um cílio (cílio primário), algumas células podem montar vários cílios. Os cílios em vertebrados podem ser classificados em dois tipos principais, cada um com estrutura e função distintas: os cílios primários e os cílios móveis. Os cílios primários são geralmente solitários e estão presentes na maioria das células do corpo, desempenhando papéis sensoriais e de sinalização. A principal diferença entre esses dois tipos é a presença de elementos estruturais que permitem ou inibem a motilidade, o que define suas funções. Enquanto os cílios móveis estão envolvidos em processos como a movimentação de fluidos e limpeza das vias aéreas, os cílios primários atuam principalmente na captação de sinais e na modulação de vias de sinalização celular (Cho et al., 2022).

Nos mamíferos, os axonemas ciliares se formam em dois padrões principais: 9+2, no qual nove dupletos de microtúbulos circundam um par central de microtúbulos singletos, e 9+0, no qual o par central está ausente (Satir et al., 2007). Cílios com

estrutura 9+0, como os cílios primários, não possuem proteínas motoras chamadas dineínas axonemais, nem projeções radiais responsáveis pelo movimento ciliar.

Os cílios primários são organelos sensoriais semelhantes a antenas, localizadas na superfície da maioria das células dos vertebrados. Eles podem ser encontrados em células epiteliais, como as do túbulo renal, ducto biliar, pâncreas endócrino e retina, e em células não epiteliais, como condrócitos, fibroblastos e neurônios (Mill et al., 2023). Esses organelos desempenham papéis importantes em vias de sinalização que regulam processos celulares essenciais.

Antes da mitose, os cílios são desmontados, um evento regulado por cinases e outras proteínas, permitindo a duplicação dos centríolos para a formação dos polos do fuso mitótico (Broekhuis et al., 2013). Em resposta a alterações no ambiente ou stress, células quiescentes, mas metabolicamente ativas, podem perder seus cílios, como parte de um processo programado de desenvolvimento (Broekhuis et al., 2013).

A estrutura do cílio é organizada em dois compartimentos principais: o ciliar e o subciliar. O compartimento ciliar inclui o axonema e a membrana ciliar. O axonema é uma estrutura tubular formada por microtúbulos que se estende desde o corpo basal (uma região especializada do centríolo) até o ápice do cílio. Além de conter moléculas de sinalização, o axonema é capaz de modificar sua forma em resposta a estímulos externos. A membrana ciliar, embora seja uma extensão da membrana plasmática, possui características exclusivas, incluindo moléculas de sinalização específicas, como canais iônicos e recetores, organizadas em uma estrutura chamada colar ciliar, localizada na base do cílio (Hoey et al., 2012).

Os microtúbulos do axonema são compostos por polímeros de α - e β -tubulina, que podem sofrer modificações pós-traducionais, como acetilação, metilação e fosforilação. Essas alterações geralmente ocorrem na superfície externa dos microtúbulos, exceto pela acetilação da Lys40 na α -tubulina, que ocorre na superfície interna. A acetilação nesta região estabiliza os microtúbulos e regula vias de sinalização, impactando a atividade ou localização de proteínas na membrana plasmática (Pablos et al., 2022).

Os cílios primários detetam e transmitem sinais extracelulares para regular processos celulares durante o desenvolvimento e a manutenção da homeostase tecidual. Eles possuem recetores específicos e proteínas de canais iônicos em suas membranas, conferindo-lhes uma função sensorial pela capacidade de detetar e transduzir estímulos mecânicos e químicos do meio extracelular para o intracelular. A função sensorial dos

cílios primários depende do tráfego coordenado (transporte intraflagelar) e da localização temporal de recetores específicos e módulos de transdução de sinal associados ao cílio (Anvarian et al., 2019).

O alongamento dos cílios depende da entrega direcionada de proteínas específicas do citoplasma para a região basal, onde ocorre a pré-montagem das estruturas axonemais, e do transporte seletivo dessas proteínas da base até a extremidade do cílio pelo sistema de transporte intraflagelar (IFT). Esse sistema de transporte atua em duas direções: anterógrada, conduzindo proteínas da base para a ponta, e retrógrada, retornando-as da ponta para o citoplasma. Além disso, esse sistema é essencial para a montagem, manutenção e função ciliar. Esse transporte é bidirecional e envolve o movimento de complexos proteicos ao longo do axonema ciliar, permitindo o transporte de moléculas de sinalização, recetores e proteínas estruturais entre a base e a ponta do cílio (Sung et al., 2013).

Dois complexos do IFT, com funções complementares, são responsáveis pelo transporte de proteínas ao longo do cílio. O complexo IFT-A facilita o transporte retrógrado, levando proteínas de volta ao citoplasma a partir da extremidade ciliar, ainda que não seja indispensável para a montagem do cílio. Em contraste, o complexo IFT-B realiza o transporte anterógrado, essencial para a montagem e a manutenção ciliar. Para minimizar interferências entre as vias, o IFT-A utiliza o túbulo A, enquanto o IFT-B trafega pelo túbulo B (Pabloes et al., 2022). De forma paralela, esses complexos interagem com proteínas motoras (cinesina e dineína) para transportar cargas ao longo do cílio, exercendo um papel importante no tráfego de proteínas de membrana, como recetores acoplados à proteína G, para os cílios primários (Morthorst et al., 2018).

Algumas proteínas, como a TULP3, atuam como adaptadores no tráfego de proteínas de membrana, representando um mecanismo regulador intrínseco em mutações nas proteínas envolvidas no IFT, e assim, podem interromper o tráfego de proteínas ciliares sem comprometer a formação do cílio, ressaltando a importância desse transporte para a manutenção ciliar e para a sinalização e homeostase celular (Mukhopadhyay et al., 2017).

A versatilidade dos cílios primários pode explicar como tipos específicos de células são capazes de receber e converter sinais em diferentes fases de desenvolvimento e condições fisiológicas. De fato, várias vias de sinalização associadas aos cílios primários, como as vias Hedgehog (HH), recetores acoplados à proteína G e a

via Wnt, participam do controlo da diferenciação, migração, crescimento celular e homeostase tecidual na idade adulta (Jing et al., 2023; Anvarian et al., 2019).

A perda ciliar em células pode ocorrer por diferentes mecanismos, a depender do tipo celular, das condições de cultivo ou de ambos, sendo classificada em desmontagem e desprendimento. Na via de desmontagem, há uma redução gradual do comprimento dos cílios primários, enquanto o desprendimento envolve a remoção súbita dos cílios a partir do corpo celular. Em organismos inferiores, a perda ciliar pode ser mediada pela internalização completa do axonema, processo pelo qual o cílio é retraído rapidamente para o interior da célula e se desintegra em menos de uma hora (Patel & Tsiokas, 2021).

Ainda não se compreende plenamente como a célula seleciona entre essas vias de perda ciliar, nem se a escolha de uma rota específica influencia as funções celulares subsequentes. Embora a importância clínica desse processo permaneça pouco explorada, há evidências de que a desregulação da desmontagem ciliar está implicada em várias doenças, apontando para a necessidade de investigações adicionais sobre o papel da perda ciliar na fisiopatologia humana.

Devido à complexidade e às múltiplas funções mencionadas, mutações que interferem na biogénese, estrutura ou função ciliar podem prejudicar a sinalização celular e contribuir para distúrbios conhecidos como Ciliopatias. Essas patologias englobam mais de 30 doenças e síndromes humanas, afetando vários tecidos ciliados, como olhos, rins, trato respiratório e cérebro (Ko et al., 2012). Dessa forma, defeitos na estrutura ciliar estão associados a diversas condições, incluindo artrite, osteoporose, doença renal poliquística, insuficiência cardíaca, obesidade e câncer (Hoey et al., 2012).

De acordo com Anvarian et al. (2019), conforme ilustrado na Figura 2, o cílio primário é um organelo imóvel que se estende como uma unidade solitária a partir da superfície de uma célula e está ancorado no corpo basal derivado do centríolo-mãe. O cílio compreende um axonema baseado em microtúbulos (MT), contendo um anel de nove dupletos externos de microtúbulos. Entre o corpo basal e o cílio localiza-se a zona de transição ciliar (TZ), que contém estruturas especializadas, como ligações em "Y". Essas estruturas, juntamente com as fibras de transição do corpo basal, controlam a entrada e saída de proteínas do compartimento ciliar.

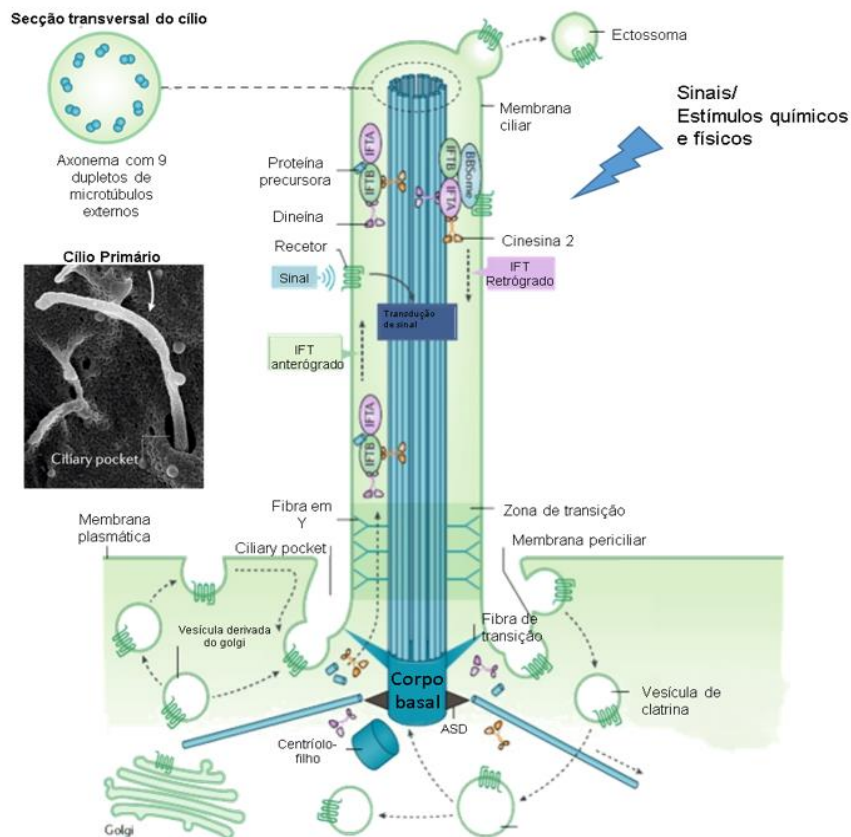


Figura 2: Visão geral do cílio primário e sinalização celular

Legenda: Microtúbulos: MT; Zona de transição ciliar: TZ; Sistema de transporte intraflagelar (ITF). Adaptado de Anvarian et al. 2019.

O sistema de transporte intraflagelar (ITF), baseado em proteínas motoras (cinesina e dineínas) e nos microtúbulos do axonema, permite transportar cargas ciliares, como, por exemplo, recetores específicos, do corpo da célula para a ponta do cílio (transporte anterógrado) e da ponta do cílio para o corpo da célula (transporte retrógrado). Após esse transporte, as cargas podem ser degradadas ou recicladas. Os cílios também podem liberar ectossomas, eliminando material envolvido por membrana da superfície do organelo. A função dessas vesículas extracelulares tem sido associada à manutenção da integridade ciliar, ao equilíbrio de eventos de sinalização intraciliares e/ou à transmissão de sinais através das células (Anvarian et al. 2019).

1.3 O papel dos cílios primários na Diabetes

É sabido que os cílios primários desempenham funções vitais em variados processos celulares, incluindo a manutenção da homeostase energética, a sinalização pela insulina e a diferenciação de adipócitos (Volta et al., 2017). A regulação dos genes ciliares, que afeta as vias de divisão celular nos ilhéus pancreáticos, sugere um possível papel na replicação das células beta, essenciais para a produção adequada de insulina e para a preservação da homeostase da glicose (Kluth et al., 2019).

No pâncreas, os cílios primários são importantes para vários processos de desenvolvimento e manutenção tecidual, como o crescimento celular, a formação de vasos nas ilhotas, a secreção hormonal, a regulação de genes e a comunicação intercelular. Disfunções ciliares afetam o equilíbrio energético corporal, influenciando vias metabólicas e podendo estar relacionadas a doenças como ciliopatias, diabetes tipo II e outros distúrbios metabólicos (Ko et al., 2012; Hoey et al., 2012).

Nas células beta do pâncreas, a atividade dos cílios depende do metabolismo da glicose e da produção de energia, sendo essencial para a entrada de cálcio estimulada pela glicose e a liberação de insulina. Dessa forma, os cílios primários parecem não ser totalmente imóveis, e seu movimento contribui para sua função de sensores no ambiente das ilhotas (Liu et al., 2022; Pablos et al., 2022).

Os cílios primários ganharam destaque na pesquisa sobre diabetes após a descoberta de que a perda seletiva de cílios em células beta de camundongos causa secreção prejudicada de insulina e intolerância à glicose, indicando um papel importante dos cílios nas principais vias funcionais dessas células (Gerdes et al., 2014; Volta et al., 2019).

A disfunção dos cílios primários associa-se a um subtipo de indivíduos com DM2, em geral caracterizado por uma massa normal ou ligeiramente aumentada de células beta pancreáticas, hiperinsulinemia moderada e resistência à insulina no tecido muscular. Além disso, alterações no sistema nervoso central (SNC) contribuem para o aumento do apetite, enquanto a secreção inadequada de insulina nos ilhéus pancreáticos agrava a intolerância à glicose (Dludla et al., 2023).

No estudo de Gerdes et al. (2014), os autores demonstraram que a disfunção dos cílios primários em células β pancreáticas prejudica a secreção de insulina e contribui para o desenvolvimento da DM2 em modelos animais. Utilizando ratinhos deficientes para o gene *Bbs4*, associado à ciliopatia de Bardet-Biedl, foi observado um

comprometimento na resposta glicêmica e na secreção de insulina de primeira fase, mesmo antes do aparecimento da obesidade. A integridade do cílio foi identificada como essencial para o recrutamento do receptor de insulina e para a ativação das vias de sinalização intracelular. Adicionalmente, modelos *in vitro* com depleção dos genes *Bbs4* e *Ofd1* confirmaram a importância da estrutura ciliar na libertação de insulina estimulada por glucose. O estudo também identificou uma redução no número de células β ciliadas em ratos diabéticos, sugerindo que alterações nos cílios primários podem estar envolvidas na susceptibilidade ao desenvolvimento da DM2.

Recentemente, estudos têm demonstrado uma correlação entre disfunções ciliares primárias e distúrbios metabólicos, incluindo a DM2, com essa correlação observada em condições como a Síndrome de Alström e a Síndrome de Bardet-Biedl (Hildebrandt et al., 2011). A compreensão dos efeitos dos genes ciliares nas vias de divisão celular pode, assim, elucidar mecanismos moleculares subjacentes a DM2, particularmente em relação à replicação e função das células beta e à susceptibilidade a diabetes. Esse conhecimento, por sua vez, pode contribuir para a identificação de novos alvos terapêuticos para a doença.

1.4 Sinalização através do cílio: via Wnt

A via de sinalização celular Wnt desempenha um papel crucial no desenvolvimento embrionário, na regulação da proliferação celular, na diferenciação e na manutenção da homeostase tecidual (Satir et al., 2007). Especificamente, a sinalização Wnt é vital para a regulação da apoptose, migração celular e manutenção da estabilidade genética (Yadav & Patel, 2024). O termo "Wnt" deriva da combinação entre "Wingless" (relacionado à ausência de asas em moscas *Drosophila*) e "Int-1" (um oncogene viral), e foram já identificadas 19 proteínas Wnt e 10 recetores Frizzled em mamíferos (Van et al., 2009).

Dada sua importância, especialmente na resposta a estímulos metabólicos, esta via tem sido amplamente estudada em contextos de doenças complexas, como diabetes e obesidade (Gerdes et al., 2014; Das et al., 2021). A sinalização Wnt exerce papel essencial em diversos processos biológicos, como a hematopoiese, a manutenção diária da homeostase tecidual e a regeneração de pele, cabelo e unhas. Ela é vital para a neurogênese em adultos e para a reparação de células danificadas no fígado e pulmão.

Outras funções cruciais da via Wnt incluem a regulação da apoptose, migração celular e manutenção da estabilidade genética (Yadav & Patel, 2024).

A Figura 3 ilustra as principais etapas das vias de sinalização Wnt, destacando-se a via canónica e as vias não canónicas, como é o caso da via de polaridade celular planar (PCP) e da via de cálcio intracelular Wnt/Ca²⁺, ambas fundamentais para a regulação de vários processos celulares do desenvolvimento à arquitetura dos tecidos (Vuong et al., 2023).

Na via canónica, os ligandos Wnt, como Wnt3A e Wnt1, ligam-se aos recetores Frizzled (FZD) e aos co-recetores LRP na membrana celular, desencadeando-se uma cascata de sinalização que culmina na estabilização e translocação nuclear da β -catenina. No núcleo, a β -catenina associa-se a fatores de transcrição, como o LEF e TCF, ativando a expressão de genes alvo do Wnt e promovendo respostas celulares ligadas ao crescimento e renovação de células estaminais (MacDonald; He, 2012).

As vias não canónicas são independentes da β -catenina. A via PCP regula a polarização das células no plano de um epitélio ou dentro do tecido mesenquimal, orientando estruturas celulares assimétricas, divisões celulares e migração celular (Axelrod, 2020). A ligação dos ligandos Wnt ao FZD e aos co-recetores ROR1/2 ativa a proteína Disheveled (DVL), que, ao interagir com as GTPases, RHO e RAC, desencadeia a ativação da cinase JNK. Esse processo resulta em alterações na organização do citoesqueleto, reguladas por fatores transcricionais como JUN e ATF2, essenciais para o controlo da orientação e mobilidade celular (Bengoa-Vergniory et al., 2015; Nie et al., 2021; Sharma; Pruitt, 2020).

A ativação da via Wnt/Ca²⁺ ocorre pela ligação de ligandos Wnt ao recetor Frizzled 3 (FZD3), que, interage com proteínas G e o DVL ativando a fosfolipase C. Esta ativação desencadeia um aumento da concentração intracelular de Ca²⁺. Esta via resulta na ativação de diversas proteínas de sinalização que regulam processos como a adesão e migração celular (Yu et al., 2024). Em mamíferos, a família DVL conta com três isoformas principais: DVL1, DVL2 e DVL3 (Lee et al., 2008).

DVL1, DVL2 e DVL3 desempenham papéis essenciais na via de sinalização Wnt, actuando como mediadores centrais tanto na via canónica (dependente de β -catenina) como na via não canónica. Apesar de partilharem domínios estruturais semelhantes, estas proteínas apresentam expressão diferencial nos tecidos e funções específicas. DVL1, em particular, medeia sinais fundamentais para o desenvolvimento embrionário, homeostase tecidual e controlo da proliferação celular. Estudos recentes demonstram

que a sinalização Wnt está intimamente relacionada com a integridade e funcionalidade dos cílios primários, os quais actuam como plataformas organizadoras para o tráfego e activação de proteínas sinalizadoras, incluindo os componentes da via Wnt. Nos cílios primários, as proteínas DVL são recrutadas para transduzir o sinal após o reconhecimento do ligando Wnt pelos receptores Frizzled e co-receptores como LRP5/6, promovendo a estabilização ou inibição da β -catenina, dependendo do contexto celular e da via activada (Sharma et al., 2021).

