



2012

Aldosterona e seus receptores: novos alvos para a prevenção da morte de neurónios na RD

Mariana Correia



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Aldosterona e seus receptores: novos alvos para a prevenção da morte de neurónios na retinopatia diabética

Mariana Bastos Correia

2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Aldosterona e seus receptores: novos alvos para a prevenção da morte de neurónios na retinopatia diabética

Dissertação apresentada à Universidade de
Coimbra para cumprimento dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre
em Bioquímica, realizada sob a orientação
científica do Professor Doutor Paulo Santos
(Universidade de Coimbra)

Mariana Bastos Correia

2012

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada coisa a Lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

Ricardo Reis
Heterónimo de Fernando Pessoa

Agradecimentos

É chegada a hora de agradecer a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, sem os quais a concretização desta e outras etapas seria impossível.

Aos meus pais, ao meu irmão, enfim a toda a família, obrigado pelo esforço que fizeram ao longo de todos estes anos, por terem estado sempre ao meu lado, por nunca me deixarem baixar os braços e desistir. Obrigado também por me acompanharem em todos os momentos, mesmos naqueles em que a “viagem é longa” e o destino incerto. Acima de tudo obrigado por existirem e fazerem sempre parte da minha vida!

Ao Professor Doutor Paulo Santos, por durante esta etapa me ter prestado todo o apoio e disponibilidade constante ao longo do ano, pela valiosa transmissão de conhecimentos, pela amizade e o carinho, proporcionando-me um bem-estar imprescindível para a execução deste trabalho.

À Joana por toda a disponibilidade demonstrada e orientação, tão precisa e importante, na elaboração deste trabalho. Muito obrigado pelas palavras sábias em momentos cruciais.

Ao Gabriel por toda a disponibilidade demonstrada, por ter sempre uma opinião a dar-me e soluções para todos os problemas com que me fui deparando durante a realização deste trabalho.

A todos os colegas do grupo de Neurogênese e Neuroendocrinologia, pelo apoio no laboratório e por me terem recebido da melhor forma possível.

Índice

Agradecimentos	ii
Índice	iii
Abreviaturas.....	v
Abstract.....	1
Resumo	3
Capítulo 1 - Introdução	5
1.1 - Constituintes celulares da retina	6
1.2 - Retinopatia diabética	7
1.3 - Aldosterona.....	10
1.4 - Receptores mineralocorticóides (MCR)	11
1.5 - Sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS).....	13
1.6 - Modelação farmacológica do RAAS	19
1.7 - Objectivos.....	21
Capítulo 2 - Materiais e métodos	22
2.1- Materiais	23
2.2 - Soluções e Fármacos usados	24
2.3 - Modelo celular.....	24
2.3.1 - Extractos celulares totais.....	25
2.4 - Modelo animal.....	25
2.4.1- Extractos totais de retina	26
2.5 - SDS-PAGE e Western Blot	26
2.6 - Estudos de viabilidade celular	28
2.6.1 - Ensaio do MTT	28
2.6.2 - Ensaio do PI	29
Capítulo 3 - Resultados	31
3.1- Efeito da diabetes/hiperglicemia nos receptores mineralocorticoides.....	32

3.2- Efeito da diabetes/hiperglicemia na aldosterona sintetase	34
3.3- Efeito da diabetes nos níveis da aldosterona	35
3.4- Efeito do antagonismo dos MCR na morte celular induzida pela hiperglicemia	36
3.5- Efeito do antagonismo dos MCR no tipo de morte celular induzida pela hiperglicemia	41
Capítulo 4 - Discussão	44
4.1- Discussão.....	45
4.1.1- Efeito da diabetes/hiperglicemia nos receptores mineralocorticóides.....	45
4.1.2- Efeito da diabetes/hiperglicemia na aldosterona sintetase	47
4.1.3- Efeito do antagonismo dos MCR na morte celular induzida pela hiperglicemia	48
4.1.4- Efeito do antagonismo dos MCR no tipo de morte celular induzida pela hiperglicemia	51
Capítulo 5 - Conclusão	53
5.1- Conclusão	54
Capítulo 6 - Perspectivas futuras	55
6.1- Perspectivas futuras.....	56
Capítulo 7 - Referências	58
7.1- Bibliografia.....	59

Abreviaturas

ACTH - Hormona adrenocorticotrópica

AGE – Produtos finais da glicolização avançada

Ang I – Angiotensina I

Ang II – Angiotensina II

APS – Persulfato de amónia

AT1R – Receptor da angiotensina do tipo 1

AT2R - Receptor da angiotensina do tipo 2

BCA - Ácido bicinconínico

CAPS – Ácido N-ciclohexilpropanosulfónico

CLAP - Quimoestatina, pepstatina, antipaina e leupeptina

CMF - Solução Hank's livre de Ca^{2+} e Mg^{2+}

DMSO - Dimetilsulfoxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DOC - 11-desoxicorticosterona

DTT - Ditioneitol

ECA – Enzima de conversão da angiotensina

ECF – Substrato quimiofluorescente

EGFR – Receptor do factor de crescimento epidérmico

ENaC – Canal de sódio

ERK – Cinase de proteínas regulada por sinais extracelulares

FBS – Soro fetal de bovino

GR – Receptor glucocorticoide

HEPES – Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular 1

IECA – Inibidor da enzima de conversão de angiotensinogénio

IL-6 – Interleucina 6

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos 1

MCR – Receptor mineralocorticóide

MEM - Meio de Eagle modificado

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazólio

NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina

OIR – Retinopatia induzida por oxigénio

PAI-1 – Inibidor do activador de plasmogénio 1

PBS – Tampão salino fosfato

PI – Iodeto de propídeo

PVDF - Membrana de polivinildieno

RAAS – Sistema renina-angiotensina-aldosterona

RD – Retinopatia diabética

SDS – Sulfato dodecil de sódio

SDS-PAGE – SDS-electroforese em gel de poliacrilamida

Sgk – Serina-trionina cinase

SM – Síndrome metabólica

SNS – Sistema nervoso simpático

STZ - Estreptozotocina

TBS-T – Tampão Tris salino com 0,1% de Tween

TEMED - Tetrametiletenodiamina

TNF- α – Factor de necrose tumoral alfa

Abstract

Diabetic retinopathy (DR) is the main cause of blindness of people in working age. The prevalence of DR increases with duration of diabetes, and nearly all persons with type 1 diabetes and more than 60% of those with type 2 have some retinopathy after 20 years. Since a large percentage of patients diagnosed with diabetes end up developing retinopathy, considerable effort is being invested on prophylactic interventions. Early work focused on improving glycemic control; however, clinical observations demonstrated that blood pressure is an important modifiable risk factor for diabetic retinopathy and that reducing high blood pressure decreased significantly the development and progression of retinopathy both type 1 and type 2 diabetic patients (Simó R e Hernández C, 2009). Therefore, have been developed studies on the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), system involved in the control blood pressure, blood volume and electrolyte balance.

Over the last years has been demonstrated that some components of the RAAS are expressed in different constituents of the eye (Fletcher EL et. al., 2010). One of the RAAS components is angiotensin II (Ang II). Previous studies have shown that the eye has the ability to form Ang II (Fletcher et. al., 2010), and the effects of Ang II in the blood vessels of the retina are also known. Ang II causes vasoconstriction of retinal arterioles, capillaries and venules via actions on AT1R (Ang II type 1 receptor) (Kawamura et. al., 2004; Rokwood et. al., 1987; Schofelder et. al., 1998). However, the role played by aldosterone, the last component of the RAAS, in the development of retinal complications associated with diabetes has been poorly studied.

Thus, the main purpose of this work was to study the effect of diabetes / hyperglycemia in the synthesis and action of aldosterone in the retina, in particular the effect of the antagonism of the mineralocorticoid receptor (MCR) with eplerenone in the prevention of retinal neuronal death induced by diabetes / hyperglycemia that occurs in the early stages of DR, even before the detection of vascular lesions.

In this study we observed not only the presence of the MCR and aldosterone synthase in the retina, but also an increase in total protein levels of aldosterone synthase and MCR under hyperglycemic conditions in retinal cell cultures, and in diabetic animals. We have found that aldosterone can be synthesized in the retina, and in addition, we have confirmed its plasma levels are elevated in diabetic animals. This allows us to

induce that there is a retinal site and system of aldosterone action that is affected by diabetes / hyperglycemia. The viability and cellular death studies have demonstrated the involvement of the renin-angiotensin-aldosterone system in retinal neuronal death. In these studies we observed that the mineralocorticoid receptor antagonism prevent neuronal death by the process of necrosis of the retina and it occurs in the early stages of diabetic retinopathy.

In summary, this study shows that there is a system of aldosterone action in the retina, that this system is affected by diabetes / hyperglycemia and the antagonism of MCR with eplerenone can be a potential therapeutic target for the treatment of diabetic retinopathy.

Keywords: Diabetic retinopathy; renin-angiotensin-aldosterone system; aldosterona; aldosterone synthase; mineralocorticoid receptor; hyperglycemia.

Resumo

A retinopatia diabética (RD) é a principal causa de cegueira em pessoas em idade de trabalhar. A prevalência da RD aumenta com a duração da diabetes, quase todas as pessoas com diabetes do tipo 1 e mais de 60% das pessoas com o tipo 2 têm retinopatia após 20 anos de diabetes. Como uma grande parte das pessoas que têm diabetes tendem a desenvolver retinopatia, esforços consideráveis têm sido investidos em intervenções profiláticas. A melhoria do controle glicémico foi o primeiro factor a ser estudado, porém, ensaios clínicos têm demonstrado que a pressão arterial é um importante e modificável factor de risco para retinopatia diabética e que a redução da pressão arterial elevada diminui significativamente o desenvolvimento e progressão da retinopatia em ambos os tipos de pacientes diabéticos (Simó R e Hernández C, 2009). Assim, têm vindo a ser desenvolvidos estudos sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), sistema envolvido no controlo pressão arterial, volemia e equilíbrio hidroelectrolítico.

Ao longo dos últimos anos tem sido demonstrado que alguns componentes do RAAS são expressos em diferentes constituintes do olho (Fletcher EL et. al., 2010). Um dos componentes do RAAS é a angiotensina II (Ang II). Estudos anteriores mostram que o olho possui a capacidade de formar Ang II (Fletcher EL et. al., 2010), sendo também conhecidos os efeitos da Ang II nos vasos sanguíneos da retina. A Ang II provoca vasoconstrição das arteríolas retinianas, vénulas e capilares através da ligação ao receptor de angiotensina do tipo 1 (AT1R) (Kawamura et. al., 2004; Rokwood et. al., 1987; Schofelder et. al., 1998). No entanto, o papel da aldosterona, o último componente do RAAS, no desenvolvimento de complicações na retina associadas à diabetes, tem sido pouco estudado.

Desta forma, o objectivo principal deste trabalho foi estudar o efeito da diabetes/hiperglicemia na síntese e acção da aldosterona na retina, em particular no efeito do antagonismo dos receptores mineralocorticóides (MCR) com eplerenona na prevenção da morte neuronal na retina induzida pela diabetes/hiperglicemia, que ocorre nas fases iniciais da RD, mesmo antes da detecção de lesões vasculares.

Neste estudo observamos não só a presença dos MCR e da aldosterona sintetase na retina, mas também um aumento nos níveis de proteína total dos MCR e da aldosterona sintetase em culturas celulares de retinas, expostas a elevadas concentrações

de glicose, e em modelos animais diabéticos. Para além de aldosterona poder ser sintetizada na retina, confirmamos que os seus níveis no plasma se encontram aumentados em modelos animais diabéticos. O que nos permite induzir que existe na retina um local e sistema de acção da aldosterona que é afectado pela diabetes/hiperglicemia. Os estudos de viabilidade e morte celular vieram demonstrar o envolvimento do sistema renina-angiotensina-aldosterona na morte neuronal da retina. Através destes estudos podemos observar que o antagonismo dos receptores mineralocorticóides previne a morte neuronal, pelo processo de necrose, da retina que ocorre nas fases iniciais da retinopatia diabética.

Em suma, este trabalho mostra que existe um sistema de acção da aldosterona na retina, que esse sistema é afectado pela diabetes/hiperglicemia e que o antagonismo dos MCR com eplerenona pode ser um possível alvo terapêutico para o tratamento da retinopatia diabética.

Palavras-chave: Retinopatia diabética, sistema renina-angiotensina-aldosterona; aldosterona; aldosterona sintetase; receptores mineralocorticóides; hiperglicemia.

Capítulo 1

Introdução

1.1 - Constituintes celulares da retina

A retina é composta por quatro classes principais de células (fig. 1) sendo todas elas afectadas pela diabetes (Gardner TW et. al., 2002).

Os vasos sanguíneos são constituídos por células endoteliais e pericitos que os alinham. Pericitos são células musculares lisas modificadas de vasos capilares que regulam o fluxo vascular na retina, por dilatação e contracção. As células endoteliais regulam funções hemostáticas e constituem a barreira hemato-retiniana (Gardner TW et. al., 2002).

As células da glia constituem a segunda categoria. As macroglia são células de suporte que regulam o metabolismo da retina e modulam a função dos neurónios e vasos sanguíneos. Existem dois tipos principais de células macrogliais: células de Muller e astrócitos. As células de Muller vão do epitélio pigmentar à membrana limitante interna, têm os seus corpos celulares na camada nuclear interna, e são grandes reguladores do metabolismo do glutamato extracelular, equilíbrio iónico e função neuronal. Os astrócitos, pelo contrário, são limitados à camada de fibras nervosas, onde o seu processo é envolverem-se em torno dos vasos sanguíneos e células ganglionares (Gardner TW et. al., 2002).

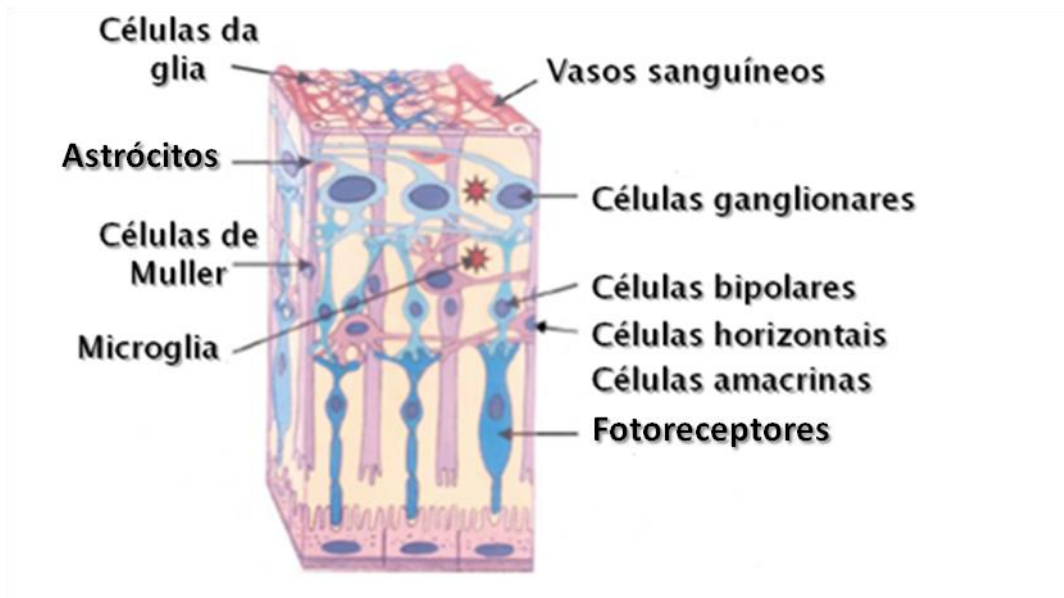


Figura 1: Imagem esquemática dos quatro tipos principais de células da retina: vasculares (pericitos e células endoteliais); células da macroglia (células de Müller e astrócitos); neurónios (fotoreceptores, células bipolares, amacrinas e células ganglionares); microglia (adaptado de Gardner TW et. al., 2002).

Em conjunto, as células de Muller e astrócitos vasculares integram a actividade neuronal na retina (Gardner TW et. al., 2002).

A terceira classe de células inclui os neurónios, dos quais existem cinco tipos principais: fotorreceptores, células bipolares, células amácrinas, células ganglionares e células horizontais. Os neurónios medeiam a fototransdução, modulam e transmitem impulsos nervosos que são transmitidos finalmente para o cérebro através dos axónios das células ganglionares que constituem a camada de fibras nervosas e o nervo óptico. Neurónios são, por definição, as células responsáveis pela visão. Assim, a deficiência da visão na retinopatia diabética e noutras desordens implicam necessariamente a perturbação da sua função e por vezes até mesmo da sua morte (Gardner TW et. al., 2002).

As células da microglia são uma quarta classe de células que têm sido subestimadas na maioria dos estudos de doenças da retina. Estas células estão relacionadas com macrófagos teciduais e estão normalmente quiescentes. No entanto elas são sensíveis a alterações no estado homeostático da retina e quando a homeostase é perturbada na retina tornam-se rapidamente fagocitárias (Gardner TW et. al., 2002).

A interacção e integração funcional de todos os tipos de células são necessárias para uma visão normal (Gardner TW et. al., 2002).

1.2 - Retinopatia diabética

A diabetes é uma patologia caracterizada por deficiência absoluta ou relativa na secreção de insulina e/ou acção da insulina associada á hiperglicemia crónica e a distúrbios no metabolismo de hidratos de carbono, lípidos e proteínas (Rahimi R et. al., 2005). As causas da diabetes são múltiplas. Ambos os factores genéticos e ambientais desempenham um papel na sua etiologia (Kuzuya T et. al., 2002). Os distúrbios na secreção de insulina podem dever-se a uma diminuição na massa de células β pancreáticas e / ou distúrbios funcionais das células β (Guo T e Hebrok M, 2009). Em alguns casos de diabetes, a doença pode ser atribuída exclusivamente à deficiência do fornecimento de insulina, mas em outros casos existe tanto insulino-resistência como deficiência relativa de insulina (Kuzuya T et. al., 2002).

A classificação mais recente da diabetes é a terceira tentativa nos últimos 30 anos para incluir as diversas entidades da doença num único critério de classificação. De

entre os mais importantes tipos de diabetes encontram-se a diabetes do tipo 1 e 2. Ambos os tipos de diabetes (tipo 1 e 2) envolvem uma redução das concentrações plasmáticas de insulina. Na diabetes do tipo 1, a sinalização da insulina é completamente anulada devido à destruição das células β , causada pela contrária autoimunidade (Nugent DA et. al., 2008). Sem insulina, a glicose não pode ser transportada do sangue para o espaço intracelular do músculo, tecido adiposo e células do fígado, tornando-se os ácidos gordos a principal fonte de energia nestes tecidos. Esta forma de obtenção de energia resulta na produção de corpos cetónicos e ácidos orgânicos, como consequência desenvolve-se uma grave acidose metabólica. A diabetes do tipo 2 é uma doença crónica no metabolismo dos hidratos de carbono e lípidos e é conhecida pela sua heterogeneidade (Shin ES et. al., 2008). Este tipo de diabetes é caracterizado pela insulino-resistência, uma redução na captação celular de glicose em resposta à insulina em circulação e hiperinsulinémia compensatória (Nicolaidis E e Jones CJh, 2002).