Embora o papel de DVL1 no citoplasma, como centro de sinalização Wnt, esteja bem caracterizado, a sua função nuclear tem sido menos explorada. No estudo de Sharma et al. (2021), foi demonstrado que DVL1 também actua como regulador transcricional no núcleo de células tumorais de mama triplo-negativo (TNBC), onde se associa a regiões cromatínicas enriquecidas com a marca epigenética repressora H3K27me3 e com a metiltransferase EZH2. Estes achados sugerem que DVL1 pode modular directamente a expressão génica. Considerando que os cílios primários são cruciais para a coordenação espacial da sinalização Wnt, disfunções na ciliogénese ou no tráfego de DVL podem comprometer tanto a sinalização como a transcrição génica mediada por DVL1, com potenciais implicações em patologias como o cancro e a diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

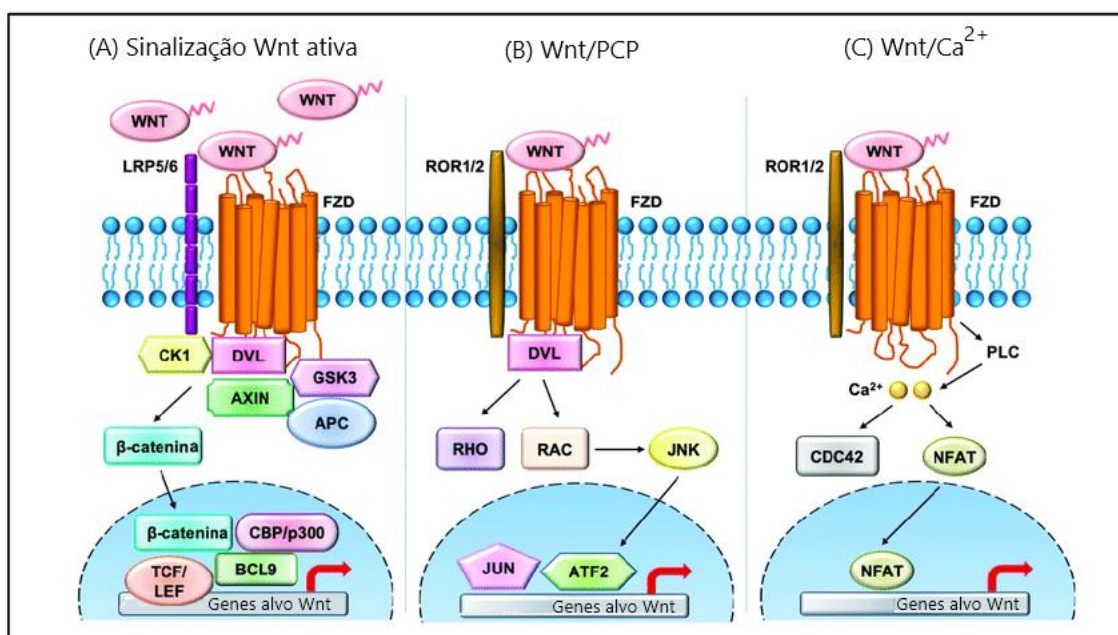


Figura 3: Visão geral da via de sinalização Wnt. Adaptado de Sharma; Pruitt, 2020.

Wnt: Proteínas da família Wnt, que atuam como ligantes nas vias de sinalização. FZD: Frizzled – recetores na superfície celular para os ligantes Wnt. LRP: Proteínas recetoras relacionadas à lipoproteína de baixa densidade, atuando como co-recetores na via Wnt. CK1: Caseína quinase 1 – enzima que fosforila e ativa os recetores na via canônica Wnt. GSK3B: Glicogénio sintase quinase 3 beta – enzima chave na fosforilação e ativação da via canônica Wnt. DVL: Disheveled – proteína sinalizadora que coordena a ativação das vias canônica e PCP. β -catenina: Proteína que se acumula no citoplasma e transloca-se para o núcleo, ativando a transcrição de genes alvo na via canônica. Axina: Proteína estrutural que compõe o complexo de destruição da β -catenina. APC: Antígeno de polipose adenomatosa – regula o complexo de destruição da β -catenina. LEF: Fator intensificador linfóide – fator de transcrição que forma complexo com a β -catenina no núcleo. TCF: Fator de células T – trabalha com β -catenina para ativar a transcrição de genes Wnt. CBP/p300: Coativadores de histonas – proteínas que auxiliam na ativação da expressão gênica. BCL9: Proteína associada à β -catenina, que auxilia na ativação de genes alvo. PCP: Plano de polaridade celular – caminho alternativo de sinalização Wnt, independente da β -catenina. ROR1/2: Recetores de tirosina quinase – co-recetores na via Wnt/PCP. GTPases: Enzimas que transmitem sinais para reorganização do citoesqueleto. RHO e RAC: Pequenas GTPases que promovem a reorganização do citoesqueleto. JNK: Cinase N-terminal de c-Jun – cinase ativada na via PCP que regula genes de resposta ao stress. JUN: Fator de transcrição ativado na via PCP, essencial para respostas transcricionais. ATF2: Fator de transcrição ativador – participa na regulação transcricional em resposta à sinalização PCP.

Embora o papel dos cílios na transdução do sinal Wnt ainda gere controvérsia, existem estudos que evidenciam o envolvimento dos cílios na regulação desta via (Whewey et al., 2018). Por exemplo, observou-se que a proteína ciliar INVS inibe a via canônica do Wnt (Simons et al., 2005) e a proteína ciliar NPHP3 está também envolvida nesta via (Bergmann et al., 2008). Diversos estudos, envolvendo mutações em diferentes genes que codificam proteínas ciliares, muitas associadas a ciliopatias, mostram que os cílios primários parecem estar envolvidos na atenuação da via Wnt canônica (Lee, 2020). Relativamente à via não canônica PCP a ciliogênese parece ser fundamental para esta via de sinalização, (Logan et al., 2004).

Disfunções nas vias de sinalização Wnt, resultantes de hipo ou hiperativação por alterações genéticas ou epigenéticas, estão implicadas em uma ampla gama de condições patológicas, incluindo cancro, diabetes mellitus, Alzheimer, Parkinson, osteoartrite e enfarte do miocárdio, além de distúrbios de desenvolvimento como defeitos congénitos e anomalias no desenvolvimento de órgãos e tecidos (Anvarian et al., 2019). Dada a relevância funcional desta via e a sua associação com a patogénese de diversas doenças, a via de sinalização Wnt tem emergido como um foco significativo de pesquisa na última década (Ng et al., 2019).

1.5 Retinopatia Diabética e o papel dos cílios primários

O epitélio pigmentado da retina (RPE) está localizado na retina, que é a camada sensorial do olho responsável por captar a luz e transformá-la em sinais nervosos que são enviados ao cérebro para formar imagens. O epitélio pigmentado da retina (RPE) possui uma arquitetura polarizada, constituído por uma monocamada de células que está localizada na parte mais externa da retina, adjacente à camada de fotorreceptores, e à uma superfície basal de matriz extracelular especializada, conhecida como membrana de Bruch e a coroide, a Figura 4 ilustra a o olho e retina.

De entre as múltiplas funções que desempenha essenciais para a manutenção da homeostase e função visual da retina, o RPE tem um papel importante na internalização dos segmentos externos dos fotorreceptores (POS) sobrejacentes como parte do ciclo visual diário. Durante o ciclo visual, os POS dos fotorreceptores são fagocitados pelo RPE para remoção dos segmentos desgastados e reciclar componentes celulares necessários para a função dos fotorreceptores. Essa fagocitose é essencial para a renovação e manutenção dos fotorreceptores, a garantir a eficiência do sistema visual.

Também é responsável pelo transporte de nutrientes, iões e água entre a coroide e os fotorreceptores, o metabolismo bem como a secreção de hormonas de crescimento endotelial (manutenção da vasculatura retiniana) e está envolvido na formação de uma barreira seletiva hemato-retiniana externa (Lakkaraju et al. 2020). Esta variedade de funções fica comprometida aquando da degeneração e/ou disfunção de células RPE. Assim, contribui para o surgimento de retinopatias, como a retinopatia diabética (RD).

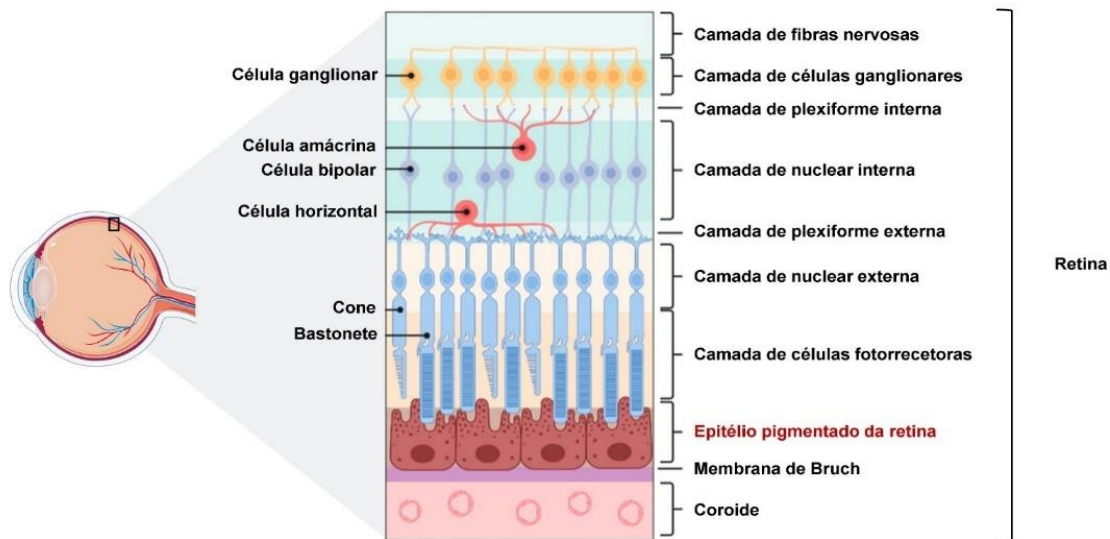


Figura 4: Representação esquemática do olho e retina. A retina localiza-se na parte posterior do olho. As células epiteliais pigmentadas da retina organizam-se em monocamada entre a membrana de Bruch e os fotorreceptores da retina. Adaptado de Yang et. al, 2021.

A disfunção do transporte de nutrientes nesse epitélio gera agregados extracelulares insolúveis, resultando na sua degeneração o que posteriormente, atinge os fotorreceptores. Desta forma, propicia o surgimento de deficiência visual e patologias da retina (Sun et al., 2021).

A degeneração e/ou disfunção de células RPE levam ao comprometimento da barreira hemato-retiniana o que afeta a difusão celular, o transporte ativo e o metabolismo. Assim, contribui para o surgimento de retinopatias, como a retinopatia diabética (RD). A disfunção do transporte de nutrientes nesse epitélio gera agregados extracelulares insolúveis, resultando na sua degeneração e posteriormente, atinge os fotorreceptores. Desta forma, propicia o surgimento de deficiência visual e patologias da retina (Sun et al., 2021).

É concebível dizer que essas alterações do RPE estão influenciadas pela presença de cílios primários em sua superfície. A utilização desta linha celular hTERT RPE-1 tem como vantagens a capacidade de proliferação contínua e diminuição dos efeitos de senescência celular, já que são imortalizadas. Além de conferir características morfológicas e funcionais das células RPE primárias, com facilidade de visualização do seu citoesqueleto. Todas estas funcionalidades levaram às células hTERT RPE-1 para o estudo do papel dos cílios em resposta ao metabolismo da glicose.

1.6 Sinalização Wnt e retinopatia diabética

Há evidências crescentes de que a via de sinalização Wnt desempenha um papel significativo no surgimento da aterosclerose e no envelhecimento vascular (Sanabria-de la Torre et al., 2022; Sharma et al., 2022). Nesse contexto, as alterações vasculares em nível ocular, como a retinopatia diabética, representam a principal causa de cegueira prematura em pacientes com diabetes tipo 2. A Figura 5 ilustra a sinalização Wnt na retinopatia diabética.

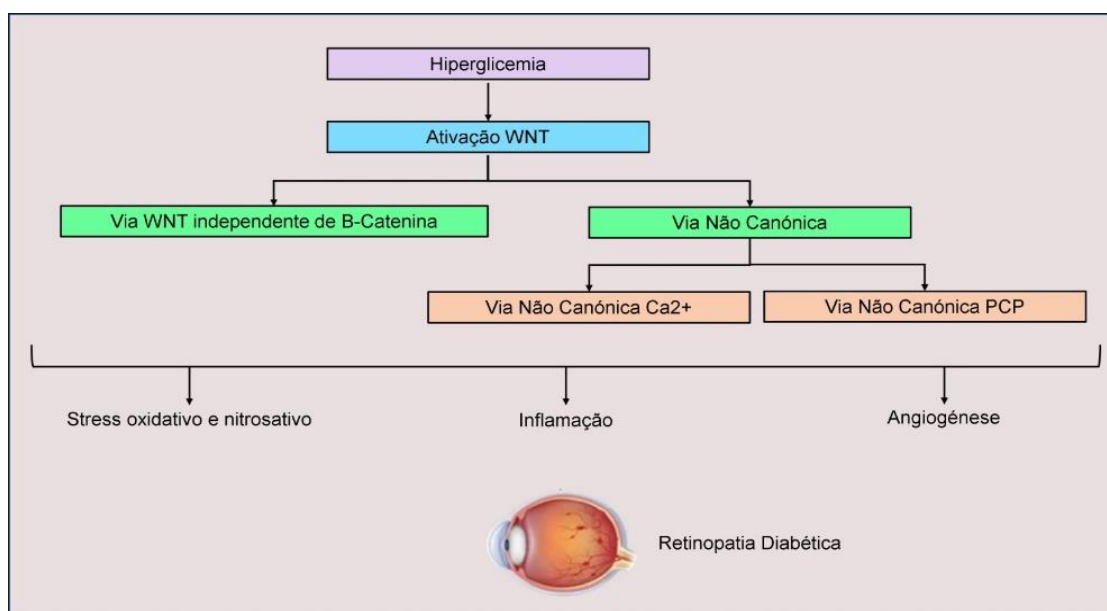


Figura 5: Esquema ilustrando a sinalização Wnt na retinopatia diabética. Adaptado de Sharma et al., 2022.

O desequilíbrio na via Wnt, especialmente na via Wnt canônica, resulta em stress oxidativo e na superexpressão de fatores angiogênicos e inflamatórios. Os receptores Frizzled 4 e 7, juntamente com as proteínas LRP5 e LRP6, associadas ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL), apresentam-se aumentados em casos de neovascularização patológica em modelos experimentais de retinopatia em camundongos. Além disso, foi observado um aumento nos níveis de β -catenina na retina de pacientes com retinopatia diabética em comparação a doadores não diabéticos (Chen, et al., 2011; Chen; Ma et al., 2017).

Embora a pesquisa sobre o papel específico dos cílios primários na retinopatia diabética ainda esteja em estágio inicial, estudos sugerem alterações estruturais e

funcionais nas células epiteliais da retina (RPE), resultando em comprometimento da barreira hemato-retiniana, o que, por sua vez, afeta o transporte ativo e o metabolismo local (Sun et al., 2021). A função dos cílios primários, reconhecidos como plataformas sensoriais para a transdução de sinais, vem sendo cada vez mais associada à regulação da via Wnt e à modulação de respostas celulares ao stress metabólico (Komiya & Habas, 2008; Mehta et al., 2021; Gerdes et al., 2014; Volta et al., 2019).

Com base nessas evidências, o presente estudo busca investigar a influência dos cílios primários na sinalização Wnt em condições de hiperglicemia e stress metabólico, visando proporcionar uma compreensão mais detalhada da fisiopatologia da diabetes e da obesidade, bem como identificar possíveis alvos terapêuticos.

A escolha da proteína DVL1 como foco da investigação justifica-se pela sua atuação central na transdução dos sinais da via de sinalização Wnt, tanto nos seus ramos canônico como não canônico, sendo uma molécula adaptadora essencial para a propagação de estímulos extracelulares que regulam a proliferação, diferenciação e manutenção da homeostase celular. A DVL1 desempenha um papel particularmente relevante na organização do tráfego intracelular dos componentes da via Wnt no interior dos cílios primários, estruturas que funcionam como plataformas sensoriais para a coordenação espacial dessas sinalizações. Estudos recentes demonstraram que, para além da sua função citoplasmática clássica, a DVL1 actua também como regulador transcricional no núcleo, interagindo com marcas epigenéticas associadas à repressão génica, o que sugere a sua participação em respostas celulares complexas, incluindo aquelas activadas em condições de stress metabólico, como a hiperglicemia. A sua expressão diferencial nos tecidos e a sua localização nos cílios primários destacam-na como uma proteína-chave na interface entre a disfunção ciliar e a desregulação metabólica observada na diabetes mellitus tipo 2 e na retinopatia diabética.

2. OBJETIVO

Investigar o papel dos cílios primários na regulação metabólica e na manutenção da homeostase energética, com foco na influência dessas estruturas na fisiopatologia da diabetes e da obesidade, especialmente em condições de stress metabólico.

2.1 Objetivos Específicos

- Analisar o impacto do stress metabólico na formação de cílios primários em células epiteliais da retina (h-TERT-RPE1), a considerar diferentes concentrações de glucose com e sem suplementação de soro fetal bovino (FBS).
- Avaliar a influência dos cílios primários na modulação da via de sinalização Wnt, em resposta a altas concentrações de glucose.
- Investigar a expressão do gene DVL1 e de outros genes-alvo da cascata de sinalização Wnt em células da linha epitelial da retina (h-TERT-RPE1) para compreender a relação entre a presença e o perfil dos cílios e a regulação da via Wnt em condições de hiperglicémia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Condições de cultura celular

Para a realização de protocolos dos ensaios experimentais, utilizámos a linhagem de células epiteliais pigmentadas da retina humana, imortalizada com Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT-RPE-1) (ATCC, EUA). As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM enriquecido com F12 e GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, EUA), que contém aminoácidos, vitaminas, glucose, zinco, ferro e diversos outros componentes que permitem o crescimento de hTERT-RPE-1, suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS) e com 3,5% (v/v) bicarbonato de sódio. Foi realizada a passagem de células a cada 3 dias, de modo a que as células estivessem confluentes e em divisão.

Durante a passagem, o meio de cultura foi inicialmente removido, e as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de DPBS (1x) (Thermo Fisher Scientific, EUA) (137,9 mM, NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ e 1,5 mM KH₂PO₄ pH 7-7,3) para lavar o meio e iões (Mg²⁺ e Ca²⁺) que interferem com a actividade enzimática da tripsina-EDTA 0,05% (v/v). De seguida, adicionaram-se 1000 µL de tripsina-EDTA, distribuídos uniformemente pela placa de cultivo (100 mm de diâmetro), e o excesso foi removido. A placa foi incubada na estufa Snijders CO190TC-20 (Snijders, Países Baixos) a 37 °C, com 5% de CO₂ e aproximadamente 80% de humidade relativa, durante cerca de três minutos, permitindo que as células se desancorassem.

Posteriormente, as células foram ressuspensas em meio de cultura fresco e semeadas numa nova placa na proporção de 1:8. A incubação prosseguiu nas condições descritas até à próxima subcultura. Todo o procedimento foi realizado sob condições de esterilidade, utilizando uma câmara de fluxo laminar vertical Danlaf VFRS 1206. Para os ensaios experimentais que exigiam um número específico de células, estas foram contadas num hemocítómetro e plaqueadas na quantidade exata. As células foram observadas no microscópio de contraste de fase invertido Olympus CK40 (Olympus, Japão) e fotografadas com câmara compacta CAMEDIA C-4040ZOOM (Olympus, Japão) e com a câmara do telemóvel Iphone 12 Pro.