A diabetes leva ao aparecimento de várias complicações clínicas, tais como a hiperglicemia, hipertensão, hiperlipidemia, entre outras. Todos estes factores, em conjunto, induzem a apoptose e inflamação, que por sua vez levam a danos ao nível neurovascular, causa principal da retinopatia diabética (Ola, M.S., et al., 2010).

A retinopatia diabética (RD), uma específica complicação microvascular da diabetes, é a principal causa de cegueira em pessoas com idade de trabalhar. A prevalência da RD aumenta com a duração da diabetes, em quase todas as pessoas com diabetes do tipo 1 e mais de 60% das pessoas com o tipo 2 têm retinopatia após 20 anos de diabetes (Mohamed Q et. al., 2007). Esta complicação microvascular da diabetes é classificada de acordo com a gravidade dos danos vasculares, e é geralmente categorizada em retinopatia diabética não proliferativa, que compreende as fases iniciais da doença, e retinopatia diabética proliferativa, que é a fase mais grave e com maior risco de perda de visão (Wilkinson-Berka JL et. al., 2012).

A retinopatia diabética é uma doença progressiva da retina, extremamente complexa e que envolve muitas e diferentes células, moléculas e factores. A diabetes induz a desregulação dos níveis de diversos metabolitos, como a glicose, lípidos, aminoácidos, hormonas e de diversos factores que levam à morte celular na retina. Vários estudos têm demonstrado que o aumento no plasma dos níveis de homocisteína em pacientes diabéticos e o aumento de aminoácidos com cadeias ramificadas em retinas podem promover a morte celular neuronal na retinopatia diabética (Coral et al., 2009; Ganapathy et.al., 2009). Para além disso, o aumento nos níveis de adenosina têm

sido implicados na progressão da retinopatia diabética, uma vez que o antagonismo do receptor selectivo de adenosina A₂B previne a migração celular, proliferação de células endoteliais e neovascularização na retina (Grant et al., 2001).

Durante as ultimas décadas a hiperglicemia tem sido considerada como principal causa para a progressão da RD. No entanto, nos últimos anos têm surgido evidências de que os níveis elevados de glicose no plasma não podem ser a causa principal para as mudanças celulares e funcionais que ocorrem com a progressão da RD (Barnes et. al., 1985; Harrower e Clarke, 1976; Warboys e Fraser, 2010). Vários estudos indicam que uma terapia intensiva no controlo da glicemia causa efeitos de risco a longo prazo, na progressão da RD (Ismail-Beigi et al., 2010; Patel et al., 2008).

A perturbação metabólica, induzida pela diabetes na retina, causa o aumento da expressão de vários mediadores pró-trombóticos, pró-inflamatórios e pró-fibroticos, tais como o TNF- α , IL-6 e ICAM-1, o que vai permitir o aumento da permeabilidade vascular, fluxo sanguíneo, apoptose e angiogénese (Brown NJ, 2008).

O aumento sistémico destes mediadores e metabolitos em doentes e em modelos animais diabéticos têm mostrado induzir vias de sinalização bioquímicas e moleculares envolvidas na progressão da RD (figura 2) (Ola, M.S., et al., 2010).

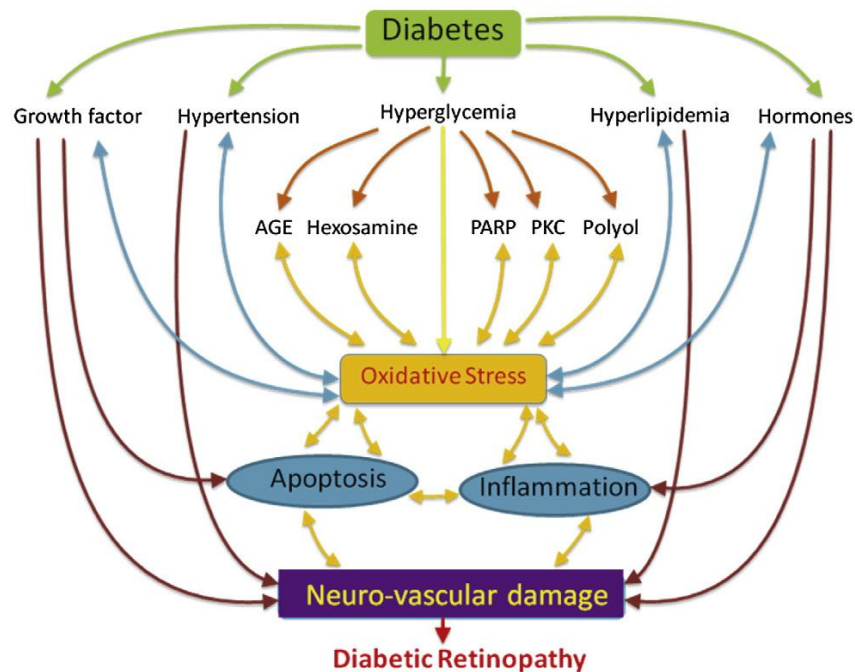


Figura 2: A diabetes induz uma série de mediadores de crescimento e inflamatórios que activam diversas vias bioquímicas responsáveis pela progressão da retinopatia diabética. (Ola, M.S., et al., 2010).

Entre os principais factores de risco para a RD, identificados a partir de estudos epidemiológicos, encontram-se a duração da diabetes, hiperglicemia, hipertensão, hiperlipidemia, gravidez e nefropatia ou doença renal. Assim, é importante o controlo de todos estes factores (Fong DS, 2002). A melhoria do controle glicémico foi o primeiro factor a ser estudado, porém, ensaios clínicos têm demonstrado que a pressão arterial é um importante e modificável factor de risco para retinopatia diabética e que a redução da pressão arterial elevada diminui significativamente o desenvolvimento e progressão da retinopatia em ambos os tipo 1 e tipo 2 de pacientes diabéticos (Simó R e Hernández C, 2009). Assim, têm vindo a ser desenvolvidos estudos sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona, sistema envolvido no controlo pressão arterial, volemia e equilíbrio hidroelectrolítico (Giestas A et. al., 2010).

1.3 - Aldosterona

A aldosterona é uma hormona esteroide sintetizada, na zona glomerolosa do córtex adrenal, a partir de uma série de reacções enzimáticas específicas. Em primeiro lugar o colesterol atravessa a membrana externa da mitocôndria e de seguida é convertido em aldosterona através de várias reacções enzimáticas catalisadas por desidrogenases e oxidases, muitas das quais pertencem à superfamília do citocromo P450 (CYP). A primeira reacção é a conversão do colesterol em pregnenolona, catalisada pela clivagem da cadeia lateral da enzima P450 (CYP11A1), codificada pelo gene CYP11A1 do cromossoma 15 humano. De seguida a pregnenolona é libertada no citosol e convertida em progesterona por desidrogenação do grupo 3- β -hidroxilo e isomerização da dupla ligação de C5 para C4, pela 3- β -hidroxiesteroide desidrogenase que está localizada no reticulo endoplasmático liso. A progesterona, por acção da 21-hidroxilase é convertida em 11-desoxicorticosterona (DOC). A conversão da DOC em aldosterona envolve três reacções consecutivas: a DOC é convertida em corticosterona pela 11- β -hidroxilase; através da 18-hidroxilase forma-se 18-hidroxicorticosterona e finalmente é formada aldosterona por acção da aldosterona sintetase. A aldosterona sintetase está localizada na membrana interna da mitocôndria e é codificada pelo gene CYP11B2 (figura 3) (Connell JMC e Davies E, 2005).

Classicamente a aldosterona é sintetizada na zona glomerolosa do córtex adrenal e liga-se especificamente aos receptores mineralocorticóides, localizados no citosol das células epiteliais. A translocação do complexo aldosterona-receptor mineralocorticóide

para o núcleo regula a expressão do gene e a translação de proteínas específicas que regulam a homeostasia de fluidos e electrólitos. No entanto, a aldosterona também actua em células não endoteliais e induz rápidas acções, não genómicas, que contribuem para o controlo da pressão sanguínea. Existem também evidências de que a aldosterona possa também ser sintetizada em outros tecidos, tais como o sistema nervoso central (Connell JMC e Davies E, 2005). Algumas evidências têm indicado que possa existir um local de síntese de aldosterona na retina (Wilkinson-Berka et. al., 2012). Foi já demonstrado que o mRNA da aldosterona sintetase está presente em células da glia da retina de modelos animais com retinopatia diabética induzida pelo oxigénio (OIR) (Deliyanti D. et. al., 2012).

1.4 - Receptores mineralocorticóides (MCR)

A maior parte das acções da aldosterona que têm sido descritas em tecidos não epiteliais parecem ser devidas à sua interacção com os receptores mineralocorticóides. Os receptores mineralocorticóides (MCR) pertencem à superfamília de receptores nucleares para esteroides/ tiroides e retinoides. Os receptores mineralocorticóides estão relacionados com outro tipo de receptores esteroides, principalmente com os receptores glicocorticóides (GR), com os quais apresentam um elevado grau de homologia. Tem sido demonstrado que os MCR apresentam elevada afinidade, tanto para a ligação de aldosterona, como para o cortisol *in vitro*. No entanto, tem-se observado *in vivo* que os MCR apresentam maior afinidade de ligação com aldosterona, pois os glucocorticoides no plasma ligam-se à albumina e a outras proteínas, o que permite que apenas uma pequena quantidade de glucocorticoides livres atravesse a membrana celular (Chardpraorn C. e Grekin RJ, 2001). Outras das razões para a maior afinidade de ligação dos MCR à aldosterona é a presença da 11- β -hidroxiesteroide desidrogenase, esta enzima desactiva 11- β -hidroxiglicocorticoides (cortisol e corticosterona), que são 100 a 1000 vezes mais abundantes no plasma do que a aldosterona e podem ligar-se aos MCR (Chardpraorn C. e Grekin RJ, 2001; Guo C, 2006). Para além disso a dissociação da aldosterona dos MCR é cinco vezes mais lenta que a dos glucocorticoides, apesar de as suas constantes de afinidade de ligação serem semelhantes (Chardpraorn C. e Grekin RJ, 2001).

Os MCR são normalmente expressos em células epiteliais. No entanto, vários estudos mostraram já a sua expressão em células não epiteliais e observaram que as suas propriedades nos diferentes tecidos são semelhantes. Contudo, os seus efeitos não são os mesmos. Em células epiteliais a aldosterona promove a reabsorção de sódio através da indução de expressão da sgk (serina-trionina cinase) que promove a activação dos canais Na^+ (ENaC), e da activação da bomba basolateral de Na^+ . Estes efeitos no ducto colector renal regulam a homeostasia de água, iões e da pressão sanguínea. Em contraste, os efeitos da aldosterona no coração e cérebro parecem estar relacionados com o transporte de sódio no epitélio. No coração a aldosterona promove a hipertrofia e fibrose cardíaca. No cérebro a aldosterona afecta a regulação neural da pressão arterial, fluxo simpático e a regulação do volume (Chardpraorn C. e Grekin RJ, 2001).

Vários estudos têm já demonstrado que a aldosterona induz a inflamação, neovascularização, activação das células de Muller e danos ao nível das células ganglionares na retina. Para além disso, um recente estudo mostrou a participação da aldosterona na regulação dos canais de iões/água em células de Muller da retina, no entanto falaremos com a maior detalhe sobre os efeitos da aldosterona na retina na secção seguinte (Wilkinson-Berka JL, 2012).

Recentes estudos têm indicado que alguns dos efeitos da aldosterona não são derivados da sua ligação aos MCR. Estas acções foram designadas de não genómicas para as distinguir dos efeitos genómicos, que ocorrem como resultado da transcrição do gene, após a activação dos receptores nucleares. Em muitas linhas celulares, a aldosterona induz um rápido aumento do inositol trifosfato, a repressão da actividade da proteína cinase C e activa a bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Estas acções da aldosterona têm sido observadas em leucócitos mononucleares humanos e em cardiomiócitos de ratos (Christ M. et. al., 1995; Christ, M. e Wehling, M., 1999). O uso de antagonistas específicos dos MCR e a inibição da transcrição ou da síntese proteica não bloqueiam as acções mediadas pela aldosterona. Para além disso, num estudo, em humanos, aos quais foram administradas doses elevadas de aldosterona observou-se que ocorriam significativas mudanças na resistência sistémica vascular, no débito e índice cardíaco. Estes efeitos apareceram aos 3 minutos, após injeccção intravenosa de aldosterona, e após 10 minutos dissiparam-se, um curto período de tempo para que os efeitos possam ser devidos a acções genómicas da aldosterona (Chardpraorn C. e Grekin RJ, 2001).

Em resumo, a maioria das acções da aldosterona, quer nas células epiteliais quer nas células não epiteliais, são mediadas pela activação dos receptores

mineralocorticóides. Os receptores mineralocorticóides apresentam elevada homologia com receptores nucleares esteroides e a selectividade dos MCR para a aldosterona deve-se a vários mecanismos, o mais importante é a presença da enzima 11- β -hidroxiesteroide desidrogenase. Algumas das acções da aldosterona não requerem a ligação aos MCR para os seus efeitos (Chardpraorn C. e Grekin RJ, 2001).

Foi já referido como a aldosterona é sintetizada, qual a sua acção e de que modo actua. Contudo, ainda não foi explicado quais os factores que regulam a síntese ou a inibição de aldosterona. Uma série de factores têm sido apontados por inibir ou estimular a produção da aldosterona, incluindo a adrenalina, serotonina, dopamina, heparina e a adrenomedolina. Mais recentemente, factores novos secretados pelo tecido adiposo, têm demonstrado estimular a síntese de aldosterona *in vitro*. No entanto, os principais reguladores da síntese e secreção de aldosterona são a angiotensina II, a concentração de potássio extracelular e a ACTH (hormona adrenocorticotrópica). De entre estes o sistema renina-angiotensina é o principal regulador da síntese de aldosterona (Fuller PJ e Young MJ, 2005).

1.5 - Sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS)

O RAAS é um dos mais antigos e filogenético sistema hormonal e é vital para o controle da pressão arterial sistémica (Fletcher EL et. al., 2010).

Nos últimos 20 anos têm vindo a surgir evidências de que todos os componentes do RAAS são expressos na retina e que a angiotensina II (Ang II), o principal peptídeo efectivo do RAAS, regula a função retiniana. Além disso, a desregulação do RAAS foi implicada em doenças vasculares da retina, tais como a retinopatia da prematuridade e a retinopatia diabética. Em particular, os agentes que inibem o RAAS previnem o desenvolvimento de uma variedade de efeitos patológicos em modelos animais e em pacientes com retinopatia diabética (Fletcher EL et. al., 2010).

A principal fonte de circulação da Ang II são as células justaglomerulares do rim, que sintetizam a enzima, renina, e seu precursor, pró-renina. A síntese de Ang.II depende em grande parte da renina. A secreção de renina é estimulada por reduções da pressão de perfusão ou do conteúdo de NaCl e pelo aumento da actividade simpática. Após ser secretada, já na circulação, a renina converte o angiotensinogénio, o único substracto para a renina, e principalmente formado no fígado, em angiotensina (Ang.I).

Na via clássica (figura 3) a enzima de conversão de angiotensina I (ECA) é responsável pela conversão de 60% do decapeptídeo inactivo Ang.I no octapéptido activo Ang.II. A conversão dos restantes 40% de Ang.II processa-se através de uma via alternativa pela acção de outras enzimas (quimase, catepsina G e outras proteases serinas) (Giestas A et. al., 2010).

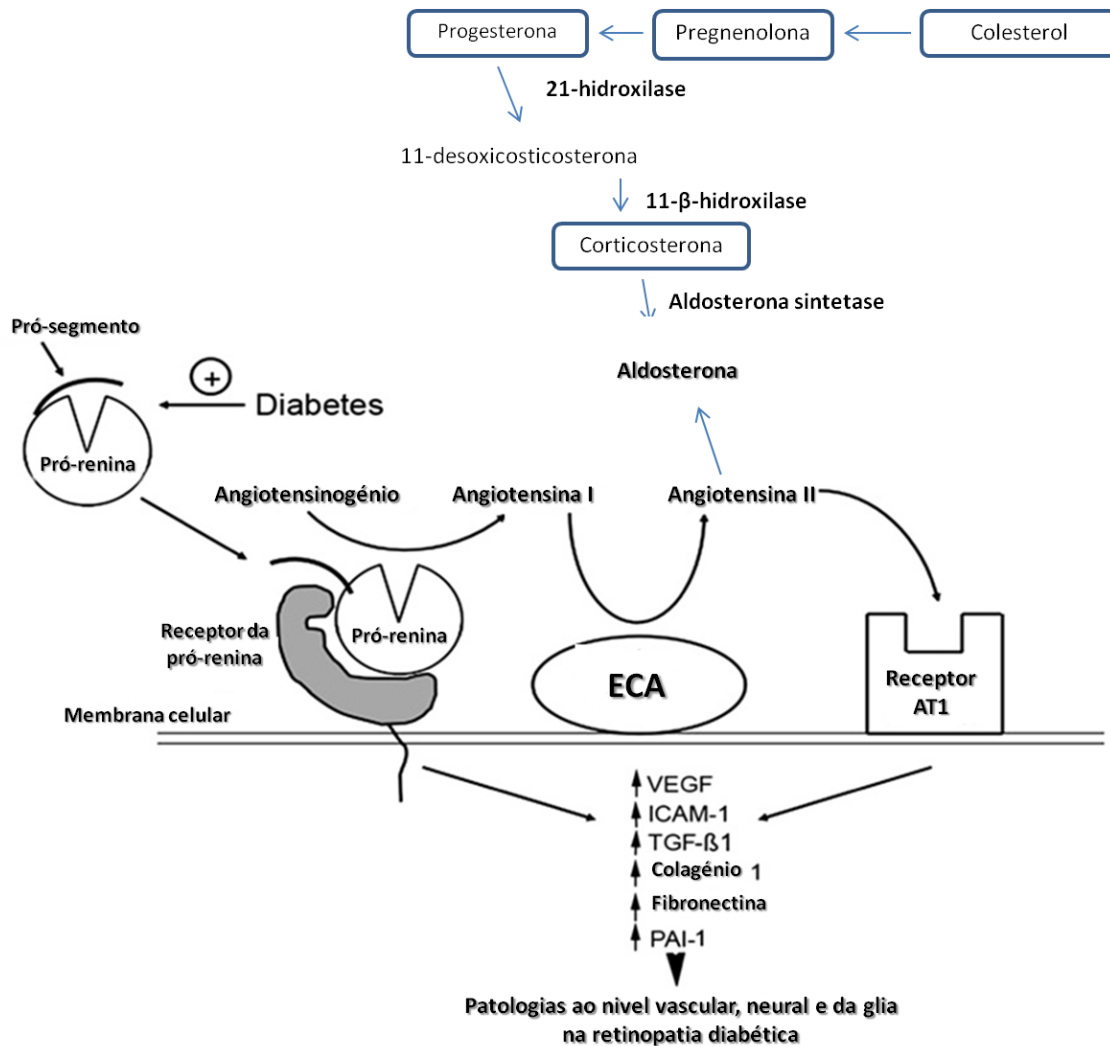


Figura 3: A ligação da Ang II aos AT1R induz estados pró-inflamatório, pró-trombótico e pró-fibrótico na retina e promove a síntese de aldosterona (adaptado de Wilkinson-Berka, 2010).