3.2 Protocolo experimental

Para avaliar o impacto dos níveis de glucose e da presença de cílios primários nas células cultivadas, foram realizadas diferentes condições experimentais com a linhagem celular hTERT-RPE-1. As células foram inicialmente plaqueadas a uma densidade de 2×10^4 células por poço em placas de 24 poços, utilizando 500 μ L de meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) e 5mM de glucose. Após incubação inicial de 24 horas a 37 °C com 5% de CO₂, o meio foi substituído por meio fresco com as mesmas condições (DMEM-F12 + 5mM de glucose). As células permaneceram nesse meio por mais 48 horas, com substituição do meio a cada 24 horas em meio 5mM de glucose. Posteriormente, os poços foram divididos em dois grupos experimentais com condições específicas denominados Grupo 1 e Grupo 2 (Figura 6).

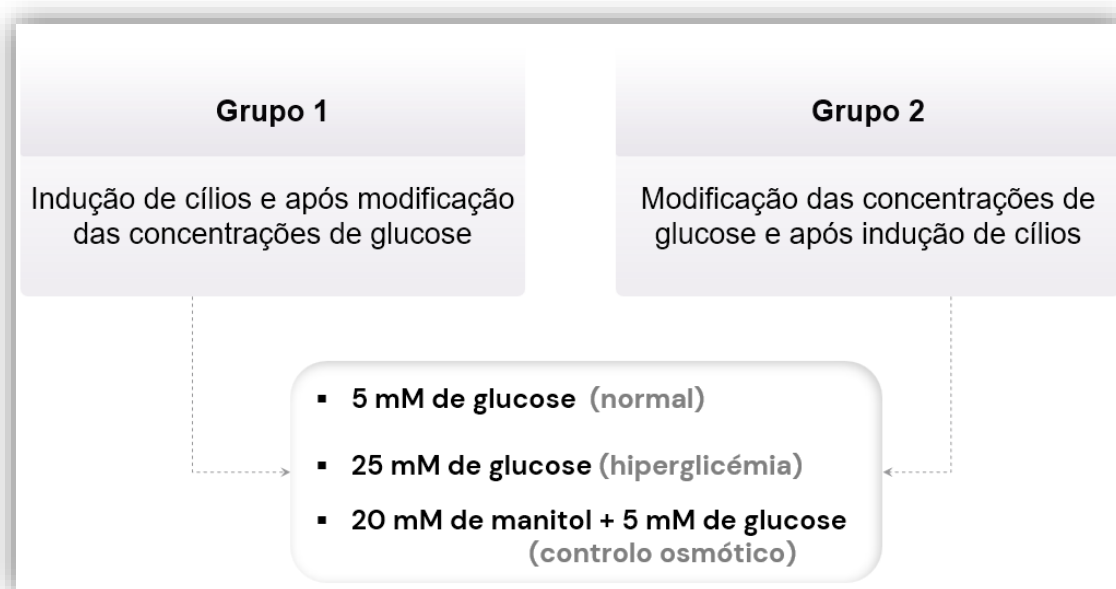


Figura 6: Figura esquemática do Protocolo Cultura celular (células hTERT- RPE1).

3.2.2 Grupo 1: Avaliação da ciliogénese

No primeiro grupo, o objetivo foi avaliar o impacto da ausência de FBS no estímulo à ciliogénese e o efeito de diferentes concentrações de glucose. O objetivo de cultivar as células sem FBS foi estimular a formação de cílios primários. Após 48 horas iniciais de cultivo, os poços foram divididos em dois subgrupos: metade recebeu 10%

de FBS e a outra metade não (ausência de FBS). Após 24 horas nestas condições (72 horas de experimento no total), os meios de cultura foram novamente substituídos, criando seis condições distintas em cada subgrupo.

- **DMEM-F12 com 5mM de glucose**, mantidas com 10% de FBS.
- **DMEM-F12 com 25mM de glucose**, mantidas com 10% de FBS.
- **DMEM-F12 com 20mM de manitol + 5mM de glucose**, mantidas com 10% de FBS.
- **DMEM-F12 com 5mM de glucose**, na ausência de FBS.
- **DMEM-F12 com 25mM de glucose**, na ausência de FBS.
- **DMEM-F12 com 20mM de manitol + 5mM de glucose**, na ausência de FBS.

As células permaneceram nestas condições durante mais 24 horas (totalizando 96 horas). Ao final deste período, as células foram fixadas e processadas para análise em microscopia de fluorescência.

A condição DMEM-F12 com 25mM de glucose (concentrada) está associada a condições patológicas como diabetes e obesidade (Maugeri et al., 2017). O grupo DMEM-F12 com 20mM de manitol + 5mM de glucose foi usado como controlo para avaliar o impacto do stress osmótico causado por concentrações elevadas de glucose, uma vez que o manitol não é metabolizado pelas células (Bowman et al., 1977).

3.2.1 Grupo 2: impacto do FBS

No grupo 2, os seis poços foram mantidos em meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10% de FBS e 5 mM de glucose durante as primeiras 48 horas, com troca do meio a cada 24 horas. Após 48h, a placa foi separada em três subgrupos de acordo com a variação de concentração de glucose: 5 mM, 25 mM e 20 mM de manitol + 5 mM de glucose, todos com FBS. Em 72 horas, metade dos poços receberam FBS enquanto a outra metade permaneceu na ausência de FBS10%. Então, os poços foram divididos conforme a Figura 7.

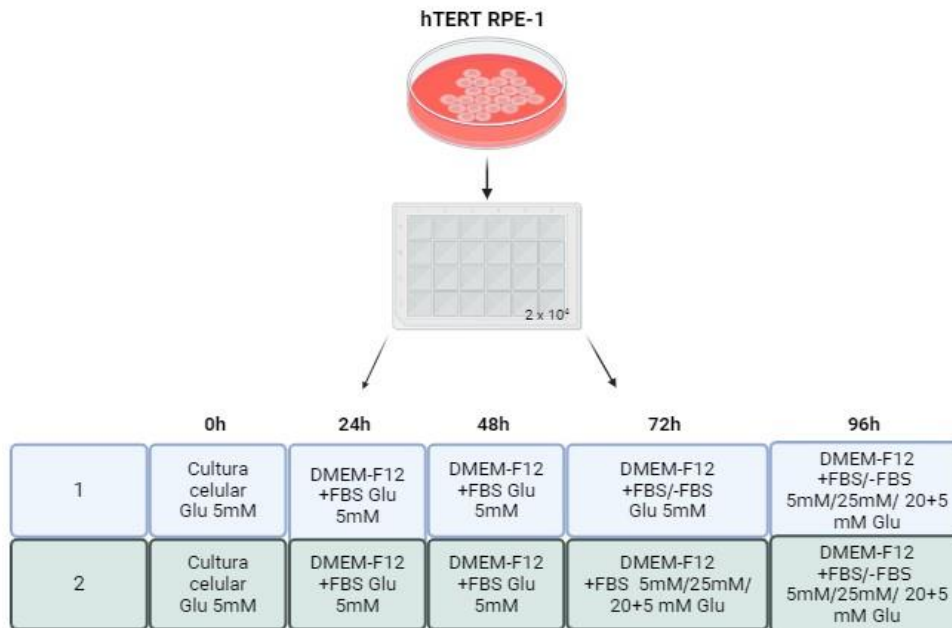


Figura 7: No grupo de estudo 1 utilizamos 6 poços e o cultivo celular foi feito em meio DMEM-F12 com 5mM de glucose.

Troca do meio às 24h e 48h. Após 48 horas, foi-se trocado o meio, 3 poços com DMEM-F12 com FBS 10% + 5mM glucose e os demais com DMEM-F12 sem FBS. Com 72 horas, trocamos o meio e colocamos com diferentes concentrações de glucose (5mM, 25mM e 20mM manitol + 5mM de glucose. Fixação das células após 96 horas.

No grupo 2, todos os seis poços foram inicialmente mantidos em meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10% de FBS e 5 mM de glucose por 48 horas, com troca do meio a cada 24 horas. Após esse período, os poços foram divididos em três condições de tratamento: 5 mM de glucose, 25 mM de glucose e 20 mM de manitol + 5 mM de glucose, sendo que para cada condição, um poço permaneceu com 10% de FBS e o outro recebeu meio sem adição de soro. Às 72 horas, foi realizada a indução da ciliogênese por meio da remoção do FBS nos poços previamente cultivados com soro. A fixação celular foi realizada após 96 horas do início do experimento. Cada poço foi previamente semeado com 2×10^4 células.

No primeiro grupo, as células foram inicialmente cultivadas em meio DMEM-F12 contendo 5 mM de glucose e suplementado com soro fetal bovino (FBS), com o objectivo de induzir a formação dos cílios primários. Após esta etapa, as concentrações de glucose foram modificadas, sendo as células expostas a três condições distintas: DMEM-F12 com 5 mM de glucose com FBS (condição normoglicémica), DMEM-F12 com 25 mM de glucose com FBS (condição hiperglicémica) e DMEM-F12 contendo 20 mM de manitol e 5 mM de glucose com FBS (controlo osmótico).

No segundo grupo, as células foram inicialmente submetidas à variação das concentrações de glucose, utilizando os mesmos três meios descritos anteriormente: DMEM-F12 com 5 mM de glucose com FBS, DMEM-F12 com 25 mM de glucose com FBS e DMEM-F12 com 20 mM de manitol mais 5 mM de glucose com FBS. Após o

período de exposição às diferentes condições glicêmicas, procedeu-se à indução dos cílios primários, através da remoção do FBS. Para tal, as células foram mantidas em meio DMEM-F12 isento de FBS, contendo, respectivamente, 5 mM de glucose (normoglicémia), 25 mM de glucose (hiperglicémia) ou 20 mM de manitol + 5 mM de glucose (controlo osmótico).

As células permaneceram nestas condições durante mais 24 horas (totalizando 96 horas). Ao final deste período, as células foram fixadas e processadas para análise em microscopia de fluorescência.

3.2.3 Fixação e Análise

Após o período experimental de 96 horas, as células foram fixadas com 500µl de metanol a -200C, durante 10 minutos. No final da fixação as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x com agitação à temperatura ambiente durante 5 minutos. As amostras foram posteriormente lavadas três vezes com PBS para remoção de resíduos. As células fixadas foram processadas para análise em microscopia de fluorescência, com o objetivo de avaliar a presença de cílios primários e as respostas celulares às diferentes condições de glucose e FBS.

Em seguida fixaram-se as células com. Para bloquear ligações não específicas, as amostras foram incubadas com 300µl de BSA 3% em PBS 1x durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as células foram incubadas com 30 µL de anticorpo primário diluído em BSA 3% (ver tabela de diluições usadas para cada anticorpo), durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esta incubação foram feitas três lavagens com 500µl de PBS(1X), 5 minutos com agitação, e de seguida, adicionados 30 µL de anticorpos secundários diluídos na solução de bloqueio (ver tabela para diluições utilizadas) e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, no escuro. As células foram novamente lavadas três vezes com 500µl PBS(1X), durante 5 minutos com agitação à temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente, o DNA foi marcado com DAPI (1 µg/mL), tendo a incubação ocorrido à temperatura ambiente durante um minuto, sem exposição à luz. As células foram lavadas três vezes com 500µl PBS(1x).

A montagem das lamelas foi feita em lâminas de vidro com 4 µL de meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories, EUA). As lâminas foram observadas no microscópio Olympus BX41 (Olympus, Japão), com uma objetiva de imersão de óleo de

60X.

Para a captura de imagem, foi utilizada a câmara DMK 23U274 (The Imaging Source, Alemanha) e o software IC Capture 2.4 (The Imaging Source, Alemanha). As imagens foram processadas com o software ImageJ 1.53t (NIH, EUA).

3.2.4 Controlo experimental

Foram incluídas condições de controlo para distinguir os efeitos metabólicos da glucose do impacto osmótico. O uso de 20mM de manitol + 5mM de glucose constitui um controlo do stress osmótico, uma vez que as membranas celulares são pouco permeáveis ao manitol.

3.3 Microscopia de Imunofluorescência

A imunofluorescência é uma técnica que permite obter informações sobre a localização de moléculas específicas na estrutura celular. Para tal, as células são incubadas com anticorpos primários específicos para a molécula-alvo em estudo. A ligação estabelecida entre o anticorpo primário e o antigénio é subsequentemente detetada através da incubação da amostra com um anticorpo secundário específico para a imunoglobulina, conjugado com um fluoróforo. Este conjugado gera um sinal visível, que pode ser observado por microscopia de fluorescência (Suvarna et al., 2013; Donaldson et al., 2015).

3.4 Protocolo de Imunofluorescência

Os meios de cultura foram removidos de cada poço, e as células foram lavadas duas vezes com 500 µL de PBS 1x. Em seguida, as células foram fixadas com 500 µL de metanol a -20°C durante 10 minutos. Após a fixação, foram lavadas novamente duas vezes com PBS 1x, com agitação à temperatura ambiente por 5 minutos. Para bloquear ligações não específicas, as amostras foram incubadas com 300 µL de BSA a 3% em PBS 1x durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as células foram incubadas com 30 µL de anticorpo primário diluído em BSA a 3%, de acordo com as diluições indicadas na tabela, durante 1 hora à temperatura ambiente.

Após a incubação com o anticorpo primário, as células foram lavadas três vezes

com 500 µL de PBS 1x, com agitação durante 5 minutos por lavagem. Posteriormente, foram adicionados 30 µL de anticorpo secundário diluído na solução de bloqueio, conforme as diluições especificadas, e as células foram incubadas por mais 1 hora à temperatura ambiente, no escuro. Após essa incubação, as células foram novamente lavadas três vezes com 500 µL de PBS 1X, com agitação durante 5 minutos por lavagem, no escuro. O DNA celular foi marcado com DAPI (1 µg/mL), com uma incubação à temperatura ambiente por 1 minuto, sem exposição à luz. Após a marcação com DAPI, as células foram lavadas três vezes com 500 µL de PBS 1X.

As lamelas foram montadas em lâminas de vidro utilizando 4 µL de meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories, EUA). As lâminas foram então observadas no microscópio Olympus BX41 (Olympus, Japão), equipado com uma objetiva de imersão em óleo de 60x. As imagens foram capturadas utilizando a câmera DMK 23U274 (The Imaging Source, Alemanha) e o software IC Capture 2.4 (The Imaging Source, Alemanha), e o processamento foi realizado com o software ImageJ 1.53t (NIH, EUA).

Tabela 1: Anticorpos primários e secundários utilizados nos ensaios de microscopia de fluorescência, com indicação do animal onde foi produzido, diluição utilizada e fabricante.

Anticorpo	Produzido em	Diluição	Fabricante
Anticorpos primários			
Anti-DVL1	Ratinho	1/75	Sigma-Aldrich
Anti-acetil- α -tubulina	Ratinho	1/100	Sigma-Aldrich
Anti-pericentrina	Coelho	1/200	Abcam
Anti-ARL13B	Coelho	1/500	Abcam
Anticorpos secundários			
Anti-Ratinho Alexa 488	Cabra	1/500	ThermoFisher Scientific
Anti-Coelho Alexa 594	Cabra	1/500	ThermoFisher Scientific

3.5 Extração de RNA

Numerosas metodologias para extrair RNA total das células eucariotas com eficiência e qualidade estão disponíveis. As células são lisadas com o auxílio de tampões de lise que contém agentes caotrópicos, detergentes e substâncias que quebram ligações persulfureto para desnaturar as RNAses. Os organelos e fragmentos de células

lisadas ou danificadas são removidos por centrifugação e a purificação normalmente é feita com a utilização de solventes orgânicos como fenol e clorofórmio (Farrel, 2010).

Uma alternativa à extração fenol-clorofórmio é a técnica através de colunas cromatográficas baseadas em sílica, que possuem afinidade para os ácidos nucleicos, entre eles o RNA. Estes são disponibilizados em kits comerciais.

Para isolar o RNA total das células hTERT-RPE-1, utilizámos 2 placas de 6 poços, tendo cada poço 1×10^5 células, em 2 mL de meio de cultura DMEM-F12 + FBS 10% a 5 mM de glucose. Todos os poços permaneceram neste meio, sendo substituído a cada 24 horas. Após 48 horas de cultura, realizamos experiências como descrito anteriormente (ver Figura 8). Assim sendo, as células estavam prontas para iniciarmos o protocolo de extração de RNA e Reação de Cadeia de Polimerase (PCR).

Com o objetivo de extrair RNA total a partir das células hTERT-RPE-1, removemos o meio de cultura e as células foram lavadas com 1ml de PBS 1x, para retirar o meio residual.

As células foram raspadas mecanicamente da placa de Petri com um raspador e transferidas para microtubos e as células foram recolhidas por centrifugação 500 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado. O pellet de células foi ressuscitado em 350 μ L de solução tampão de lise com β -mercaptoetanol fornecido com o kit e procedeu-se à homogeneização da mistura utilizando uma seringa com uma agulha (19 a 21 gauge). Em seguida, adicionou-se 350 μ L de etanol (70 %) e misturando a amostra com o auxílio de uma pipeta e posteriormente vortexeando-a por 30 segundos para a homogeneizar. Subsequentemente até 700 μ L de lisado celular foram aplicados na coluna HiBind RNA Mini Columna para purificação. A coluna é em seguida centrifugada 10 000 x g 1 minuto à temperatura ambiente e o eluído descartado tendo o RNA ficado ligado à matriz da coluna.

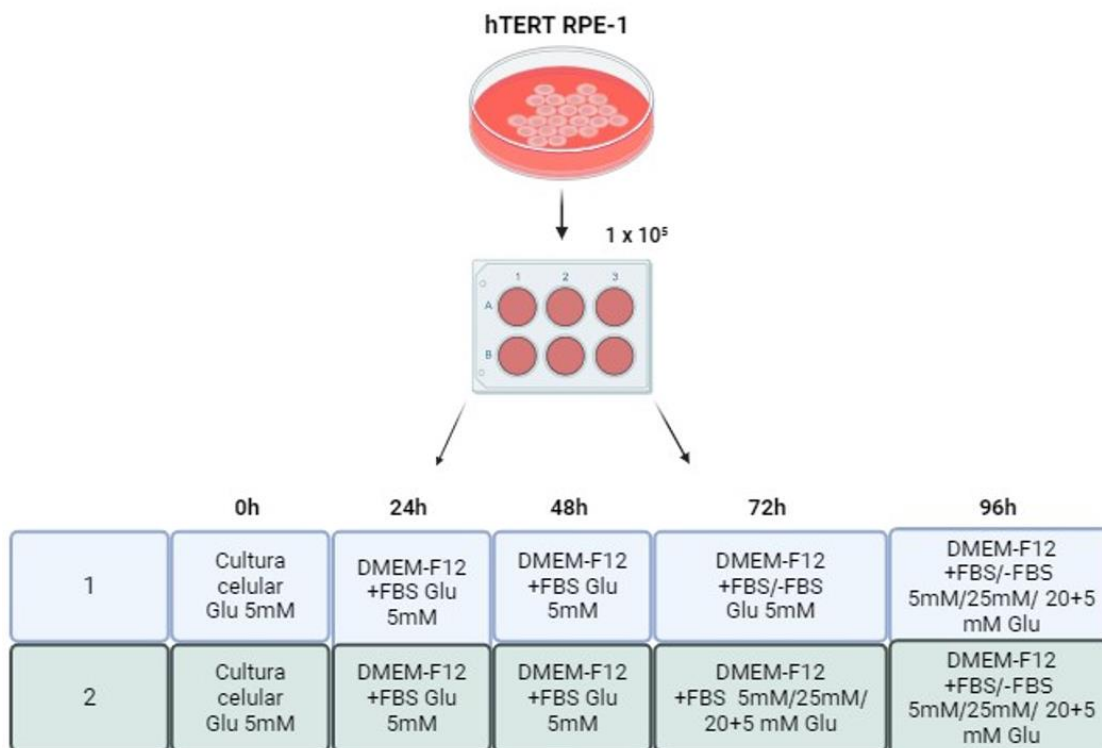


Figura 8 :Esquema do protocolo de PCR e a configuração dos meios de acordo com o tempo. Preparação de cultura celular semelhante ao protocolo de imunofluorescência. Foram cultivadas 1×10^5 células por poço.