A Ang. II é altamente expressa em células endoteliais pulmonares e em outros locais vasculares. Os principais efeitos celulares da Ang II são mediados por dois receptores pertencentes à superfamília dos receptores com sete domínios trans-membranares, o receptor da angiotensina II do tipo 1 (AT1R) e receptores da Ang. II do tipo 2 (AT2R), embora outros receptores para a Ang II tenham sido identificados (Paul

et. al., 2006; Wright e Harding, 1997). Ambos os tipos de receptores exibem semelhante afinidade para Ang II. A maioria dos efeitos biológicos da Ang II são devidos à sua ligação com o AT1R. Esta ligação vai induzir os estados pró-inflamatório, pró-trombótico e pró-fibrótico. Para além de induzir todos estes estados, a ligação de Ang II aos AT1R promove o aumento da síntese de aldosterona (figura 3) (Fletcher EL et. al., 2010).

A aldosterona, o último componente do RAAS, é produzida a quando da estimulação da Ang II e estes dois componentes do RAAS vão levar à fosforilação do ERK através de vias genómicas e não genómicas. A via não genómica envolve a transcrição do EGFR. Como resultado do aumento do estresse oxidante e da activação do ERK ocorre a expressão de factores de transcrição pró-inflamatórios, factores de adesão como a molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, e quimiocinas como a MCP-1. Os leucócitos secretam citocinas inflamatórias (IL-6), que por sua vez promovem a expressão de factores pró-fibróticos, como o TGF- β e PAI-1 (figura 4) (Brown NJ, 2008).

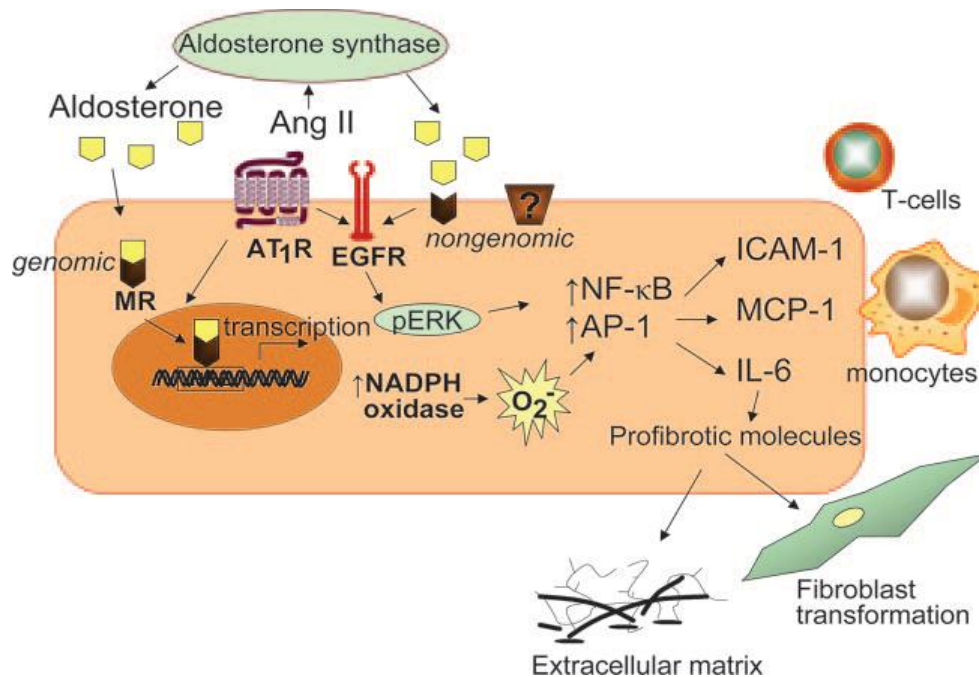


Figura 4: Mecanismo de ação da aldosterona e Ang II. A aldosterona activa a NADPH oxidase para produzir espécies reactivas de oxigénio. A aldosterona e Ang II fosforilam a ERK (Cinase de proteínas regulada por sinais extracelulares) através de vias genómicas e não genómicas. A via não genómica envolve a transcrição do factor EGFR (Receptor do factor de crescimento epidérmico). Com aumento do stress oxidativo e a ativação da ERK ocorre a transcrição de factores pró-inflamatórios, de adesão e pró-fibróticos (Brown NJ, 2008).

A síndrome metabólica (SM) está associada à estimulação do RAAS e ao risco de doença cardiovascular e renal crónica. Os componentes clínicos que constituem a SM incluem a obesidade central, hipertensão arterial, dislipidemia, microalbuminúria, insulinoresistência e consequente hiperglicemia. Estes vão induzir um estado de estresse oxidante com disfunção endotelial, causando activação da Ang.II localmente, que por sua vez, através da ligação aos diferentes receptores vai induzir um estado pró-inflamatório, pró-trombótico e pró-fibrótico, contribuindo assim para o desenvolvimento de lesões cardiovasculares, renais e retinianas (figura 4) (Giestas A et. al., 2010).

A desregulação do RAAS também está envolvida na patogénese de várias doenças hipertensivas. A relação entre RAAS, hipertensão arterial e lesão de órgãos alvo é explicada pelo papel do RAAS na homeostase hidroelectrolítica e na resposta vascular à lesão. O aumento da tensão arterial causa lesão no endotélio e activação do RAAS. A activação do RAAS contribui para o aumento da tensão arterial e estimulação de uma resposta inflamatória local para reparar a lesão. A agressão mantida e repetida leva a disfunção endotelial e doença microvascular (Giestas A et. al., 2010).

Ao longo dos últimos anos, outros membros do RAAS incluindo a pró-renina, o receptor da pró-renina e o ECA2, foram identificados no olho e alguns implicados no desenvolvimento de várias patologias que afectam a retina (Senanayake et. al., 2007; Tikellis et. al., 2004).

Um estudo anterior sugere que a angiotensina II, um dos componentes do RAAS, pode ser sintetizada no olho (Fletcher EL et. al., 2010). Os efeitos da Ang II nos vasos sanguíneos da retina, como os do resto do corpo estão bem estabelecidos. A Ang II provoca vasoconstrição das arteríolas retinianas, vénulas e capilares através da ligação ao AT1R. O mecanismo por de trás deste efeito foi recentemente demonstrado que envolve a activação de AT1Rs sobre os pericitos (Fletcher EL et. al., 2010).

O cálcio intracelular é conhecido por regular a contractilidade de pericitos. Análises electrofisiológicas detalhadas da resposta celular dos pericitos à Ang II revelaram que a Ang II pode provocar o aumento do cálcio intracelular através de mecanismos que envolvem a libertação de cálcio das reservas intracelulares, e do influxo de cálcio através da tensão dos canais de cálcio fechados do tipo L. No entanto, muito pouca contracção dos pericitos ocorreu na ausência de cálcio extracelular, sugerindo que o influxo de cálcio para os pericitos é um passo vital na sua contracção mediada pela Ang II (Fletcher EL et. al., 2010).

Além da vaso constrição, a Ang II também mostrou dissociar os pericitos dos seus vizinhos através de um mecanismo microvascular dependente de uma proteína cinase C. Isto implica que a Ang II não é apenas um regulador da contractilidade dos pericitos, mas também afecta a dinâmica celular e a função do gene. A Ang II é conhecida por modular outras funções, tais como a migração e proliferação de pericitos, e a expressão do factor de crescimento angiogénico (Fletcher EL et. al., 2010).

As células da glia comunicam umas com as outras através de mecanismos que envolvem alterações de cálcio intracelular e a propagação de uma célula da glia para a próxima é realizada como uma “onda”. Quando uma “onda” de cálcio se aproxima de um vaso sanguíneo, mudanças na actividade vaso motora são observadas (Fletcher EL et. al., 2010). Tendo em vista a proximidade das células gliais dos processos dos pericitos e a observação de que os pericitos expressam AT1R, é tentador especular que o mecanismo induzido pelas células gliais na actividade vaso motora possa envolver a libertação, por parte das células gliais, de Ang II sobre os pericitos e induzir a vasoconstrição. Contudo, são necessários mais estudos para identificar as substâncias que modulam a comunicação glial-vascular de forma a elucidar o mecanismo (Fletcher EL et. al., 2010).

Uma das principais funções das células gliais no sistema nervoso central é a manutenção da barreira hematoencefálica. No cérebro, substâncias lançadas a partir das células gliais regulam a integridade das junções apertadas. Os murganhos knock-out para angiotensinogenio apresentam alterações na barreira hematoencefálica (Kakinuma et. al., 1998). Além disso, neste mesmo modelo animal foi observado que nos capilares existe uma diminuição na expressão da proteína da junção apertada, a ocludina, comparados com os controles (Wosik et.al., 2007).

As células de Muller da retina são conhecidas por serem importantes na manutenção da barreira hemoretiniana. Tendo em atenção as semelhanças entre a barreira hematoencefálica e a barreira hemoretiniana, é possível que as células gliais da retina regulem a expressão de células endoteliais de junção apertada via mecanismos semelhantes aos descritos no cérebro (Fletcher EL et. al., 2010).

Em suma, a Ang II promove a inflamação, neovascularização, danos ao nível vascular, disfunção neuroglial, produção de espécies reactivas de oxigénio e AGE_s (fig. 5) (Wilkinson-Berka JL et. al., 2012).

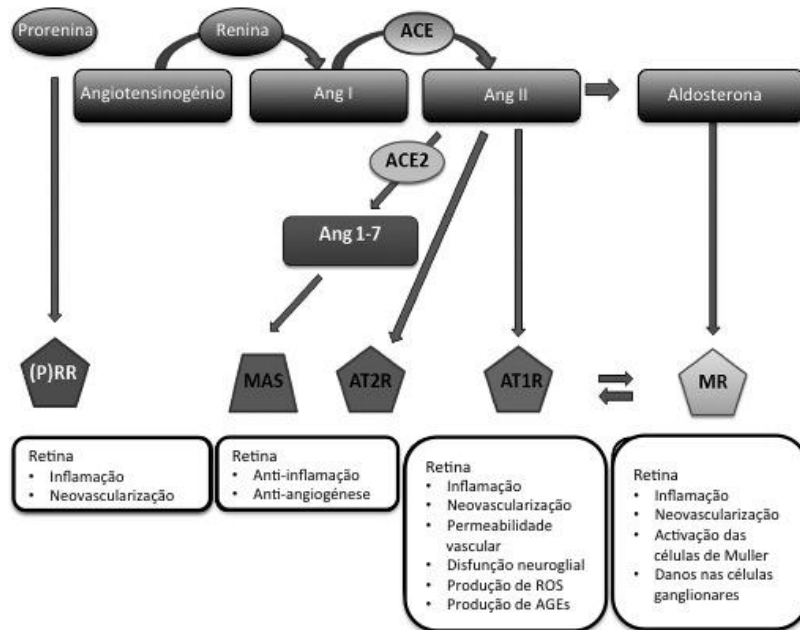


Figura 5: Resumo dos efeitos dos componentes do RAAS na retinopatia da prematuridade e na retinopatia diabética (adaptado de Wilkinson-Berka JL et. al., 2012).

Uma outra consideração a ter em conta, quando se considera a contribuição do RAAS no desenvolvimento da retinopatia diabética, é a aldosterona. Como mencionado anteriormente a Ang II induz a produção de aldosterona, portanto seria de esperar que o antagonismo dos AT1R e a inibição da ACE atenuassem os efeitos da aldosterona. No entanto, a inibição da ACE e o bloqueio dos AT1R não reduzem os níveis de aldosterona, indicando que a aldosterona pode ser um alvo terapêutico na prevenção do desenvolvimento de doenças na retina que envolvam a activação do RAAS (Wilkinson-Berka JL et. al., 2012).

Usando um modelo de rato com retinopatia induzida por oxigénio, Wilkinson-Berka e colaboradores, demonstraram que o bloqueio dos MCR com a espiranolactona, aumenta a angiogénese da retina pela atenuação da leucostase e diminuição das respostas inflamatórias (Wilkinson-Berka et. al., 2009). Apesar destes efeitos promissores através do bloqueio dos MCR no tratamento da componente vascular da DR, muito pouco se sabe sobre o possível efeito do antagonismo da aldosterona ou MCR na parte neural da retina.

Recentemente, em estudos realizados pelo nosso grupo, observou-se que após a aplicação da eplerenona a morte das células neuronais da retina induzida pela hiperglicemia era reduzida. Estes resultados sugerem fortemente que em pacientes com diabetes o aumento da aldosterona na retina e / ou os seus níveis de receptores são responsáveis pela morte dos neurónios que ocorre nas fases iniciais da DR, provavelmente devido à libertação de mediadores inflamatórios. No entanto permanece a questão: poderá a inibição da síntese de aldosterona ou o bloqueio dos MCR evitar esta morte celular?

1.6 - Modelação farmacológica do RAAS

O RAAS é um sistema hormonal decisivo na regulação do volume sanguíneo e pressão, existem várias doenças que apresentam alterações em qualquer um dos elementos deste sistema, o que resulta no aparecimento de hipertensão, um dos problemas mais importantes de saúde pública nos países desenvolvidos, afectando cerca de um bilião de pessoas em todo o mundo (Giestas A et. al., 2010).

O tratamento com agentes moduladores do RAAS vai permite uma protecção contra o aparecimento de hipertensão, assim como de outras patologias, resultantes da activação patológica do RAAS. A abordagem terapêutica farmacológica sobre o RAAS pode ser efectuada em várias etapas da sua cascata. Ao longo de vários anos foram sendo descobertos vários compostos químicos para inibir alguns componentes pertencentes ao sistema RAAS. Entre os quais se encontram os bloqueadores β , que bloqueiam o sistema nervoso simpático, inibindo a libertação da renina (Giestas A et. al, 2010).

Os inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA, como o ramipril e lisinopril), levam ao bloqueio da ECA que a curto prazo provoca a redução dos níveis de Ang.II, aldosterona e actividade do SNS, mas por perda do mecanismo de *feedback* negativo ocorre um aumento da renina e da Ang.I. No entanto, a longo prazo, as concentrações plasmáticas de Ang.II e aldosterona normalizam devido ao escape à ECA através da via alternativa (Giestas A et. al., 2010).

Os receptores da Ang.II do tipo 1 medeiam a maioria dos efeitos deletérios da Ang.II, responsáveis pela lesão dos órgãos-alvo. Foram desenvolvidos inibidores deste tipo de receptores, como o losatan e o valsartan, eles actuam como antagonistas

selectivos, sem afectar os outros subtipos de receptores, e permitem a estimulação adicional dos receptores do tipo 2 através do aumento da Ang.II com efeitos benéficos cardíacos, renais e do endotélio vascular. Tal como nos IECA, há perda do mecanismo de *feedback* negativo com consequente aumento da renina e Ang.I. Contudo, apresentam a vantagem de ultrapassarem o fenómeno de escape da ECA a longo prazo (Giestas A et. al., 2010).

Recentemente surgiu uma nova classe de bloqueadores do RAAS, os inibidores directos da renina, representados pelo aliscireno. Este novo fármaco, ao contrário dos IECA e ARAII, diminui a actividade da renina plasmática e ainda as concentrações de Ang.I e II. O aliscireno inibe o RAAS através de dois mecanismos: ligação ao lugar activo da renina e pró-renina impedindo o acesso do angiotensinogénio à enzima e redução da expressão do receptor de renina e pró-renina (Giestas A, 2010).

O RAAS, em função da retina tem sido implicado num grande número de estudos que demonstram os efeitos positivos quando os inibidores da ECA ou antagonistas do AT1R são utilizados no tratamento de doenças da retina, como a retinopatia diabética ou a retinopatia da prematuridade (Fletcher EL et. al., 2010).

Tem vindo a ser observado em estudos recentes que o bloqueio dos receptores mineralocorticóides (MCR), receptores da aldosterona, com a espirolactona aumenta a angiogénese da retina pela atenuação da leucostase e diminuição das respostas inflamatórias (Fletcher EL et. al., 2010). Contudo, apesar do seu efeito antagonista competitivo sobre o receptor de aldosterona, a espirolactona apresenta efeitos colaterais como a hipercaliemia. Ela possui uma acção antiandrogénica e progestativa fraca, causando ginecomastia e impotência no sexo masculino e irregularidades menstruais na mulher, está contra-indicada na gravidez devido ao risco de feminização dos fetos masculinos. A eplerenona distingue-se da espirolactona por bloquear selectivamente o receptor de aldosterona, não se verificando com este fármaco efeitos anti-androgénicos, nem progestativos (Giestas A et. al., 2010).

1.7 - Objectivos

Nos últimos 20 anos tem vindo a ser e claramente demonstrada a presença do RAAS na retina, onde os seus componentes estão abundantemente expressos nos neurónios, nas células da glia e em microvasos da retina, sugerindo que o olho contém um sistema de formação de Ang II (Fletcher EL et. al., 2010). Os efeitos da angiotensina II nos vasos sanguíneos da retina, como os do resto do corpo estão bem estabelecidos. A Ang II provoca vasoconstrição das arteríolas retinianas, vénulas e capilares através da ligação ao AT1R. Contrariamente à Ang II., o papel da aldosterona, o último componente do RAAS, no desenvolvimento da retinopatia associada à diabetes tem sido pouco estudado. Apesar de existirem alguns estudos, recentes, que abordam o papel que a aldosterona desempenha na componente vascular (Fletcher E. L. et. al., 2010; Wilkinson-Berka et. al., 2009), não existia qualquer estudo que procurasse investigar os efeitos da aldosterona na parte neuronal da retina, que é afectada nos estágios precoces da retinopatia diabética.

Desta forma, o objectivo principal deste trabalho foi estudar o efeito da diabetes /hiperglicemia no sistema da aldosterona na retina, nomeadamente numa enzima responsável pela sua síntese, a aldosterona sintetase, e nos seus receptores, os MCR, bem como procurar verificar se o antagonismo dos receptores mineralocorticóides (MCR) com eplerenona previne a morte neuronal na retina induzida pela diabetes/hiperglicemia, que ocorre nas fases iniciais da RD, mesmo antes da detecção de lesões vasculares. Desta forma, poderemos contribuir para o desenvolvimento de uma nova estratégia terapêutica para o tratamento da retinopatia diabética, a principal causa de cegueira em adultos.