Este passo foi repetido tantas vezes quanto necessárias para processar todo o volume da amostra. A coluna foi lavada com 500 μ L de solução tampão de lavagem 1 e centrifugada durante 30 segundos a 10 000 x g tendo-se desprezado o eluído. A coluna é em seguida lavada com o tampão 2 e centrifugada durante um minuto a 10 000 x g tendo-se desprezado novamente o eluído. Este último passo foi repetido mais uma vez. Em seguida procedeu-se à remoção total de tampão da coluna pelo e que esta foi centrifugada à velocidade máxima da centrifuga Eppendorff. Em seguida procedeu-se à eluição do RNA a partir da matriz da coluna que foi lavada com 30 μ L de água bidestilada (RNase free) recolhidos num microtubo. No final o RNA foi quantificado com recurso NanDrop, tratado com DNase I (Fermentas) e guardado a -80°C até ser utilizado.

3.6 Protocolo de PCR

A análise da expressão dos genes em estudo (Myc, Otx2 e Mitf) foi feita por PCR (Polymerase Chain Reaction) semi-quantitativo adaptado de Meadus (2003).

A quantidade de cDNA foi sintetizado a partir de um molde de mRNA, obtido através de uma reação catalisada pelas enzimas Transcriptase Reversa e a DNA polimerase. A quantidade de cDNA a utilizar foi primeiro normalizada após a realização de um PCR para permitir amplificar, em condições não saturantes, os transcritos dos genes em estudo.

A composição da mistura de PCR utilizada está descrita na Tabela 2 e as sequências dos primers utilizados encontram-se na Tabela 3. A reação de PCR foi realizada num termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Alemanha), nas condições indicadas na Tabela 4.

Tabela 2: Reagentes e os volumes na reação de PCR

Reagentes utilizados	Volume adicionado
Tampão de reação 10x (fornecido com a enzima)	2 a 4 µL
MgCl ₂ 50 mM (fornecido com a enzima)	1 µL
dNTPs Mix 25 mM	0,5 a 1 µL
Primer forward (10 µM)	1 µL
Primer reverse (10 µM)	1 µL
DNA Polimerase Supreme NZY TM Taq II	0,5 µL
cDNA	0,5 µL a 1 µL
Água bidestilada	Até 15 µL

Tabela 3: Gene estudado, sequências nucleotídicas dos primers utilizados.

Gene	Primer	Sequência (5' → 3')
Myc	Forward	TAGTGGAAAACCAGCAGCCTC
	Reverse	GAAGCCGCTCCACATACAGT
Mitf	Forward	ACCGCTGAAGAGCAGCAGTT
	Reverse	TTGGGCTTGCTGTATGTGGT
Otx2	Forward	AAATTGCTAGAGCAGCCCTC
	Reverse	CAGGGCCCCGGGTAG

Tabela 4: Reação de PCR e as condições utilizadas.

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	4 min	1
Desnaturação	95°C	30 s	30
Hibridação	53 a 55°C	30 s	30
Extensão	72°C	30 s	30
Extensão final	72°C	10 min	1

Para cada experiência otimizou-se o número de ciclos a utilizar de modo que a amplificação de cada um dos produtos de PCR obtidos fosse realizada em condições não saturantes.

A análise dos produtos de PCR obtidos foi feita através de uma eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v). Os géis foram preparados adicionando o volume apropriado de tampão TAE 1x (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) à agarose e aquecendo até que esta se dissolvesse na totalidade. Após arrefecimento, foi adicionado 1 µL de GreenSafe Premium por cada 100 mL de gel. As amostras foram preparadas através da adição do volume apropriado de solução de amostra (glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,25% (m/v)) e foram, de seguida, aplicadas no gel, assim como o marcador de massa molecular NZYDNA Ladder VI. A migração eletroforética decorreu em tampão TAE 1x, a 100 V e por cerca de 1 h, com recurso a uma fonte de tensão BioRad PAC300 (BioRad, EUA).

3.6 Análise de dados

Para quantificação das imagens de imunofluorescência foi utilizado o software CellProfiler (Broad Institute, USA). Para quantificação das bandas correspondentes ao DNA obtidas pelo protocolo de PCR foram observadas e fotografadas num transiluminador UV Syngene GX-2020SL-E60 (Fisher Scientific, EUA). A quantidade dos produtos de DNA amplificados por PCR foi estimada utilizando o “software” ImageJ. Para validar os resultados experimentais obtidos procedeu-se à sua análise estatística com recurso ao Microsoft Excel (Microsoft, EUA). Considerou-se que uma amostra seria significativamente diferente do controlo quando o valor de p obtido fosse inferior a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 Impacto de diferentes concentrações de glucose na montagem de cílios primários em células hTERT-RPE-1

Como mencionado anteriormente, a disfunção dos cílios primários tem sido implicada com processos metabólicos anormais, gerando desequilíbrios no metabolismo energético, já que em tecidos metabolicamente ativos, como o pâncreas e o tecido adiposo, esses organelos possuem papel crucial na regulação da diferenciação dos adipócitos, no armazenamento de gordura, na secreção de hormonas metabólicas e resistência à insulina. Assim sendo, o seu mau funcionamento poderá contribuir para o desenvolvimento da diabetes e obesidade (Volta et al., 2017; Kluth et al., 2019)

Pensa-se que os cílios primários desempenham funções na modulação da sinalização Wnt. Esta via tem uma rede complexa de proteínas, já mais conhecida por seu papel na embriogénese e no cancro, mas também é crítica em processos fisiológicos normais, incluindo o crescimento, migração e diferenciação celular. As diversas vias Wnt (canónicas e não canónicas) estão envolvidas na manutenção desses processos metabólicos, com provável influência da glucose. Pode-se dizer que todas essas vias estão envolvidas na manutenção da saúde da retina (Sharma et al., 2022).

Após estudarmos a expressão da proteína DVL1 em células h-TERT-RPE-1, sujeitas a diferentes concentrações de glucose (5 mM, 25 mM e 20 mM manitol + 5 mM glucose) e em diferentes condições de indução da formação de cílios, como descrito no capítulo Materiais e Métodos. Analisamos por microscopia de fluorescência usando o anticorpo anti- ARL13B, e quantificámos a presença de cílios primários Tabela 5, Tabela 5 e Figura 6).

No Grupo 1, observou-se que a ciliogénese foi mais eficiente nas amostras cultivadas sem FBS. As percentagens de células com cílios variaram entre 17,33% e 38,39% nas análises sem FBS, enquanto nos poços com FBS os valores foram significativamente mais baixos, oscilando entre 2,26% e 13,24%. Estes resultados indicam que a presença de soro após a indução de cílios poderá inibir a manutenção da ciliogénese.

No Grupo 2, onde a exposição à glucose precedeu a indução da ciliogênese, os resultados obtidos nas condições sem FBS também foram superiores, com um pico de 37,90% na primeira análise e uma redução gradual nas análises seguintes. Nas condições com FBS, os valores foram ainda mais baixos, variando entre 6,88% e 13,08%.

De um modo geral, a condição sem FBS favoreceu a formação de cílios em ambas as estratégias experimentais. A maior proporção de células ciliadas foi observada na primeira análise do Grupo 2 sem FBS (37,90%), o que sugere que a ordem dos eventos — neste caso, a variação da glucose antes da indução dos cílios — poderá também influenciar positivamente a formação ciliar.

Tabela 5: Experiência 5 mM - Grupo 1 (indução da ciliação e após modificação das concentrações de glucose).

Experiência (Grupo 1) 5 mM	Número de células	Células com cílios	Percentagem	
Sem FBS	1ª análise	112	43	38,39%
	2ª análise	169	57	33,73%
	3ª análise	150	26	17,33%
Com FBS	1ª análise	154	17	11,04%
	2ª análise	266	6	2,26%
	3ª análise	287	38	13,24%

Tabela 6: Experiência 5 mM - Grupo 2 (modificação das concentrações de glucose e após indução da ciliação)

Experiência (Grupo 2) 5 mM	Número de células	Células com cílios	Percentagem	
Sem FBS	1ª análise	124	47	37,90%
	2ª análise	282	68	24,11%
	3ª análise	154	20	12,98%
Com FBS	1ª análise	153	16	10,46%
	2ª análise	357	31	8,68%
	3ª análise	107	14	13,08%

A avaliação da presença ou ausência de cílios nas células submetidas às concentrações de glucose a 25 mM podem ser observadas a seguir (Tabela 7 e Tabela 8).

Quantificação de cílios nas células não ciliadas e ciliadas – Grupo 1 e Grupo 2

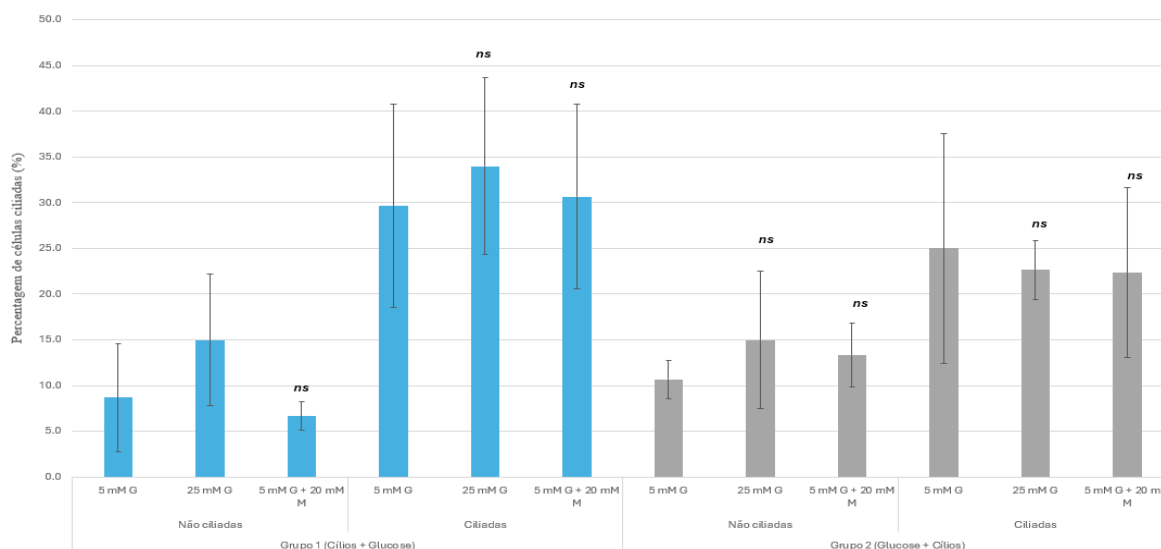


Figura 9: Representação gráfica da quantificação de cílios nas diferentes concentrações de glucose (Grupo 1 e 2) e subgrupos (não ciliadas e ciliadas). A análise estatística está feita usando o 5mM de cada subgrupo como controle experimental. Ns – não significativo.

No Grupo 1, quando as células foram submetidas à indução de cílios antes da alteração glicêmica, observou-se que a ciliogênese foi mais eficiente nas condições sem FBS. As porcentagens de células com cílios foram de 38,10%, 41,46% e 23,08% nas três análises consecutivas sem FBS, indicando uma ciliogênese relativamente consistente nas duas primeiras análises, com uma ligeira diminuição na terceira. Em contrapartida, nos poços com presença de FBS, a ciliogênese foi visivelmente reduzida. As porcentagens observadas foram 20,95%, 7,33% e 17,05%. Estes dados sugerem que a presença de FBS após a indução de cílios poderá ter um efeito inibitório sobre a manutenção ou expressão dos cílios primários, especialmente na segunda análise.

No Grupo 2, as células foram inicialmente expostas à condição hiperglicêmica, antes da indução da ciliogênese. Os resultados indicaram que a ausência de FBS continuou a favorecer a formação de cílios, com porcentagens de 24,36%, 25,00% e 18,82% nas três análises. Embora os valores sejam inferiores aos observados no Grupo 1 sem FBS, mantêm-se superiores aos registrados nas condições com soro. Com FBS,

os valores foram ainda mais reduzidos: 15,58%, 7,42% e 21,74%, reforçando a hipótese de que a presença de FBS dificulta a ciliogênese, possivelmente devido à presença de factores de crescimento que estimulam a progressão do ciclo celular em detrimento da formação ciliar.

Tabela 7: Experiência 25 mM – Grupo 1 (com e sem FBS)

Experiência (Grupo 1) 25 mM		Número de células	Células com cílios	Porcentagem
Sem FBS	1ª análise	105	40	38,10%
	2ª análise	164	68	41,46%
	3ª análise	130	30	23,08%
Com FBS	1ª análise	148	31	20,95%
	2ª análise	273	20	7,33%
	3ª análise	176	30	17,05%

Tabela 8: Experiência 25 mM – Grupo 2 (com e sem FBS)

Experiência (Grupo 2) 25 mM		Número de células	Células com cílios	Porcentagem
Sem FBS	1ª análise	156	38	24,36%
	2ª análise	232	58	25,00%
	3ª análise	85	16	18,82%
Com FBS	1ª análise	199	31	15,58%
	2ª análise	283	21	7,42%
	3ª análise	138	30	21,74%

No Grupo 1, as células foram inicialmente submetidas à indução da ciliogênese, seguida da exposição ao meio contendo 20 mM de manitol e 5 mM de glicose. Verificou-se que, nas três análises realizadas sem FBS, as percentagens de células com cílios foram de 39,64%, 32,09% e 19,57%, respectivamente. Este padrão indica uma diminuição gradual da ciliogênese ao longo do tempo, ainda que com valores expressivos nas duas primeiras análises. Em contraste, nas condições com FBS, os valores observados foram significativamente inferiores: 7,45%, 4,59% e 8,20%. Estes resultados

reforçam o padrão verificado nos restantes grupos, nos quais a presença de soro parece inibir a formação de cílios ou dificultar a sua manutenção após a indução inicial.

No Grupo 2, as células foram inicialmente expostas ao meio com 20 mM de manitol + 5 mM de glucose, sendo posteriormente submetidas à indução da ciliogénese. Nas amostras sem FBS, as percentagens de células com cílios foram de 32,81%, 17,51% e 15,92%, também demonstrando uma tendência de diminuição progressiva da ciliogénese ao longo das análises.

Nas condições com FBS, a percentagem de células com cílios manteve-se baixa em todas as análises: 16,67%, 9,48% e 12,59%. Embora ligeiramente superiores às obtidas no Grupo 1 com FBS, estes valores permanecem abaixo dos registados nas condições sem soro.

Tabela 9: Experiência 20 mM manitol + 5 mM de glucose – Grupo 1 (com e sem FBS)

Experiência (Grupo 1) 20 mM manitol + 5 mM de glucose		Número de células	Células com cílios	Percentagem
Sem FBS	1ª análise	111	44	39,64%
	2ª análise	134	43	32,09%
	3ª análise	92	18	20,57%
Com FBS	1ª análise	161	12	7,45%
	2ª análise	283	13	4,59%
	3ª análise	122	10	8,20%

Tabela 10: Experiência 20 mM de manitol + 5 mM de glucose – Grupo 2 (modificação das concentrações de glucose e após indução da ciliação)

Experiência (Grupo 2) 20 mM manitol + 5 mM de glucose		Número de células	Células com cílios	Porcentagem
Sem FBS	1ª análise	128	42	33,81%
	2ª análise	257	45	17,51%
	3ª análise	157	25	15,92%
Com FBS	1ª análise	102	17	16,67%
	2ª análise	232	22	9,48%
	3ª análise	135	17	12,59%

O Grupo 1 (indução de cílios antes da exposição ao manitol) apresentou valores ligeiramente superiores nas duas primeiras análises sem FBS, em comparação com o Grupo 2. No entanto, de um modo geral, não foram observadas diferenças significativas entre as duas amostras, independentemente da concentração de glucose ou do momento de indução da montagem dos cílios primários. A presença de manitol como controlo osmótico não foi suficiente para compensar a supressão causada pelo soro fetal bovino na cilogénese. Os dados reforçam que a remoção do FBS constitui um factor crítico para a indução e manutenção dos cílios primários, mesmo em condições osmóticas ajustadas.

4.2 Impacto de diferentes concentrações de glucose na expressão da proteína DVL1 em hTERT-RPE-1

Muitos mecanismos da influência da glucose na via de sinalização Wnt ainda estão por ser elucidados. O estado de hiperglicémia crónica parece resultar no aumento do stress oxidativo e na inflamação das células da retina, promovendo maior expressão de ligandos e recetores Wnt, incluindo a proteína DVL1. Em resposta à ativação da via Wnt, a DVL1 pode sofrer translocação para o núcleo celular, onde interage com fatores de transcrição e regula a expressão de genes-alvo (Chen et al., 2017).

Considera-se que a hiperestimulação da via Wnt, principalmente a via dependente de β -catenina, pode acarretar no aumento da permeabilidade da barreira

hemato-retiniana, além de promover a formação de neovascularização anormal e amplificar a resposta inflamatória (Gao et al., 2016; Nguyen et al., 2022). Uma das hipóteses aceitas é a de que algumas proteínas inibitórias da sinalização Wnt, como a proteína Dickkopf1 (DKK1), estariam diminuídas nessas condições. No entanto, é concebível que, apesar da diminuição destes inibidores, tal não seja suficiente para estimular esta via, já que esta interage com várias outras vias de sinalização (como por exemplo: TGF- β , Notch e VEGF), resultando em mecanismos redundantes de sinalização (Lattanzio et al., 2014). Além disso, este estado crônico cria um ciclo de *feedback* em que moléculas oxidativas e citocinas inflamatórias mantêm continuamente a via ativada.

Os inibidores da via Wnt podem também não ser totalmente específicos, o que pode levar a efeitos fora do alvo e, conseqüentemente, à diminuição da sua eficácia. A complexidade da via de sinalização Wnt decorre dos seus numerosos subtipos, dos diversos componentes envolvidos, das suas extensas interações com outras vias de sinalização, dos seus mecanismos reguladores intrínsecos e da sua atividade dinâmica.

A proteína DVL1 atua como mediador-chave entre o receptor Frizzled e a proteína β -catenina. Devido à sua grande influência na sinalização Wnt, foi selecionada para este estudo (Logan et al., 2007; Morthorst et al., 2018).

Com o objetivo de estabelecer uma relação potencial entre a regulação metabólica da glucose e a via Wnt mediada pelo cílio primário, estudámos a expressão de DVL1 em células epiteliais pigmentadas da retina humana sujeitas a diferentes concentrações de glucose (5mM, 25mM e 20mM de manitol + 5mM de glucose) e a diferentes condições de indução da formação de cílios, conforme descrito no capítulo "Materiais e Métodos".

Numa primeira abordagem avaliámos os níveis de expressão de DVL1 na célula por imunofluorescência, utilizando anticorpos anti-DVL1. Para complementar a análise, utilizámos também anti-acetil- α -tubulina (marcador centrossomal) e anti-ARL13B (marcador ciliar). Através da marcação com DAPI, foi possível delimitar o compartimento nuclear e quantificar a DVL1 presente no núcleo. Por outro lado, a marcação com anti-acetil- α -tubulina e anti-ARL13B permitiu-nos comprovar a presença de cílios.

Após 48 horas em meio com glucose reduzida, estudámos um grupo de células em que a remoção do soro foi realizada mais precocemente (indução da montagem de cílios) seguido pela exposição a diferentes concentrações de glucose (Grupo 1).

Experiências semelhantes foram efetuadas, mas agora com a montagem de cílios primários induzida após a adição das diferentes concentrações de glucose (Grupo 2).

Este delineamento experimental permitiu avaliar se há alteração nos níveis de DVL1 nuclear e em resposta à presença de cílios primários ou à indução da sua montagem.

Após análise das três experiências obtidas por microscopia de imunofluorescência nas condições acima descritas (Figura 6), pôde-se observar que no grupo 1 as células não ciliadas que permaneceram em meios de glucose 25 mM e 20 mM de manitol + 5 mM de glucose apresentaram níveis mais baixos de DVL1 no compartimento nuclear em comparação com as células submetidas a 5 mM. Nas células ciliadas, sem a suplementação de FBS, os níveis de DVL1 nuclear apresentam menor variação nas diferentes concentrações de glucose estudadas. O efeito de induzir a formação ciliar anterior à adição de glucose pode estar relacionado a manutenção dos níveis nucleares de DVL1 em resposta a níveis elevados de glucose (Figura 9).

Com relação ao grupo 2, não houve variabilidade significativa entre as células não ciliadas e ciliadas. Nas células não ciliadas submetidas a 25 mM foi observado um dos menores níveis de DVL1 nuclear. Em comparação, as células ciliadas apresentaram um aumento dos níveis de DVL1 (Figura 9). Deste modo a presença do cílio primário parece ter um efeito protetor, de manutenção dos níveis nucleares de DVL1.

Por outro lado, no meio com a presença do manitol (20 mM de manitol + 5 mM de glucose), que é um controlo de stress osmótico, devido as membranas celulares serem pouco permeáveis ao manitol, a fluorescência devido à marcação com anticorpo específico DVL1 parece diminuir nas células ciliadas. Essa atenuação da fluorescência poderá ter uma relação com o mecanismo de montagem ciliar. Em comparação com o grupo de células submetidas à mesma concentração de glucose, com estimulação da formação de cílios antes da adição da glucose, observa-se um aumento significativo dos níveis de DVL1 nuclear. A presença de cílios antes da adição da glucose pode gerar alguma influência para que o DVL1 permaneça no núcleo ou seja mais ativamente transportado.

Intensidade de DVL1 nas células não ciliadas e ciliadas – Grupo 1 e Grupo 2

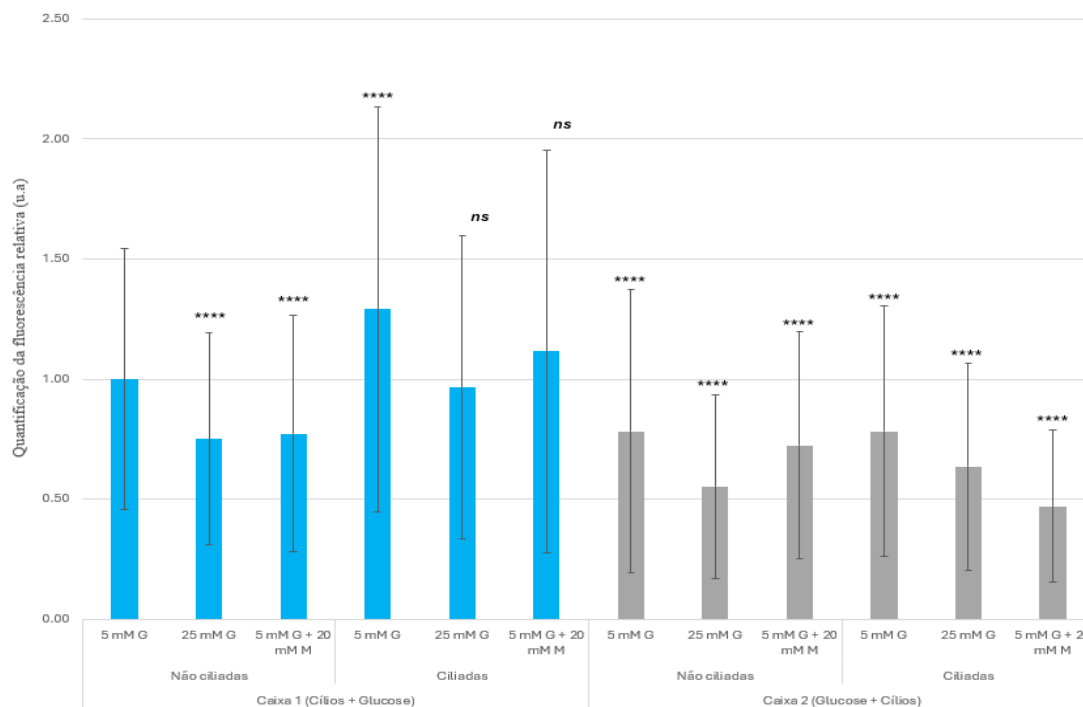


Figura 10: Quantificação de DVL1 no núcleo.

Legenda: Representação gráfica da quantificação da fluorescência de DVL1 em células hTERT RPE-1 quando suplementadas com 5 mM, 25 mM e 20 mM de manitol + 5 mM de glucose. Diferenciação entre grupo 1 (caixa 1 – indução de cílios e alteração de concentração de glucose) e grupo 2 (caixa 2 – alteração das concentrações de glucose e após indução de cílios). Para análise destas células utilizaram-se os anticorpos anti-DVL1 e anti-ARL13B. O DNA foi marcado com DAPI. Os dados estão representados como média ± intervalo de confiança a 95% de 3 experiências distintas. A análise estatística está feita usando o 5mM não ciliado da Caixa 1 como controlo experimental. **** $p < 0,00001$ / Ns – não significativo.

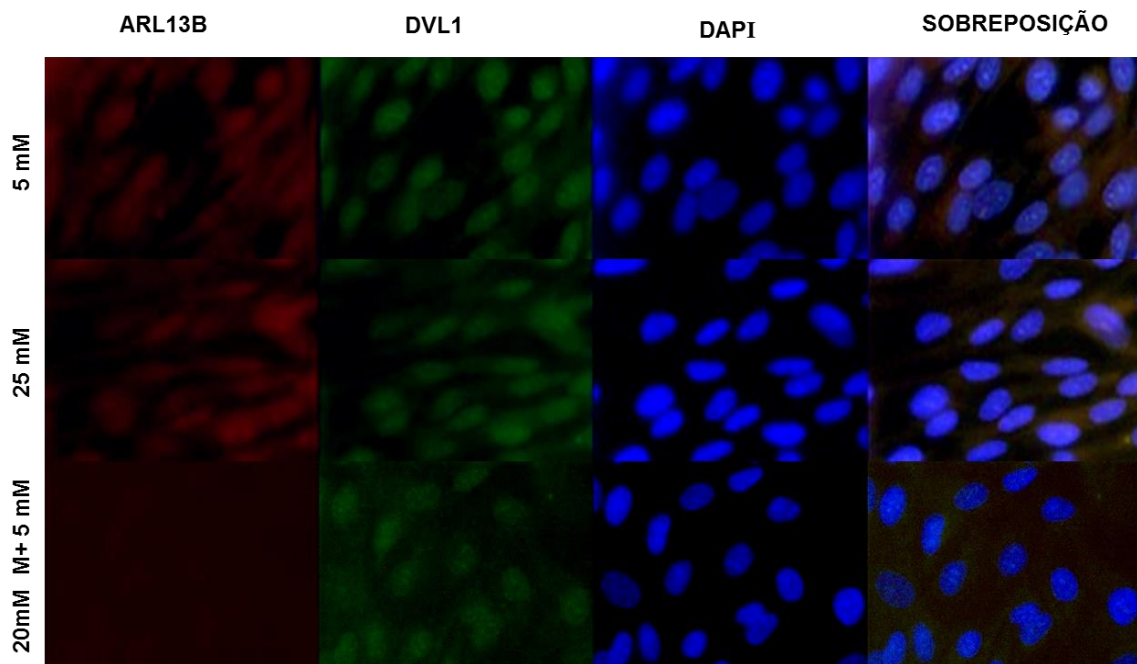


Figura 11: Imagem adquirida por Imunofluorescência. Células do Grupo 1 e não ciliadas. Concentrações 5 mM, 25 mM e 20 mM de manitol + 5 mM de glicose.

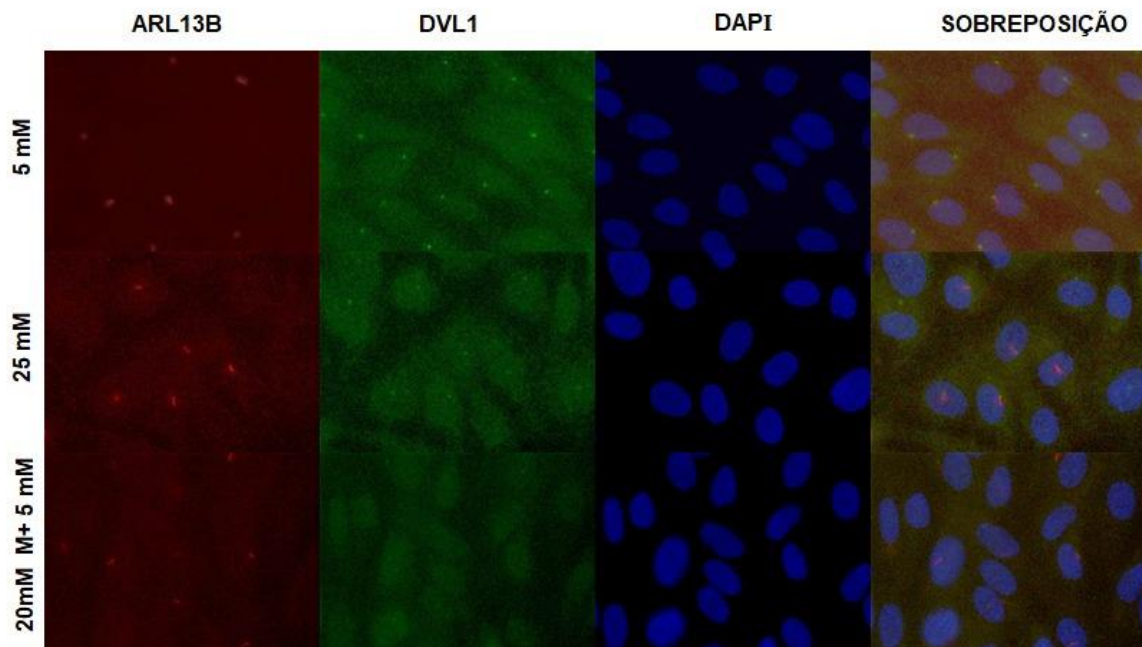


Figura 12: Imagem adquirida por Imunofluorescência. Células do Grupo 1 ciliadas. Concentrações 5 mM, 25 mM e 20 mM de manitol + 5 mM de glicose.

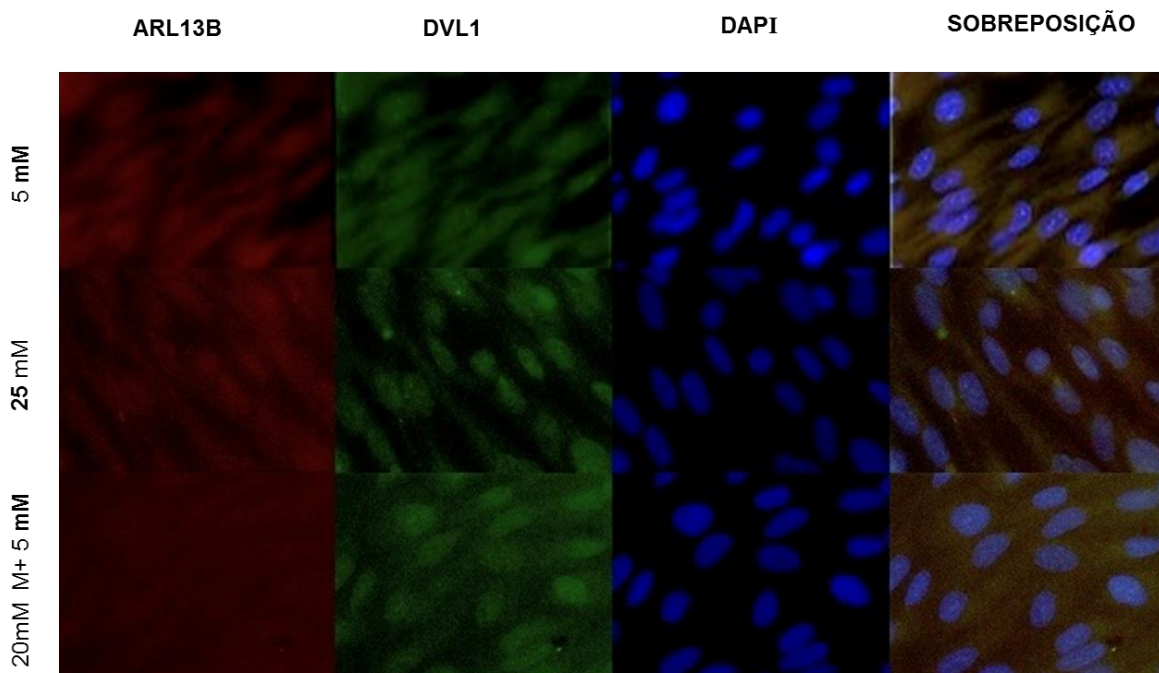


Figura 13: Imagem adquirida por Imunofluorescência. Células do Grupo 2 não ciliadas. Concentrações 5mM, 25 mM e 20 mM de manitol + 5 mM de glucose.

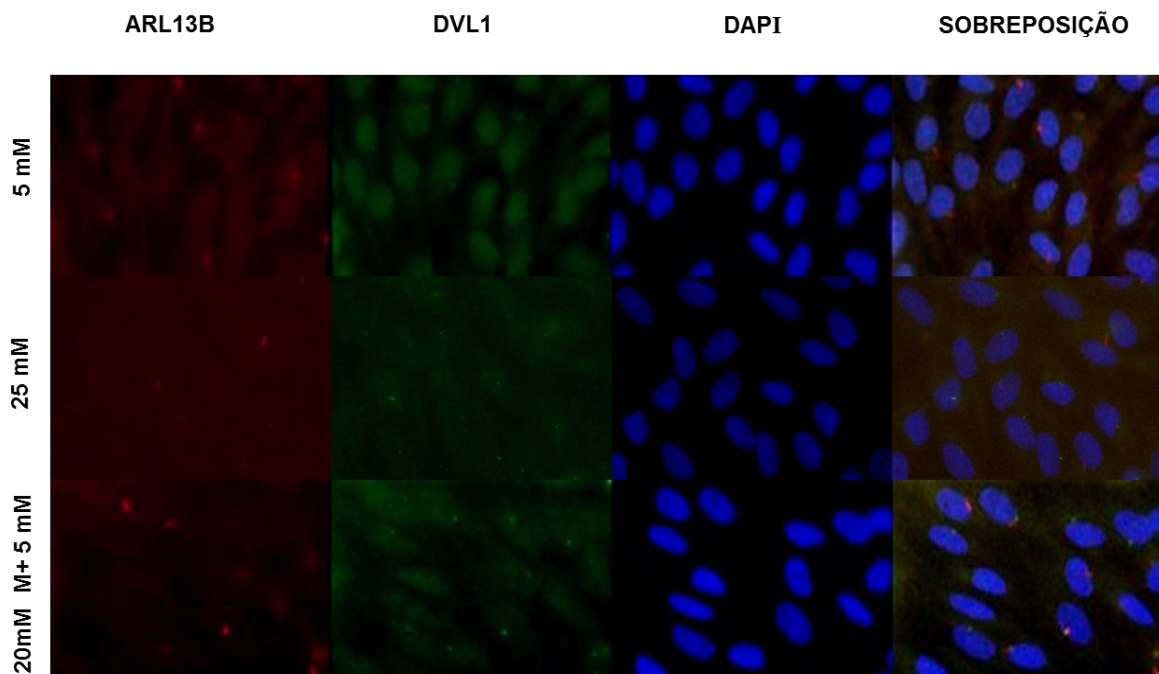


Figura 14: Imagem adquirida por Imunofluorescência. Células do Grupo 2 ciliadas. Concentrações 5 mM, 25 mM e 20 mM de manitol + 5 mM de glucose.

4.3 Expressão dos genes Myc, Otx2 e Mitf em condições de níveis elevados de glucose e na presença e ausência de cílios primários em células hTERT-RPE-1

Para tentar obter indicações se as alterações nos níveis de DVL1 observadas no núcleo das células nas condições anteriormente estudadas, estavam correlacionadas com a ativação transcricional de genes alvo do DVL1 foram escolhidos três desses genes: Myc, Mitf e Otx2. Estes genes foram escolhidos por serem aqueles cuja regulação pelo DVL1 se encontrava bem estabelecida na literatura, e porque existiam dados disponíveis de que estes desempenham importantes papéis no funcionamento ou na diferenciação da retina.

A família Myc (c-Myc, n-Myc, l-Myc) é uma das famílias de reguladores transcricionais mais bem estudada. Estas proteínas são um fator essencial para a progressão e proliferação do ciclo celular, apoptose celular, diferenciação celular, metabolismo celular, síntese de proteínas e biogênese e função mitocondrial (Peterson; Ayer, 2011). Conseqüentemente, modificações na expressão, sequência ou estrutura do Myc podem levar a alterações no comportamento celular, resultando em patologias que variam desde disfunção leve à tumorigênese e, podendo até resultar na morte celular. (Rosselot et al., 2021). Embora ainda pouco elucidado, o gene Myc parece interferir no modo como as células detetam, se adaptam e utilizam a glucose, para além de promover a proliferação de células β pancreáticas (Rosselot et al., 2021).

O fator de transcrição associado a microftalmia – o Mitf, é responsável por controlar processos celulares numa variedade de tipos de células, contribuindo em múltiplos processos para o desenvolvimento dos olhos e mais precisamente da retina. Este gene pode atuar como ativador ou repressor de factores de transcrição tendo sido mais estudado na ativação de genes que induzem a pigmentação celular (Spence et al., 2007). A proteína Mitf participa na regulação do transporte de iões através do epitélio pigmentar da retina (RPE) e da vasculatura ocular (García-Llorca A et al. 2019).

Na presença de mutação ou desregulação do gene Mitf podem ocorrer malformações oculares e perda de RPE, com conseqüente perda da função visual (García-Llorca et al. 2019).