Capitulo 2

Materiais e métodos

2.1- Materiais

O meio mínimo essencial (MEM), penicilina e estreptomicina, os inibidores de protéases quimoestatina, pepstatina, antipaína e leupeptina (CLAP) e a estreptozotocina foram adquiridos da Sigma-Aldrich Química SA. A tripsina utilizada era proveniente da Gibco BRL. O soro fetal de bovino foi adquirido a partir da Biochrom. O kit para a quantificação da proteína (BCA Protein Assay kit) era proveniente da Thermo Scientific. As soluções dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%, azul de bromofenol e bis-acrilamida a 30% foram adquiridas a partir dos laboratórios da Bio-Rad. As membranas de difluoreto de polivinildieno (PVDF) são provenientes da Millipore (Madrid, Espanha). O Tween-20 foi adquirido a partir da Sigma-Aldrich Química SA e o leite com baixo teor de gordura utilizado é da marca Nestlé. O substrato quimiofluorescente (ECF) foi comprado na GE Healthcare. O soro de albumina bovina livre de ácidos gordos e o Triton X-100 foram adquiridos da Merck. Todos os outros reagentes possuíam um elevado grau de pureza e foram obtidos da Fisher Scientific, Sigma-Aldrich ou Merck. Os anticorpos utilizados foram:

Tabela 1: Protocolo detalhado dos anticorpos usados no Western blot.

	Hospedeiro	Tipo	Origem
Anticorpos primários			
Anti-MCR (H-300)	Coelho	Policlonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-CYP11B2	Rato	Monoclonal	Millipore
Anti-actina	Rato	Policlonal	Invitrogen
Anticorpos secundários			
Anti-coelho conjugado à fosfatase alcalina	Cabra	Policlonal	GE Healthcare
Anti-rato conjugado à fosfatase alcalina	Coelho	Policlonal	GE Healthcare

2.2 - Soluções e Fármacos usados

Todas as soluções não descritas utilizadas eram aquosas, com a exceção do fluoreto de fenilmetilsulfonilo que foi preparado em dimetilsulfóxido (DMSO). Os fármacos aldosterona e eplerenona foram adquiridos da Sigma-Aldrich, respectivamente. As soluções utilizadas, dos fármacos descritos anteriormente, foram preparadas em DMSO. O iodeto de propídio e o hoeschst foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA).

2.3 - Modelo celular

As culturas celulares de retina foram obtidas a partir de ratos Wistar recém-nascidos (3-5 dias de idade). Cada cultura foi feita a partir de uma única ninhada de 8-12 animais. Os ratos foram decapitados e as retinas dissecadas em ambiente estéril, numa solução Hank's livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} (CMF: NaCl 137 mM, KCl 5,4 mM, KH_2PO_4 0,45 mM, Na_2HPO_4 0,45 mM, NaHCO_3 4 mM, glicose 2,8 mM, HEPES 5 mM, pH 7,1). As retinas foram posteriormente incubadas durante 15 minutos, a 37°C, numa solução de CMF suplementada com tripsina (2 mg/mL). Após centrifugação a 59 g/min, o sobrenadante foi descartado e o tecido digerido (sedimento) foi ressuscitado em meio de Eagle modificado (MEM), enriquecido com soro fetal de bovino (FBS) 10% (v/v), penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL, HEPES 25 mM e NaHCO_3 26mM. De seguida as células da retina foram dissociadas mecanicamente, pipetando o tecido com uma pipeta de vidro de 5 mL. A presença de FBS permite terminar completamente a digestão enzimática. A viabilidade e a densidade celular foram determinadas por contagem das células viáveis, após o teste do corante de azul Trypan. As células foram diluídas em CMF (1:50) com azul de Trypan 0,4% e colocadas num hemocítmetro para posterior contagem através do microscópio óptico.

As células foram cultivadas numa densidade de $2,0 \times 10^6$ células/cm² em placas de cultura com vários compartimentos revestidos com poli-D-lisina (0,1 mg/mL) e em placas de cultura com vários compartimentos que continham lamelas com 1,6 cm de diâmetro. As culturas celulares foram mantidas a 37°C, em atmosfera humidificada, com 95% de ar e 5% de CO₂. Após dois dias, as culturas celulares foram suplementadas

com glicose 25 mM, obtendo-se uma concentração final de 30 mM de glicose nas culturas que mimetiza as condições hiperglicémicas observadas na diabetes. A concentração de glicose nas condições controlo foi de 5mM. Para os estudos de viabilidade celular e morte celular as culturas celulares de retina foram ainda suplementadas, após quatro dias de incubação, com o antagonista eplerenona (10^{-5} M) e o agonista aldosterona (10^{-7} M) dos receptores mineralocorticóides. As culturas celulares foram utilizadas para os diferentes estudos após nove dias de cultura.

2.3.1 - Extractos celulares totais

Após nove dias em cultura, as placas de cultura que continham as células são retiradas da incubadora e foram imediatamente colocadas sobre gelo. De seguida, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas três vezes com uma solução tampão gelada de Krebs (NaCl 111 mM; KCl 4,7 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; CaCl₂ 2,5 mM; NaHCO₃ 24,8 mM; glicose 11,1 mM; HEPES 15 mM; pH 7,4) e de seguida colocou-se 80 µL de tampão de lise (NaCl 137 mM; Tris 20 mM; Nonidet P-40 1 % [v/v]; glicerol 10 %) suplementado com inibidores de proteases (PMSF 0,1 mM; CLAP 1 µg/mL; DTT 1mM; orto-vanadato 1 mg/mL; NaF 1 M) e as células foram “raspadas” no gelo. A suspensão obtida foi sonicada cinco vezes com cinco pulsos de cinco segundos e de seguida centrifugada (15700 g, 10 min., 4°C) para remoção da fracção insolúvel. A concentração de proteína foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (Smith et al., 1985), usando um kit comercial e o seu protocolo. O tampão de amostra seis vezes concentrado foi adicionado (4× Tris-HCl, glicerol 30 %, SDS 10 %, DTT 600 mM e azul de bromofenol 0,012 %) e os extractos foram desnaturados a 95°C por dez minutos.

2.4 - Modelo animal

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar machos com 8 semanas de idade, adquiridos no laboratório Charles River (Espanha). Foi utilizado o modelo de diabetes do tipo 1, que foi induzido por injeção intraperitoneal de STZ, 65 mg/Kg (peso animal) em citrato de sódio 10 mM. Os níveis de açúcar no sangue e o peso foram registrados

para cada animal, no dia da injeção e passados dois dias, para confirmar o efeito da droga. Os animais foram considerados diabéticos quando apresentavam níveis de açúcar no sangue superiores a 250 mg/dl. Os animais foram mantidos com uma dieta padrão regular, para dois períodos de tempo, sete dias e um mês, e de seguida foram sacrificados.

2.4.1- Extractos totais de retina

Os animais foram anestesiados e depois decapitados. De seguida os olhos foram removidos e as retinas extraídas e colocadas em 200 µL de tampão de lise, suplementado com inibidores de proteases (PMSF 0,1 mM; CLAP 1 µg/mL; DTT 1 mM; ortovanadato 1 mM e NaF 1 M). Homogeneizou-se com um pequeno pistão em gelo e o extracto obtido foi sonificado cinco vezes com pulsos de 10 segundos. Os extractos foram posteriormente submetidos a três ciclos de congelação e descongelação, usando gelo seco e etanol a 70 %. Por centrifugação (15700 g, 10 min., 4°C) removeu-se a fracção insolúvel. A concentração de proteína foi determinada pelo método do ácido bicinónico (BCA) (Smith et al., 1985), usando um kit comercial e o seu protocolo. O tampão de amostra seis vezes concentrado foi adicionado (4× Tris-HCl, glicerol 30 %, SDS 10 %, DTT 600 mM e azul de bromofenol 0,012 %) e os extractos foram desnaturados a 95°C por dez minutos.

2.5 - SDS-PAGE e Western Blot

Na análise de *western blot* as proteínas presentes nas amostras foram separadas por electroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes, na presença de SDS (SDS-PAGE), tendo sido depois electrotransferidas para uma membrana de polivinildieno (PVDF). O sistema utilizado na electroforese foi o *MiniPROTEAN® 3*, proveniente dos laboratórios da *Bio-Rad*. A composição do gel de resolução utilizada foi: bis-acrilamida 7,5 % (v/v); Tris HCl 1,5 M 25 %; SDS 0,1 % (v/v); TEMED 0,05 % (v/v); APS 0,05 % (v/v) em água ultra-pura, 10 mL por gel. O gel de concentração tinha a seguinte composição: bis-acrilamida 4 % (v/v); Tris HCl 0,5 M 25 %; SDS 0,1 % (v/v); TEMED 0,05 % (v/v); APS 0,05 % (v/v) em água ultrapura, 5 mL por gel.

O volume de amostra aplicado no gel foi calculado para que a massa de proteína aplicada em cada poço fosse igual para a proteína alvo. Os géis foram submersos em tampão de corrida (Tris 25 mM; glicina 190 mM; SDS 0,1 % [v/v]; pH 8,3) e a electroforese foi realizada a 60 V durante 10 minutos e, em seguida, a 130 V até a separação por peso molecular pretendido ser atingida (30-40 min.). As proteínas foram então electrotransferidas (750 mA; 150 min.) para membranas de PVDF, submersas com tampão de electroforese (CAPS 10 mM; metanol 12,5 % [v/v]; pH 11, ajustado com NaOH). O sistema de electrotransferência usado foi o *Trans-Blot Cell* (Bio-Rad). Após a electrotransferência, as membranas foram submersas em TBS-T (Tris 2,4 g/L; NaCl 8 g/L; pH 7,6, ajustado com HCl; Tween-20 0,1 % [v/v]) com leite magro a 5 % (p/v), durante uma hora.

As proteínas de interesse para o estudo foram identificadas por incubação das membranas com anticorpos específicos (anticorpos primários). A detecção dos anticorpos primários foi feita após incubação das membranas com os anticorpos secundários (dirigidos contra as imunoglobulinas da espécie em que foi produzido o anticorpo primário), conjugados com fosfatase alcalina. Esta enzima por sua vez catalisa a reacção na qual o produto formado emite fluorescência, o que permite a detecção e quantificação da proteína em estudo. Os anticorpos primários foram diluídos em TBS-T com 1 % (p/v) de leite magro e as membranas foram incubadas durante a noite, a 4°C. Após incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBS-T (3× 10 min cada) e de seguida incubadas com o anticorpo secundário, diluído na mesma solução, durante uma hora à temperatura ambiente. Lavaram-se as membranas novamente e secaram-se antes da revelação com o substrato quimiofluorescente ECF.