O fator de transcrição homeobox Otx2 desempenha um papel importante durante a diferenciação na determinação do destino celular na retina. Este gene está altamente

envolvido na neurogênese da retina. O gene *Otx2* é ativado na diferenciação celular durante o desenvolvimento da retina (Kaufman et al., 2021). Algumas células da retina, quando diferenciadas, perdem a sua expressão, que, no entanto, é mantida nas células fotoreceptoras e nas células bipolares até a idade adulta (Emerson et al., 2013). Por ser um regulador chave na diferenciação das células RPE e na formação da retina as alterações dos níveis de *Otx2* podem interferir nas funções das células RPE (Kaufman et al., 2021).

Para avaliar a expressão dos genes *Myc*, *Mitf* e *Otx2* foi realizado uma experiência RT-PCR com células submetidas a diferentes concentrações de glucose e tempo de indução de cílios primários, conforme descrito nos Materiais e Métodos.

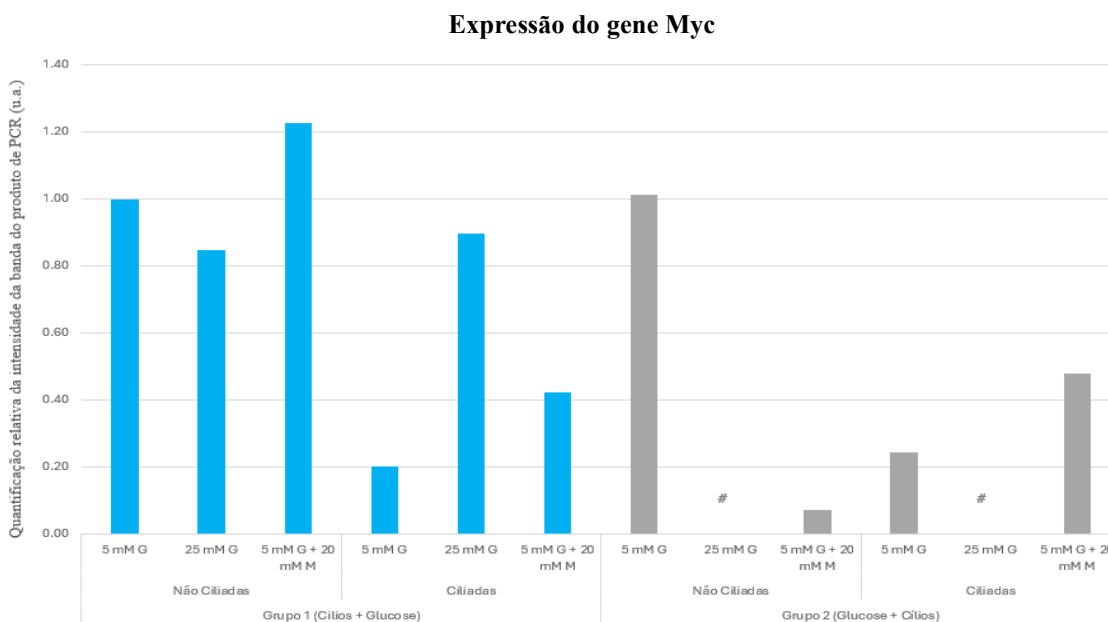


Figura 15: Representação gráfica da expressão do gene *Myc* em uma experiência realizada. Quantificação da expressão do gene *Myc* – representação gráfica da expressão do gene *Myc* em células hTERT RPE-1 quando suplementadas com 5 mM, 25 mM e 20 mM de manitol + 5 mM de glucose. Diferenciação entre grupo 1 (caixa 1 – indução de cílios e alteração de concentração de glucose) e grupo 2 (caixa 2 – alteração das concentrações de glucose e após indução de cílios). Os dados foram obtidos através de uma experiência realizada. Em Azul estão representadas células do grupo 1 na qual houve a indução de cílios anteriormente. Em Cinzento células do grupo 2, na qual houve a modificação das concentrações de glucose anteriormente. # células sem expressão do gene *Myc*.

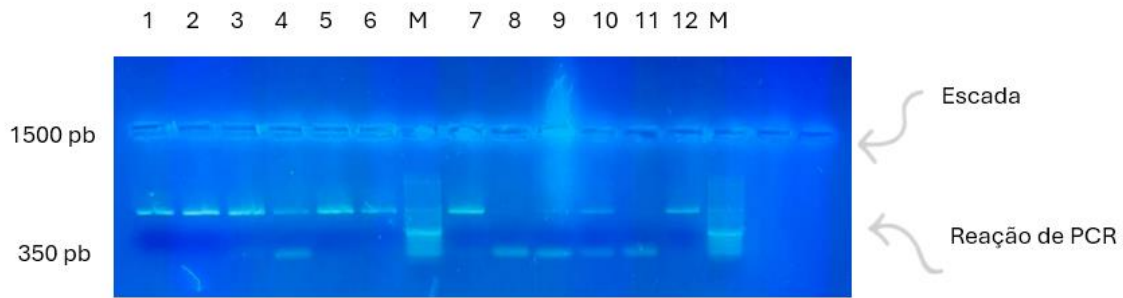


Figura 16: Análise da electroforese em gel de agarose 2% (m/v) dos produtos de RT-PCR para quantificar a expressão do gene Myc. Foi utilizado o marcador de massa molecular NZYDNA VI (50-1500 pb). Análise das bandas representadas por células hTERT RPE-1 quando suplementadas com 5 mM, 25 mM e 20 mM de manitol + 5 mM de glucose. Os dados foram obtidos através de uma experiência realizada. Grupo1: 1- não ciliadas 5mM ,2- não ciliadas 25mM, 3-não ciliadas 20 mM manitol + 5 mM glucose, 4- ciliadas 5mM, 5- ciliadas 25 mM, 6- ciliadas 20 mM manitol + 5 mM glucose, M- marcador; Grupo 2: 7- - não ciliadas 5mM, 8- não ciliadas 25mM, 9- não ciliadas 20 mM manitol + 5 mM glucose, 10- ciliadas 5mM, 11- ciliadas 25mM, 12- ciliadas 20 mM manitol + 5 mM glucose.

A expressão de Myc das células do grupo 1, com indução de cílios antes da suplementação com glucose, apresenta níveis mais elevados de expressão em comparação com os seus níveis nas células do grupo 2, no qual as células foram sujeitas às concentrações de glucose anteriormente mencionadas antes da indução da montagem de cílios primários, com exceção na concentração de 5 mM nas células não ciliadas (valor ajustado – 1,00 no grupo 1 e 2).

As células submetidas à concentração 20 mM de manitol + 5 mM de glucose apresentaram maior expressão de Myc nas células não ciliadas que tiveram a indução de cílios antes da suplementação com glucose (valor ajustado – 1,23).

Quando comparamos as células submetidas a concentração de 25 mM de glucose observamos que nas células na qual houve a indução de cílios antes da suplementação com glucose, há uma maior expressão de Myc tanto nas células não ciliadas como nas ciliadas (0,85 e 0,90 respectivamente). Quando comparamos com o grupo 2, observa-se que tanto as não ciliadas como as ciliadas não apresentaram expressão de Myc. A expressão inalterada do Myc no grupo 1 poderá estar correlacionada com a presença de cílios antes da suplementação com diferentes concentrações de glucose.

Expressão do gene Mitf

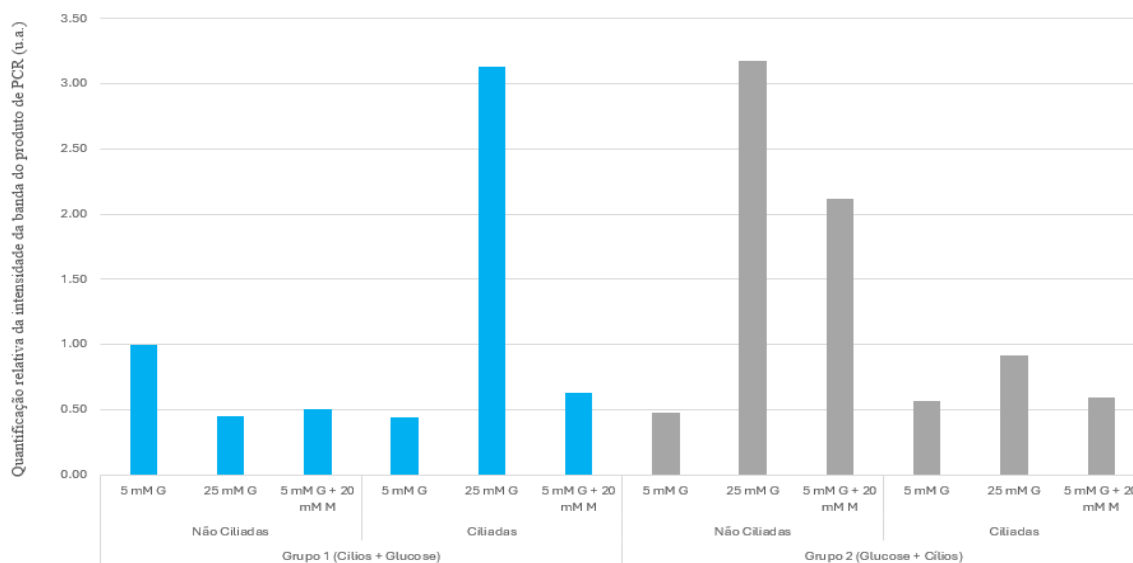


Figura 17: Quantificação da expressão do gene Mitf. Representação gráfica da expressão do gene Mitf em células hTERT RPE-1 quando suplementadas com 5 mM, 25 mM e 20 mM de manitol + 5 mM de glucose. Diferenciação entre grupo 1 (caixa 1 – indução de cílios e alteração de concentração de glucose) e grupo 2 (caixa 2 – alteração das concentrações de glucose e após indução de cílios). Os dados foram obtidos através de uma experiência realizada.

Relativamente à expressão do gene Mitf nas células com concentrações de glucose a 5 mM estas mantêm-se em baixos níveis, tanto na células não ciliadas quanto ciliadas e independente do grupo a que pertencem. Nas células submetidas a concentração 20 mM de manitol + 5 mM de glucose, observa-se um aumento da expressão de Mitf nas células não ciliadas do grupo em que as concentrações de glucose foram modificadas antes da indução da montagem de cílios primário em comparação ao grupo de células no qual houve a indução de cílios antes da suplementação com glucose.

Quando analisamos os níveis de expressão de Mitf quer nas células ciliadas do grupo 1, quer nas células não ciliadas do grupo 2 sujeitas a concentrações a 25 mM de glucose observamos um aumento significativo da expressão de Mitf (3,13 e 3,18 respetivamente). Porém, os níveis de Mitf na presença de cílios primários antes da suplementação com glucose são diferentes dos observados quando a indução da montagem de cílios é realizada após a suplementação com a glucose. Desta forma o momento da montagem dos cílios relativamente à suplementação da glucose parece ser essencial na regulação da expressão do gene Mitf em resposta ao aumento dos níveis de glucose.

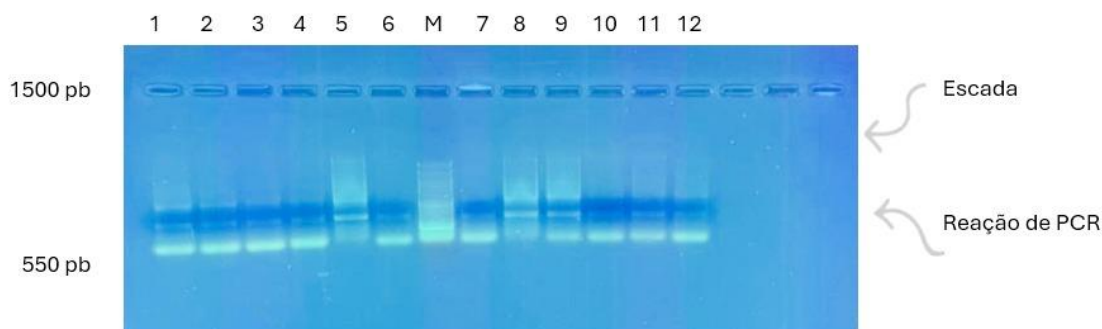


Figura 18: Análise da electroforese em gel de agorse 2% (m/v) dos produtos de RT-PCR para quantificar a expressão do gene Mitf. Foi utilizado o marcador de massa molecular NZYDNA VI (50-1500 pb). Análise das bandas representadas por células hTERT RPE-1 quando suplementadas com 5 mM, 25 mM e 20 mM de manitol + 5 mM de glucose. Diferenciação entre grupo 1 (caixa 1 – indução de cílios e alteração de concentração de glucose) e grupo 2 (caixa 2 – alteração das concentrações de glucose e após indução de cílios). Os dados foram obtidos através de uma experiência realizada. Grupo1: 1- não ciliadas 5mM , 2- não ciliadas 25mM, 3- não ciliadas 20 mM manitol + 5 mM glucose, 4- ciliadas 5mM, 5- ciliadas 25 mM, 6- ciliadas 20 mM manitol + 5 mM glucose, M- marcador; Grupo 2: 7- - não ciliadas 5mM, 8- não ciliadas 25mM, 9- não ciliadas 20 mM manitol + 5 mM glucose, 10- ciliadas 5mM, 11- ciliadas 25mM, 12- ciliadas 20mM manitol + 5 mM glucose.

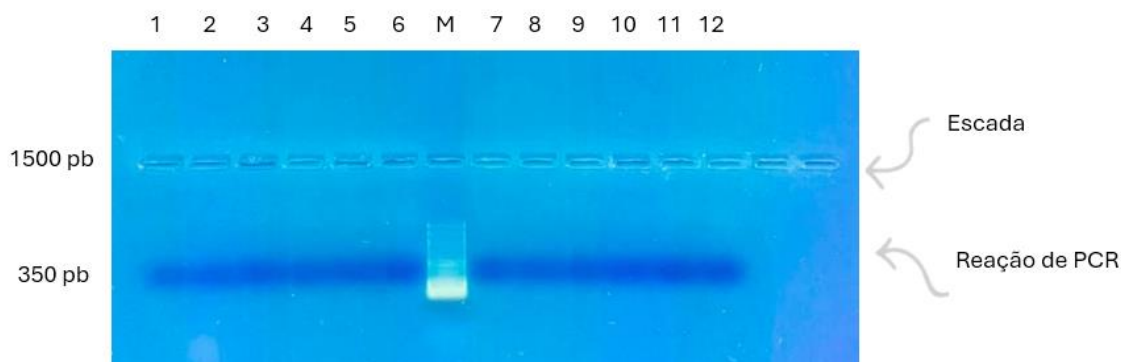


Figura 19: Análise da electroforese em gel de agorse 2% (m/v) dos produtos de RT-PCR para quantificar a expressão do gene Otx2. Foi utilizado o marcador de massa molecular NZYDNA VI (50-1500 pb). Análise das bandas representadas por células hTERT RPE-1 quando suplementadas com 5 mM, 25 mM e 20 mM de manitol + 5 mM de glucose. Diferenciação entre grupo 1 (caixa 1 – indução de cílios e alteração de concentração de glucose) e grupo 2 (caixa 2 – alteração das concentrações de glucose e após indução de cílios). Os dados foram obtidos através de uma experiência realizada. Grupo1: 1- não ciliadas 5mM , 2- não ciliadas 25mM, 3- não ciliadas 20 mM manitol + 5 mM glucose, 4- ciliadas 5mM, 5- ciliadas 25 mM, 6- ciliadas 20 mM manitol + 5 mM glucose, M- marcador; Grupo 2: 7- - não ciliadas 5mM, 8- não ciliadas 25mM, 9- não ciliadas 20 mM manitol + 5 mM glucose, 10- ciliadas 5mM, 11- ciliadas 25mM, 12- ciliadas 20mM manitol + 5 mM glucose.

Com relação a expressão do gene Otx2 não foi possível detectar a sua presença após a realização do RT-PCR. Modificamos o protocolo do PCR acrescentando maior quantidade de cDNA na amostra, porém o resultado obtido foi o mesmo.

Os resultados apresentados demonstram que a expressão dos genes Myc, Mitf em células hTERT-RPE-1 é influenciada pelas condições de concentração de glucose e pelo momento da montagem dos cílios primários. Enquanto os genes Myc e Mitf apresentaram alterações expressivas em resposta a estas condições, o gene Otx2 não foi detectado, mesmo após a otimização do protocolo experimental.

5. DISCUSSÃO

Os cílios primários são organelos sensoriais que desempenham múltiplas funções essenciais na regulação da comunicação celular, transdução de sinais, desenvolvimento embrionário e manutenção da homeostase tecidual, incluindo a homeostase energética. Assim, estes organelos participam na sinalização insulínica, no transporte de glucose, na resposta celular à glucose e interagem com múltiplas vias metabólicas importantes. (Anvarian et al, 2019; Lee, 2020).

A regulação adequada dos genes associados aos cílios é fundamental para a manutenção da função celular normal e da homeostase metabólica. Disfunções ciliares, em conjunto com alterações celulares decorrentes do estado de hiperglicemia crônica, podem contribuir para o desenvolvimento da diabetes. No contexto do DM2, estudos recentes sugerem que a regulação de genes associados aos cílios em células β pancreáticas influencia a sua função e a regulação da glucose, contribuindo para a patogênese da doença (Kluth et al., 2019). Yang e colaboradores (2021) corroboram com evidências de que a interrupção na ciliogênese prejudica a sensibilidade à glucose e afeta diretamente a secreção de insulina em modelos de células β (Yang et al., 2021).

Na DM as células β tornam-se incapazes de responder a estímulos adequados e de regular a secreção de insulina, levando a desequilíbrios no metabolismo da glucose. A hiperglicemia prolongada também afeta outros tipos celulares, como as células do epitélio pigmentar da retina (RPE). Essas células desempenham um papel fundamental na manutenção do tecido retinal e são altamente vulneráveis ao stress metabólico (Ghareghomi, 2024). A glucose é a maior fonte de energia da retina, um tecido metabolicamente muito ativo, no entanto níveis elevados de glucose neste tecido podem estar associados ao desenvolvimento de diversas patologias. As células RPE foram usadas como modelo biológico neste trabalho de forma a compreender o modo como a presença ou ausências de cílios primários pode influenciar a resposta destas células a níveis elevados de glucose. Este conhecimento poderá contribuir para compreender melhor as alterações na sinalização celular, stress oxidativo, inflamação e apoptose de células retinianas, em patologias como a retinopatia diabética (Strauss et al., 2005).

Como já referido, os cílios primários participam de várias vias de sinalização, incluindo a via de sinalização Wnt. Essa via pode estar envolvida na regulação da biogênese ciliar e na função dos cílios primários no RPE. Defeitos na sinalização ciliar podem levar a anomalias no desenvolvimento e manutenção do RPE e,

consequentemente a distúrbios na função dos fotorreceptores e degeneração retiniana (Sun et al. 2021).

A via de sinalização Wnt é uma das principais rotas de comunicação intracelular, envolvida na regulação da biogênese ciliar e na função dos cílios primários no RPE (Sun et al., 2021). Alterações ao normal funcionamento desta via podem também levar a problemas no desenvolvimento e manutenção do RPE, afetando os fotorreceptores e resultando em degeneração retiniana (Strauss et al., 2005). Esses dados são consistentes com os trabalhos de Li et al. (2023), que identificaram a ativação da via Wnt/ β -catenina como um fator crítico na progressão de doenças metabólicas e degenerativas.

A proteína DVL1, componente essencial da via Wnt, possui um papel central na transdução de sinais. Estudos apontam que sua expressão está aumentada em condições de hiperglicemia, indicando que a via canônica Wnt/ β -catenina pode ser hiperativada em resposta ao stress metabólico (Liu et al., 2023; Sharma et al., 2022). Além disso, a localização nuclear da proteína DVL1 é essencial para a eficiência dessa sinalização, mas os mecanismos que regulam sua translocação ainda são pouco conhecidos (Pruller et al., 2022).

Sabendo que as células hTERT-RPE-1 estão sujeitas a elevados níveis de glucose e a uma taxa metabólica elevada, e que o cílio primário está envolvido no contexto fisiológico, optamos por caracterizar a resposta destas células a diferentes níveis de glucose, na presença e ausência de cílios primários, estudando a quantidade de DVL1 nuclear, proteína esta essencial para a via de sinalização Wnt.

Os mediadores iniciais da via Wnt são as proteínas DVL, que desempenham um papel central na regulação dessa sinalização. Essas proteínas facilitam a inibição do complexo de destruição, responsável por direcionar a β -catenina para degradação na membrana celular (Pruller et al., 2022). Na via canônica, as proteínas DVL são recrutadas para a membrana, onde promovem a estabilização da β -catenina, impedindo sua fosforilação e permitindo sua translocação para o núcleo (Gao et al., 2010). Além disso, as DVL possuem sinais específicos de localização nuclear (NLS) e de exportação nuclear (NES), sendo essa capacidade de transitar entre o citoplasma e o núcleo essencial para a eficácia da sinalização mediada pela via Wnt (Pruller et al., 2022).

Os resultados obtidos mostraram que os níveis de DVL1 nuclear nas células ciliadas a 25 mM de glucose com indução da montagem de cílios antes da

suplementação com glucose (Grupo 1) foi maior em relação às células não ciliadas do mesmo grupo. No entanto, o mesmo não se verifica quando comparamos as células ciliadas e não ciliadas sujeitas a 25 mM de glucose no Grupo 2 (células com indução da montagem de cílios após suplementação com glucose). Estes dados sugerem que os altos níveis de glucose podem modular a via Wnt, nomeadamente através da presença da proteína DVL1 no núcleo das células e que a presença e o momento de indução da montagem de um cílio primário é relevante neste processo. Pruller et al. (2022) destacam que a presença de DVL1 e DVL3 no núcleo pode ser essencial para o controlo da proliferação celular em ambientes de stress metabólico. Os resultados por nós obtidos vêm acrescentar uma nova camada de informação mostrando que os cílios primários são fundamentais neste processo. Curiosamente é sabido que em doenças da retina como a degeneração macular relacionada com a idade (DMRI), os pacientes apresentam menor percentagem de células ciliadas no RPE (Ning et al 2023). Com os nossos resultados é tentador propor a hipótese de que indivíduo que apresentem menor eficácia na montagem de cílios primários estejam em maior risco de desenvolver DMRI quando sujeitos a situações de hiperglicémia.

Estudos anteriores também demonstraram que vias metabólicas interconectadas com a via Wnt, como AMPK e PI3K/AKT/mTOR, são ativadas em condições de hiperglicémia, influenciando a sinalização ciliar (Ghareghomi, 2024). O estágio do ciclo celular também pode ser um fator importante, uma vez que os cílios primários se formam em G0/G1 e se desmontam em G2/M (Davidson, 2010; Plotnikova et al., 2009). Dados adicionais de Sanabria-de la Torre (2022) indicam que a modulação dessas vias pode ser um mecanismo compensatório para evitar danos celulares irreversíveis durante a hiperglicémia.

O estado hiperglicémico crónico está intimamente associado a alterações moleculares significativas, incluindo a indução de stress oxidativo, a secreção de citocinas pró-inflamatórias e a morte celular, que pode ocorrer por autofagia patológica ou apoptose (Volpe, 2018; Stefano, 2016). Este ambiente hiperglicémico ativa uma via metabólica específica que inclui a sinalização mediada pelo diacilglicerol (DAG), proteína quinase C (PKC) e NADPH-oxidase, resultando na geração de espécies reativas de oxigénio (ROS). Essa disfunção mitocondrial não apenas amplifica o stress oxidativo, mas também pode atuar como uma via de sinalização competitiva, interferindo diretamente na eficácia e regulação da via Wnt estudada, impactando negativamente a função celular.

Apesar de a via Wnt ser frequentemente superexpressa em modelos animais de retinopatia diabética, estudos sobre inibidores dessa via, como SERPINA3K, endostatina, calistatina, fator derivado do epitélio pigmentar (PEDF), receptor LDL e miR-184, indicam que podem ocorrer modificações ou mutações em componentes cruciais para o seu funcionamento adequado (Sanabria de la Torre, 2022). Esses eventos podem comprometer a regulação e a eficácia da sinalização mediada pela via Wnt.

No presente estudo, os níveis de DVL1 observados em resposta a altas concentrações de glucose podem refletir uma modulação negativa da via Wnt, provavelmente induzida pelo stress celular, metabolismo alterado ou pela interferência de vias concorrentes. Essas alterações podem impactar a sinalização mediada por DVL1, corroborando a hipótese de que o ambiente hiperglicémico crônico promove desregulação de vias sinalizadoras críticas (García-Jimenez, 2013).

A regulação da ciliogénese é um processo complexo, influenciado por diversos fatores que podem impactar diretamente ou indiretamente sua iniciação e alongamento. Esse processo envolve uma ampla gama de moléculas reguladoras, como componentes dos centríolos, reguladores do tráfego vesicular, proteínas de transporte intraflagelar, proteínas de membrana e componentes do citoesqueleto (Qin, 2012). Após formado, o cílio é fisicamente separado do restante da célula pela zona de transição ciliar, uma região específica que restringe a entrada de proteínas ao cílio, garantindo sua funcionalidade (Morthorst et al., 2018).

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas entre as amostras, independentemente da concentração de glucose ou do tempo de indução da ciliogénese. A via de sinalização Wnt, particularmente dependente de β -catenina, atua predominantemente nas fases G2 e M do ciclo celular, enquanto os cílios primários se formam durante as fases G0 e G1 e se desmontam em G2 e M (Davidson, 2010; Plotnikova et al., 2009). Esse fator pode explicar os resultados menos expressivos, uma vez que o ciclo celular em que as células se encontravam poderia influenciar a formação ciliar.

Apesar disso, foi observada a manutenção da capacidade de montagem de cílios ao longo de todo o protocolo experimental. A análise da expressão de DVL1 e da quantificação ciliar sugere que a presença de cílios primários pode desempenhar um papel relevante na manutenção da DVL1 em nível nuclear.

Para uma análise mais abrangente, seria importante incluir a caracterização do tamanho ciliar, a avaliação do ciclo celular, ensaios de apoptose e a quantificação total de DVL1 e β -catenina, empregando metodologias como Western Blot para medir os níveis totais dessas proteínas, não apenas em nível nuclear, sob diferentes concentrações de glucose.

Após os resultados da quantificação de DVL1 e da análise da presença ou ausência de cílios, o estudo foi alargado para investigar, por meio de RT-PCR, a expressão gênica de três genes-alvo da proteína DVL1 (Myc, Mitf e Otx2), reconhecidos por impactar a via de sinalização Wnt de forma a contribuir para a compreensão do papel dos cílios primários nesse contexto.

O fator de transcrição Myc, descoberto décadas atrás, tem sido associado à inúmeras patologias, como em diversos tipos de cancro e na diabetes. No início dos anos 2000 exploraram o potencial gênico para auxiliar na expansão de células β pancreáticas para o tratamento da diabetes. A utilização de níveis suprafisiopatológicos de Myc revelou-se contraprodutiva, induzindo a morte de células β , desdiferenciação celular e formação de insulinomas. No entanto, a estimulação moderada da expressão do Myc revelou-se capaz de induzir a replicação de células β . Assim sendo, a regulação positiva do Myc, em altas concentrações em células β , é um provável contribuinte para a toxicidade da glucose quando a sua expressão é mantida em níveis altos. (Rosselot, 2020).

Num estudo com modelo animal com células da linha queratinócitos imortais humanos (HaCaT) cultivados em meio com alta glucose percebeu-se que ao ativar a via Wnt/ β -catenina houve sobreexpressão de c-Myc, resultando na disfunção da diferenciação celular, enquanto que a redução dos níveis de c-Myc promovia a diferenciação dessas células (baixos níveis das proteínas TGM1, LOR e K1). Assim sendo, como fator de transcrição, o c-Myc poderia estar relacionado ao controle de outros genes-alvo específicos (Zhang J, 2012).

Em um estudo utilizando modelo animal, foi demonstrado que a perda de c-Myc desencadeia uma resposta pró-inflamatória, mediando a senescência em células endoteliais humanas. Por outro lado, a regulação positiva de c-Myc contribui para a produção de citocinas pró-inflamatórias em ratos com nefropatia diabética, através do aumento da expressão da proteína cinase 1 associada ao receptor de interleucina-1 (IRAK1), um mediador importante na inflamação endotelial (Hou et al., 2022).

A hiperglicemia crônica, característica do diabetes, tem sido associada à redução da secreção de insulina estimulada pela glucose e da biossíntese de insulina em células β pancreáticas. Nesse contexto, sugeriu-se que o c-Myc exerce um efeito inibitório na transcrição do gene da insulina, contribuindo para a deterioração funcional dessas células. Além disso, a expressão de c-Myc é induzida por altos níveis de glucose, mas essa indução pode ser suprimida pelo uso de inibidores específicos da proteína cinase C (PKC), possivelmente ativada em resposta ao stress oxidativo (Kaneto et al., 2002). Estes dados reforçam a complexa interação entre c-Myc, stress metabólico e inflamação, destacando seu papel na patogênese do diabetes.

O gene Myc apresentou maior expressão em células que tiveram a indução da montagem dos cílios antes da adição de glucose (Grupo 1), em comparação com as células que passaram pela adição de glucose antes da indução da montagem dos cílios (Grupo 2). Na concentração de 25 mM de glucose, observou-se que as células do Grupo 1, tanto ciliadas quanto não ciliadas, apresentaram maior expressão de Myc. Em contrapartida, no Grupo 2, nenhuma expressão significativa foi detectada. Já na concentração de 20 mM + 5 mM de glucose, a maior expressão de Myc ocorreu nas células não ciliadas do Grupo 1.

Com base nesses resultados, formulamos a hipótese de que a indução precoce de cílios pode estar relacionada à manutenção da expressão de Myc, possivelmente conferindo uma proteção ou estabilização proporcionada pelos cílios em condições de stress metabólico. Esses achados sugerem um papel potencial dos cílios primários na regulação de respostas celulares ao stress metabólico, destacando a necessidade de estudos adicionais para explorar os mecanismos.

O gene *Mitf* desempenha um papel crucial no desenvolvimento, na estrutura e na função ocular. No RPE, o *Mitf* é fortemente expresso, e mutações nesse gene podem levar à hiperproliferação das células, culminando na ausência de pigmentação e afetando a neuroretina, especialmente na região dorsal (García-Llorca et al., 2024). Esta proteína também atua em conjunto com fatores de transcrição como Pax, Otx e Vsx, que desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento ocular e na especificação do RPE (García-Llorca et al., 2024). Além disso, o *Mitf* é produzido tanto no pâncreas em desenvolvimento quanto nos ilhéus adultos (Ninov et al., 2013).

Estudos em modelos animais revelaram que a perda de função do *Mitf* resulta em níveis mais baixos de glucose no sangue, quando comparados a animais tipo-selvagem.

Além disso, mutações de perda de função do *Mitf* demonstraram melhora na tolerância à glucose e aumento na secreção de insulina, sem, contudo, alterar a massa de células β pancreáticas (Ninov et al., 2013). Esses resultados destacam o papel multifacetado do *Mitf* na regulação metabólica e na fisiologia ocular, sublinhando sua relevância em diversos contextos celulares e metabólicos.

O *Mitf* parece exercer um duplo papel, atuando tanto como ativador transcricional quanto como repressor, uma vez que ativa genes essenciais para a pigmentação celular, mas a expressão ectópica de *Mitf* pode inibir a transcrição de *Pax6* no olho em desenvolvimento. Além disso, *Pax6* e *Mitf* atuam cooperativamente para reprimir genes-alvo comuns no RPE (Bharti et al., 2012).

Em relação aos resultados do presente estudo, o *Mitf* apresentou expressão mantida em níveis baixos em células expostas a 5 mM de glucose, independentemente de serem ciliadas ou não e do grupo experimental.

Entretanto, a concentração de 20 mM + 5 mM de glucose resultou em um aumento na expressão de *Mitf* em células não ciliadas do grupo 2 (modificação de glucose antes da indução da montagem dos cílios), superando a expressão observada no grupo 1.

Já na concentração de 25 mM de glucose, observou-se um aumento significativo da expressão de *Mitf* tanto em células ciliadas do grupo 1 quanto em células não ciliadas do grupo 2.

Esses resultados sugerem que a presença de cílios primários pode estabilizar os níveis de *Mitf* em condições de stress metabólico. No entanto, o aumento significativo observado em células não ciliadas do grupo 2 aponta para a influência de vias alternativas ou fatores externos, que podem modular a expressão de *Mitf* de forma independente dos cílios primários.

O fator de transcrição *Otx2* participa no desenvolvimento da retina, sendo necessário na formação de fotorreceptores e células bipolares. Descobertas sobre o *Otx2* demonstraram que a rede reguladora de genes que controla a ativação de *Otx2* é flexível e resistente a perturbações, sendo esse mecanismo importante para garantir que a retina forme um número suficiente de bastonetes, cones e células bipolares *Otx2* + (Kaufman, 2021). No presente estudo, não foi possível detectar a expressão de *Otx2* em nenhuma das condições avaliadas, independentemente das concentrações de glucose ou do grupo experimental (1 ou 2).

Essa ausência de detecção pode ser atribuída a diferentes fatores. Primeiro, os níveis de expressão de Otx2 podem estar abaixo do limite de detecção do PCR, sugerindo que a expressão desse gene nas células utilizadas seja muito baixa, o que dificulta sua quantificação pelo método empregado, especialmente se o tecido ou célula de estudo não for altamente especializado em funções retiniais. Além disso, o Otx2 pode estar regulado negativamente ou mesmo inibido devido ao impacto de fatores como o stress metabólico induzido pela hiperglicemia, alterações na sinalização celular ou a ativação de vias concorrentes que reprimem sua expressão.

Outro aspecto relevante é a especificidade celular, já que a expressão de Otx2 está geralmente associada a tipos celulares específicos da retina. Se as células utilizadas no estudo, como as do RPE, não expressarem naturalmente este gene, isso poderia justificar a ausência de detecção.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

A associação entre obesidade, diabetes tipo 2 e diversos tipos de cancro já foi estabelecida em diversos estudos, tanto epidemiológicos como em estudos que recorreram à utilização de técnicas mais recentes de biologia molecular. O estado hiperglicémico crónico propicia respostas pró-inflamatórias e estimula o fluxo metabólico intracelular, que ativa certas vias de sinalização e inicia o avanço dessas patologias.

Uma das vias de sinalização importantes neste processo patológico, mas que se encontra pouco estudada é a via de sinalização Wnt. Esta via é multifacetada desempenhando também um papel importante na inflamação, no stress oxidativo e na angiogénese em diversos tecidos, incluindo as células constituintes do olho humano.

Num elevado número de patologias da retina, responsáveis pela perda de visão, foram encontradas alterações em genes que codificam proteínas associadas aos cílios primários. Esses organelos sensoriais baseados em microtúbulos e presentes na maioria de células eucarióticas são cruciais para muitos processos fisiológicos e para o desenvolvimento.

Com relação a quantificação de cílios primários nos distintos grupos (Grupo 1 e Grupo 2) e os subgrupos com concentrações de a 5 mM, 25 mM e 20+ 5 mM de glucose não observamos diferenças significativas, independente da concentração de glucose ou período de indução de cílios. A fase do ciclo celular poderia ser um fator de interferência para que este resultado não fosse tão expressivo. Entretanto, houve a manutenção da capacidade dessas células estudadas em montar os cílios.

Os resultados preliminares obtidos neste trabalho demonstraram que a quantificação de DVL1 nuclear não apresentou uma diferença significativa quando comparamos as células pertencentes ao Grupo 1 e Grupo 2, independente das concentrações de glucose. No entanto a análise da quantificação de DVL1 do Grupo 1, mostra que na concentração de glucose a 25 mM, as células ciliadas apresentam maior quantidade de DVL1 nuclear. O facto de que estas células terem sido induzidas a formar cílios antes da suplementação com glucose, pode estar relacionado com o aumento da localização nuclear do DVL1

O estudo da expressão de genes alvo do DVL1 por RT-PCR, embora preliminar, mostrou-se promissor uma vez que sugere que os cílios primários ao modelarem os níveis nucleares de DVL1 estão de fato a interferir com a regulação de genes alvos como é o caso do Myc e do Mitf, mas não do Otx2, que neste caso funciona como controlo

negativo desta análise. Seria de esperar esta diferença numa primeira análise os resultados parecem bastante coerentes uma vez que o fator de transcrição Myc, desempenha um importante papel no desenvolvimento de doenças metabólicas que poderão estar correlacionadas com stress metabólico como o gerado por elevados níveis de glucose. Por outro lado, o gene Mitf é essencial para desenvolvimento e manutenção da estrutura e função ocular a qual poderá facilmente ser afetada por stress oxidativo causado por elevados níveis de glucose.

A ausência de expressão nas células RPE-1 do gene Otx2 poderá fazer sentido uma vez que se a estas células são diferenciadas e a proteína Otx2 participa no desenvolvimento da retina. No entanto, teremos de excluir a hipótese de ausência de deteção de expressão ser o resultado de uma falha técnica. Neste caso teríamos de utilizar células desdiferenciadas onde se sabe que o gene é expresso e testar as condições de PCR usadas por nós no estudo na expressão do gene Otx2. Sumarizando, com o presente estudo pudemos obter evidências de que o cílio primário possui um papel na manutenção de homeostasia das células hTERT-RPE-1 quando expostas a níveis elevados de glucose. A presença do cílio e os dados encontrados no nosso estudo, ao avaliar a proteína DVL1 da via de sinalização Wnt sugerem que o cílio interfere na regulação da localização nuclear do DVL1 potencialmente afetando a expressão de genes alvo do DVL1 como é o caso dos genes Myc e Mitf.

Os resultados obtidos neste trabalho poderão vir a ser desenvolvidos se um conjunto de experiências fosse delineado, como por exemplo aquelas que a seguir se indicam:

1. A quantificação dos níveis de DVL1 total e presente na fração citosólica e nuclear, através de Western-blot também poderia ser esclarecedor e complementar ao presente estudo;

2. Na avaliação da via de sinalização Wnt dependente de β -catenina, por exemplo, a quantificação nuclear e perinuclear de β -catenina com técnicas de Western-blot e Imunofluorescência poderia complementar e correlacionar com os resultados obtidos da avaliação de DVL1.

- 3- A realização de mais ensaios com a técnica de RT-PCR seria primordial para a obtenção de um resultado mais sólido.

O presente trabalho mostra-nos que estamos ainda longe de compreender a intricada regulação desencadeada por elevados níveis de glucose e como os cílios primários podem participar neste processo. No entanto, este estudo abre a porta para o

desenvolvimento de estudos posteriores onde a avaliação e melhor compreensão deste papel possa vir no futuro a influenciar o desenvolvimento de novos modelos terapêuticos onde se incluam o papel dos cílios primários e a sua modulação de vias metabólicas como é o caso da via Wnt.

REFERÊNCIAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science. The Endoplasmic

Aloke, C., et al. (2022). Current advances in the management of diabetes mellitus. *Biomedicines*, 10(10), 2436. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102436>

American Diabetes Association. (2017). Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*, 41(Suppl. 1), S13–S27. <https://doi.org/10.2337/dc18-s002>

Anvarian, Z., et al. (2019). Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 15(4), 199–219. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0116-9>

Ashcroft, F. M., & Rorsman, P. (2012). Diabetes mellitus and the β cell: The last ten years. *Cell*, 148(6), 1160–1171. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.010>

Axelrod, J. D. (2020). Planar cell polarity signaling in the development of left-right asymmetry. *Current Opinion in Cell Biology*, 62, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.09.002>

Bancroft, J. D. (2013). Safety and ergonomics in the laboratory. In *Theory and Practice of Histological Techniques* (7th ed.). <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-4226-3.00002-0>

Bengoa-Vergniory, N., & Kypta, R. M. (2015). Canonical and noncanonical Wnt signaling in neural stem/progenitor cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(21), 4157–4172. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2028-6>

Bergmann, C., et al. (2008). Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia. *American Journal of Human Genetics*, 82(4), 959–970. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.02.017>

Bharti, K., Gasper, M., Ou, J., Brucato, M., Clore-Gronenborn, K., Pickel, J., & Arnheiter, H. (2012). A regulatory loop involving PAX6, MITF, and WNT signaling controls retinal pigment epithelium development. *PLoS genetics*, 8(7), e1002757. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002757>

Boavida, J. M. (2016). Diabetes: Uma emergência de saúde pública e de políticas da saúde. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 34(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.rpsp.2016.03.001>

Bowman, R. J., & Levitt, D. G. (1977). Polyol permeability of the human red cell: Interpretation of glucose transport in terms of a pore. *Biochimica et Biophysica Acta*, 466, 1–10.

Broekhuis, J. R., Leong, W. Y., & Jansen, G. (2013). Regulation of cilium length and intraflagellar transport. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 303, 101–138. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407697-6.00003-9>

Chen, H., et al. (2021). Hyperglycemia promotes pancreatic cancer initiation and progression by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 21(18), 2592–2602. <https://doi.org/10.2174/1871520621666210201095613>

Chen, J., Stahl, A., Krah, N. M., Seaward, M. R., Dennison, R. J., Sapienza, P., Hua, J., Hatton, C. J., Juan, A. M., Aderman, C. M., Willett, K. L., Guerin, K. I., Mammoto, A., Campbell, M., & Smith, L. E. (2011). Wnt signaling mediates pathological vascular growth in proliferative retinopathy. *Circulation*, 124(17), 1871–1881. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.040337>

Chen, J., Ning, C., Mu, J., et al. (2021). Role of Wnt signaling pathways in type 2 diabetes mellitus. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 476, 2219–2232. <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04086-5>

Chen, Q., & Ma, J. X. (2017). Canonical Wnt signaling in diabetic retinopathy. *Vision research*, 139, 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2017.02.007>

Cho, J. H., et al. (2022). Islet primary cilia motility controls insulin secretion. *Science Advances*, 8(38), eabq8486. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abq8486>

Das, B., Das, M., Kalita, A., & Baro, M. R. (2021). The role of Wnt pathway in obesity-induced inflammation and diabetes: A review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 20(2), 1871–1882. <https://doi.org/10.1007/s40200-021-00862-8>

Davidson, G., & Niehrs, C. (2010). Emerging links between CDK cell cycle regulators and Wnt signaling. *Trends in cell biology*, 20(8), 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.05.002>

Dludla, P. V., et al. (2023). Pancreatic β -cell dysfunction in type 2 diabetes: Implications of inflammation and oxidative stress. *World Journal of Diabetes*, 14(3), 130–146. <https://doi.org/10.4239/wjd.v14.i3.130>

Donaldson, J. G. (2015). Immunofluorescence staining. *Current Protocols in Cell Biology*, 69, 4.3.1–4.3.7. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0403s69>

Emerson, M. M., & Cepko, C. L. (2011). Identification of a retina-specific Otx2 enhancer element active in immature developing photoreceptors. *Developmental Biology*, 360(1), 241–255. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.09.012>

Farrel, R. E. Jr. (2010). *RNA methodologies: A laboratory guide for isolation and characterization* (4th ed.). Elsevier, Academic Press.

Ford, B. D., & Selvas, A. (2018). Primary cilia and cell cycle control. *Current Opinion in Cell Biology*, 51, 116–123.

Gao, C., & Chen, Y. G. (2010). Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cellular Signalling*, 22(5), 717–727. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.11.021>

Gao, X., et al. (2016). Correlation of increased intravitreal Wnt3a with vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Retina*, 36(4), 812–818. <https://doi.org/10.1097/iae.0000000000000784>

García-Jiménez, C., García-Martínez, J. M., Chocarro-Calvo, A., & De la Vieja, A. (2013). A new link between diabetes and cancer: enhanced WNT/ β -catenin signaling by high glucose. *Journal of molecular endocrinology*, 52(1), R51–R66. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0152>

García-Llorca, A., & Eysteinnsson, T. (2024). The Microphthalmia-Associated Transcription Factor (MITF) and Its Role in the Structure and Function of the Eye. *Genes*, 15(10), 1258. <https://doi.org/10.3390/genes15101258>

Gerdes, J. M., & Katsanis, N. (2008). Ciliary function and Wnt signal modulation. *Current Topics in Developmental Biology*, 85, 175–195. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)00807-7](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)00807-7)

Gerdes, J. M., et al. (2007). Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nature Genetics*, 39(11), 1350–1360. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.12>

Gerdes, J. M., et al. (2014). Ciliary dysfunction impairs beta-cell insulin secretion and promotes development of type 2 diabetes in rodents. *Nature Communications*, 5, 5308. <https://doi.org/10.1038/ncomms6308>

Ghareghomi, S., Arghavani, P., Mahdavi, M., Khatibi, A., García-Jiménez, C., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2024). Hyperglycemia-driven signaling bridges between diabetes and cancer. *Biochemical Pharmacology*, 229, 116450. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116450>

Gomez-Orte, E., Saenz-Narciso, B., Moreno, S., & Cabello, J. (2013). Multiple functions of the non-canonical Wnt pathway. *Trends in Genetics*, 29(8), 545–553. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.003>

Gould, N. R., et al. (2021). The cytoskeleton and connected elements in bone cell mechano-transduction. *Bone*, 149, 115971. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.115971>

Harreiter, J., & Roden, M. (2019). Diabetes mellitus – Definition, classification, diagnosis, screening, and prevention (Update 2019). *Wiener Klinische Wochenschrift*, 131(S1), 6–15. <https://doi.org/10.1007/s00508-019-1450-4>

Hildebrandt, F., Benzing, T., & Katsanis, N. (2011). Ciliopathies. *The New England Journal of Medicine*, 364(16), 1533–1543. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1010172>

Hoey, D. A., Downs, M. E., & Jacobs, C. R. (2012). The mechanics of the primary cilium: an intricate structure with complex function. *Journal of Biomechanics*, 45(1), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2011.08.008>

Hou, W., Lu, L., Li, X., Sun, M., Zhu, M., & Miao, C. (2022). c-Myc participates in high glucose-mediated endothelial inflammation via upregulation of IRAK1 expression in diabetic nephropathy. *Cellular signalling*, 92, 110263. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110263>

Hohmann, T., & Dehghani, F. (2019). The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells*, 8(4), 362. <https://doi.org/10.3390/cells8040362>

Jing, T., et al. (2023). Effect of dietary approaches on glycemic control in patients with type 2 diabetes: a systematic review with network meta-analysis of randomized trials. *Nutrients*, 15(14), 3156. <https://doi.org/10.3390/nu15143156>

Kahn, R., & Davidson, M. B. (2014). The reality of type 2 diabetes prevention. *Diabetes Care*, 37(4), 943–949. <https://doi.org/10.2337/dc13-1954>

Kaneto, H., Suzuma, K., Sharma, A., Bonner-Weir, S., King, G. L., & Weir, G. C. (2002). Involvement of protein kinase C beta 2 in c-myc induction by high glucose in pancreatic beta-cells. *The Journal of biological chemistry*, 277(5), 3680–3685. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109647200>

Kaufman, M. L., Goodson, N. B., Park, K. U., Schwanke, M., Office, E., Schneider, S. R., Abraham, J., Hensley, A., Jones, K. L., & Brzezinski, J. A. (2021). Initiation of Otx2 expression in the developing mouse retina requires a unique enhancer and either Ascl1 or Neurog2 activity. *Development (Cambridge, England)*, 148(12), dev199399. <https://doi.org/10.1242/dev.199399>

Kluth, O., et al. (2019). Decreased expression of cilia genes in pancreatic islets as a risk factor for type 2 diabetes in mice and humans. *Cell Reports*, 26(11), 3027–3036.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.056>

Ko H. W. (2012). The primary cilium as a multiple cellular signaling scaffold in development and disease. *BMB reports*, 45(8), 427–432. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2012.45.8.167>

Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), 68–75. <https://doi.org/10.4161/org.4.2.5851>

Labat-de-Hoz, L., et al. (2021). A model for primary cilium biogenesis by polarized epithelial cells: Role of the midbody remnant and associated specialized membranes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 622918. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.622918>

Lakkaraju, A., et al. (2020). The cell biology of the retinal pigment epithelium. *Progress in Retinal and Eye Research*, 78, 100846. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100846>

Lattanzio, S. (2014). Circulating dickkopf-1 in diabetes mellitus: Association with platelet activation and effects of improved metabolic control and low-dose aspirin. *Journal of the American Heart Association*, 3(4), e001000. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001000>

Lee, K. H. (2020). Involvement of Wnt signaling in primary cilia assembly and disassembly. *The FEBS Journal*, 287(23), 5027–5038. <https://doi.org/10.1111/febs.15579>

Lee, Y. N., Gao, Y., & Wang, H. Y. (2008). Differential mediation of the Wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1, -2, and -3. *Cellular Signalling*, 20(2), 443–452. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.11.005>

Li, M., et al. (2023). Updates on RPE cell damage in diabetic retinopathy (Review). *Molecular Medicine Reports*, 28(4). <https://doi.org/10.3892/mmr.2023.13072>

Liu, J., Xiao, Q., Xiao, J., Niu, C., Li, Y., Zhang, X., Zhou, Z., Shu, G., & Yin, G. (2022). Wnt/ β -catenin signalling: Function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 3. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>

Logan, C. Y., & Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 781–810. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126>

MacDonald, B. T., & He, X. (2012). Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/ β -catenin signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12), a007880. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007880>

Magliano, D. J., Boyko, E. J., & Atlas, I. D. (2021). What is diabetes? In: Magliano, D.J., & Boyko, E.J. (Eds.), *IDF Diabetes Atlas* (10th ed., pp. 54–61). International Diabetes Federation.

Maugeri, G., et al. (2017). Nicotine promotes blood retinal barrier damage in a model of human diabetic macular edema. *Toxicology in Vitro*, 44, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.07.003>

May-Simera, H. L., & Kelley, M. W. (2012). Cilia, Wnt signaling, and the cytoskeleton. *Cilia*, 1(1), 7. <https://doi.org/10.1186/2046-2530-1-7>

Mehta, S., Hingole, S., & Chaudhary, V. (2021). Emerging mechanisms of Wnt secretion and signaling in development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 714746. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.714746>

Mill, P., Christensen, S., & Pedersen, L. B. (2023). Primary cilia as dynamic and diverse signalling hubs in development and disease. *Nature Reviews Genetics*, 24(7), 421–441. <https://doi.org/10.1038/s41576-023-00587-9>

Morthorst, S. K., Christensen, S. T., & Pedersen, L. B. (2018). Regulation of ciliary membrane protein trafficking and signalling by kinesin motor proteins. *The FEBS Journal*, 285(24), 4535–4564. <https://doi.org/10.1111/febs.14583>

Ninov, N., Hesselton, D., Gut, P., Zhou, A., Fidelin, K., & Stainier, D. Y. (2013). Metabolic regulation of cellular plasticity in the pancreas. *Current biology : CB*, 23(13), 1242–1250. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.037>

Ng, L., et al. (2019). Wnt signaling in disease. *Cells*, 8(8), 826. <https://doi.org/10.3390/cells8080826>

Nguyen, H., Lee, S., & Li, Y. (2022). Selective activation of the Wnt-signaling pathway as a novel therapy for the treatment of diabetic retinopathy and other retinal vascular diseases. *Pharmaceutics*, 14(11), 2476. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112476>

Nie, X., et al. (2021). The complex role of Wnt ligands in type 2 diabetes mellitus and related complications. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(14), 6479–6495. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16663>

Ning, K., et al. (2023). Cilia-associated wound repair mediated by IFT88 in retinal pigment epithelium. *Scientific Reports*, 13(1), 8205. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35099-3>

Oh, E. C., Vasanth, S., & Katsanis, N. (2015). Metabolic regulation and energy homeostasis through the primary cilium. *Cell Metabolism*, 21(1), 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.11.019>

Pablos, M., et al. (2022). Primary cilia in pancreatic β - and α -cells: Time to revisit the role of insulin-degrading enzyme. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 922825. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.922825>

Patel, M. M., & Tsiokas, L. (2021). Insights into the regulation of ciliary disassembly. *Cells*, 10(11), 2977. <https://doi.org/10.3390/cells10112977>

Peterson, C. W., & Ayer, D. E. (2011). An extended Myc network contributes to glucose homeostasis in cancer and diabetes. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 16(6), 2206–2223. <https://doi.org/10.2741/3848>

Pruller, J., Figeac, N., & Zammit, P. S. (2022). DVL1 and DVL3 require nuclear localisation to regulate proliferation in human myoblasts. *Scientific Reports*, 12(1), 8388. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10536-x>

Qin H. (2012). Regulation of intraflagellar transport and ciliogenesis by small G proteins. *International review of cell and molecular biology*, 293, 149–168. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394304-0.00010-5>

Ridley, A., & Heald, R. (2011). Cell structure and dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.12.003>

Rizza, R. A. (2010). Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy. *Diabetes*, 59(11), 2697–2707. <https://doi.org/10.2337/db10-1032>

Rodrigues Oliveira, S. M., Rebocho, A., Ahmadpour, E., Nissapatorn, V., & de Lourdes Pereira, M. (2023). Type 1 diabetes mellitus: A review on advances and challenges in creating insulin producing devices. *Micromachines*, 14(1), 151. <https://doi.org/10.3390/mi14010151>

Rorsman, P., & Ashcroft, F. M. (2018). Pancreatic β -cell electrical activity and insulin secretion: Of mice and men. *Physiological Reviews*, 98(1), 117–214. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2017>

Rosselot, C., et al. (2021). The many lives of Myc in the pancreatic β -cell. *The Journal of Biological Chemistry*, 296, 100122. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.011149>

Sanabria de la Torre, R. (2022). Molecular mechanisms of Wnt signaling modulation in retinopathy. *Experimental Eye Research*, 219, 108917. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2022.108917>

Sanabria-de la Torre, R., et al. (2022). The contribution of Wnt signaling to vascular complications in type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 6995. <https://doi.org/10.3390/ijms23136995>

Satir, P., & Christensen, S. T. (2007). Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annual Review of Physiology*, 69(1), 377–400. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236>

Sharma, M., Castro-Piedras, I., Simmons, G. E., & Pruitt, K. (2018). Dishevelled: a masterful conductor of complex Wnt signals. *Cellular Signalling*, 47, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.03.004>

Sharma, M., Castro-Piedras, I., Rodgers, A. D., & Pruitt, K. (2021). Genomic profiling of DVL-1 and its nuclear role as a transcriptional regulator in triple negative breast cancer. *Genes & cancer*, 12, 77–95. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.217>

Sharma, S., et al. (2022). Possible role of Wnt signaling pathway in diabetic retinopathy. *Current Drug Targets*, 23(15), 1372–1380. <https://doi.org/10.2174/1389450123666220301110140>

Sharma, S., Kaur, H., Chauhan, A., & Mehta, P. (2022). Possible role of Wnt signaling pathway in diabetic retinopathy. *Current Drug Targets*, 23(15), 1372–1380. <https://doi.org/10.2174/1389450123666220301110140>

Simons, M., et al. (2005). Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between different Wnt signaling pathways. *Nature Genetics*, 37(5), 537–543. <https://doi.org/10.1038/ng1552>

Spence, J. R., et al. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*, 470(7332), 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature09691>

Stefano, G. B., & Esch, T. (2016). The inflammatory process in diabetes and its complications. *Medical Science Monitor*, 22, 13–21. <https://doi.org/10.12659/MSM.895964>

Strauss O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews*, 85(3), 845–881. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2004>

Sun, C., Zhou, J., & Meng, X.-Q. (2021). Primary cilia in retinal pigment epithelium development and diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(19), 9084–9088. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16882>

Sung, C. H., & Leroux, M. R. (2013). The roles of evolutionarily conserved functional modules in cilia-related trafficking. *Nature Cell Biology*, 15(12), 1387–1397. <https://doi.org/10.1038/ncb2888>

Suvarna, S. K., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2013). *Bancroft's theory and practice of histological techniques* (7th ed.). Churchill Livingstone.

Tobias, D. K., et al. (2023). Second international consensus report on gaps and opportunities for the clinical translation of precision diabetes medicine. *Nature Medicine*, 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02502-5>

Vaisse, C., Reiter, J. F., & Berbari, N. F. (2017). Cilia and obesity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(7), a028217. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028217>

Van Amerongen, R., & Nusse, R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*, 136(19), 3205–3214. <https://doi.org/10.1242/dev.033910>

Volpe, C. M. O., Villar-Delfino, P. H., Dos Anjos, P. M. F., & Nogueira-Machado, J. A. (2018). Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell death & disease*, 9(2), 119. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0135-z>

Volta, F., & Gerdes, J. M. (2017). The role of primary cilia in obesity and diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1391(1), 71–84. <https://doi.org/10.1111/nyas.13216>

Vuong, L. T., & Mlodzik, M. (2023). The complex relationship of Wnt-signaling pathways and cilia. *Current Topics in Developmental Biology*, 95–125. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2023.09.002>

Westenskow, P., Piccolo, S., & Fuhrmann, S. (2009). Beta-catenin controls differentiation of the retinal pigment epithelium in the mouse optic cup by regulating *Mitf* and *Otx2* expression. *Development*, 136(15), 2505–2510. <https://doi.org/10.1242/dev.032136>

Wheway, G., Nazlamova, L., & Hancock, J. T. (2018). Signaling through the primary cilium. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00008>

Yadav, R., & Patel, B. (2024). Insights on effects of Wnt pathway modulation on insulin signaling and glucose homeostasis for the treatment of type 2 diabetes mellitus: Wnt activation or Wnt inhibition? *International Journal of Biological Macromolecules*, 261, 129634. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129634>

Yang, S., Zhou, J., & Li, D. (2021). Functions and diseases of the retinal pigment epithelium. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 727870. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.727870>

Yu, M., et al. (2024). The evolving roles of Wnt signaling in stem cell proliferation and differentiation, the development of human diseases, and therapeutic opportunities. *Genes & Diseases*, 11(3), 101026. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.04.042>

Zallen, J. A. (2007). Planar polarity and tissue morphogenesis. *Cell*, 129(6), 1051–1063. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.050>

Zhang, S., Li, Y., Wu, Y., Shi, K., Bing, L., & Hao, J. (2012). Wnt/ β -catenin signaling pathway upregulates c-Myc expression to promote cell proliferation of P19 teratocarcinoma cells. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 295(12), 2104–2113. <https://doi.org/10.1002/ar.22592>

Zhou, P., & Zhou, J. (2020). The primary cilium as a therapeutic target in ocular diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 977. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00977>