A análise foi feita através do sistema *VersaDoc Imaging* (Bio Rad), e os dados foram analisados pelo *Quantity One* (Bio Rad).

A detecção e quantificação da aldosterona sintetase seguiu todos os passos do protocolo descrito anteriormente, com a excepção de que as duas primeiras lavagens das membranas foram feitas com TBS-T com leite magro a 5 % (p/v).

Foi ainda realizado o controle de carregamento das proteínas no gel de electroforese, utilizando a proteína actina como controlo. Por fim a remover todas os anticorpos utilizados para a primeira detecção foi realizado o *stripping* da membrana, usando glicina 0,1 M, pH 2,3. Após lavagem com TBS-T, procedeu-se de novo ao bloqueio da membrana com TBS-T com 5 % (p/v) de leite magro e de seguida incubou-se a membrana com o anticorpo anti-actina diluído em TBS-T com 5% (p/v) de leite

magro, durante 1 hora á temperatura ambiente. O protocolo de western blot, descrito anteriormente, foi depois efectuado para o restante da técnica.

2.6 - Estudos de viabilidade celular

2.6.1 - Ensaio do MTT

O ensaio colorimétrico que usa brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) baseia-se na capacidade de células metabolicamente activas reduzirem no meio intracelular o sal solúvel de tetrazólio, dando origem a cristais de formazan, que é um produto de cor azul escura insolúvel em água (Mosmann, 1983). Apesar de inicialmente se ter atribuído a redução do MTT a desidrogenases mitocondriais (Mosmann, 1983), foi demonstrado que a redução do MTT em células intactas ocorre maioritariamente fora da mitocôndria, por desidrogenases não mitocondriais, e envolve provavelmente os cofactores nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (Berridge e Tan, 1993; Liu et. al., 1997). Foi proposto que o MTT entra nas células por um processo de endocitose e que o produto da sua redução, o formazan, se acumula em endossomas/lisossomas, sendo depois secretado por exocitose. Este ensaio é válido para a quantificação da viabilidade ou proliferação celular pois a endocitose é um processo que só ocorre em células viáveis (Liu et. al., 1997).

As células cultivadas em placas de 24 poços foram incubadas com aldosterona (10^{-7} M) e eplerenona (10^{-5} M), quatro dias após o plaqueamento e o ensaio foi realizados passados mais cinco dias. O meio de cultura das células foi removido e as células foram lavadas com solução de Krebs (em mM: NaCl 111, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 24.8, glucose 11.1, HEPES 15, pH 7.4). De seguida foi adicionado a cada poço 300 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL em solução de Krebs) e a placa foi incubada a 37°C, com 5% de CO₂. Passado uma hora a solução de MTT foi removida e foi adicionado a cada poço uma solução de HCl 40 mM em isopropanol, para que os cristais de formazan formados fossem dissolvidos. A placa foi coberta e agitada suavemente durante 10 minutos.

O produto final foi quantificado espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 570 nm, usando como referência o comprimento de onda de 620 nm. A

viabilidade celular foi expressa em percentagem relativamente à absorvência determinada nas células da situação controlo.

2.6.2 - Ensaio do PI

A viabilidade celular das células da retina de rato foi analisada por microscopia de fluorescência, em preparações de células vivas, cultivadas sobre lamelas de vidro com uma densidade de $2,0 \times 10^6$ células/cm². Foram usados como marcadores de DNA o iodeto de propídio (PI), cuja fluorescência é vermelha, e o Hoechst 33342, cuja fluorescência é azul.

Este ensaio, que nos permite identificar células viáveis e células mortas, baseia-se na permeabilidade selectiva da membrana plasmática aos marcadores de DNA utilizados. A membrana plasmática não é permeável ao iodeto de propídeo, que entra na célula apenas quando a membrana celular apresenta rupturas, enquanto que o Hoechst permeia a membrana plasmática, penetrando em células com a membrana celular intacta. Assim, utilizando simultaneamente estes dois marcadores de DNA foram visualizados: i) os neurónios necróticos, com o núcleo corado de vermelho e sem grandes massas de cromatina condensada; ii) os neurónios com morfologia do tipo apoptótico com o núcleo corado de azul e com cromatina condensada e possivelmente fragmentada. Com esta metodologia é possível também observar neurónios com morfologia correspondente a um processo de necrose secundária, aparecendo neste caso os núcleos corados de vermelho, e com a cromatina condensada e possivelmente fragmentada. Os neurónios que aparecem com uma morfologia de necrose secundária foram considerados como neurónios apoptóticos, pois o processo de necrose secundária reflecte uma insuficiência na remoção das células apoptóticas em sistemas *in vitro*, nos quais processos secundários à apoptose podem levar à degradação da membrana celular (Ankarcrona et. al., 1995; Bonfoco et. al., 1997).

As células cultivadas em placas de 12 poços foram incubadas com aldosterona (10^{-7} M) e eplerenona (10^{-5} M), quatro dias após o plaqueamento e o ensaio foi realizado passados mais cinco dias. O meio de cultura das células foi removido e as células foram lavadas com PBS. De seguida as células foram incubadas, durante 10 minutos, com Hoechst 1 µg/mL e iodeto de propídio 2 µg/mL, em meio salino (NaCl 132 mM; KCl 4 mM; CaCl₂ 1 mM; glicose 6 mM, HEPES 10 mM; pH 7,4), a 37°C,

com 5% de CO₂. Em seguida as células foram novamente lavadas com PBS e por fim observadas num microscópio de fluorescência Zeiss Axioshop 2 Plus, acoplado a uma câmera, AxioCam HRc. Os ensaios foram efectuados em duplicado, e a quantificação foi efectuada contando um mínimo de 300 células por lamela.

Capitulo 3

Resultados

3.1- Efeito da diabetes/hiperglicemia nos receptores mineralocorticoides

Vários estudos têm mostrado que o mRNA dos MCR está presente na parte vascular da retina, nas células ganglionares, na camada nuclear interna e no epitélio pigmentado da retina de ratos Sprague – Dawley (Wilkinson-Berka et. al., 2009). Sabe-se que a diabetes altera os níveis de expressão e de proteína de vários receptores e os MCR não são exceção. Foi já demonstrado que os níveis de mRNA e de proteína destes receptores estão aumentados em rins de diferentes modelos diabéticos (Guo et. al., 2006). No entanto, o efeito da diabetes/hiperglicémia nos níveis de proteína dos MCR na retina ainda não é conhecido. Portanto, nós estudamos o efeito da diabetes/hiperglicemia na expressão dos MCR em dois modelos celulares: culturas celulares de retinas de ratos Wistar com 3-5 dias expostas a altas concentrações de glicose e em retinas isoladas a partir de ratos controle e diabéticos.

Os resultados obtidos para culturas celulares de retina estão representados na figura 6.

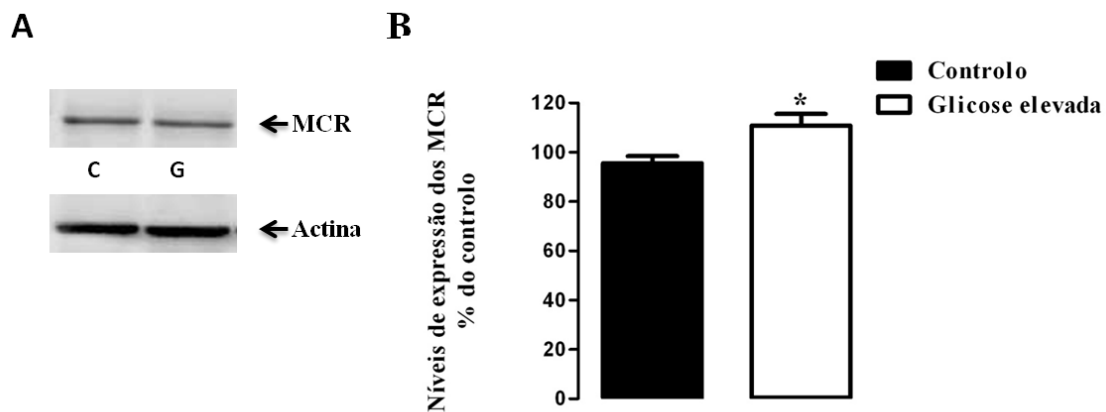


Figura 6: Níveis totais de proteína dos MCR em culturas celulares de retina. (A) As células foram incubadas com 30 mM de glicose, mimetizando condições hiperglicémicas, por um período de 7 dias. 40 µg de proteína, presentes na amostra, foram aplicadas num gel de 7,5 %. Realizou-se o controle de carregamento das proteínas no gel de electroforese, utilizando a proteína actina como controlo. (B) Os níveis de proteína total foram normalizados em relação ao controlo de carregamento e expressos como percentagem do grupo controlo. As barras representam valores médios \pm S. E. de 5-7 experiências independentes. * $p < 0.05$, diferença significativa em relação ao controlo; Teste t.

Através da análise da figura 6, podemos observar um aumento significativo nos níveis totais de proteína dos MCR em culturas celulares de retina expostas a elevadas concentrações de glicose, para $110,9 \pm 4,7$ %, relativamente ao controlo.

Um aumento nos níveis proteicos dos MCR foi também observado nas retinas de ratos diabéticos (Fig. 7). Após 7 dias de diabetes, os níveis de MCR atingiram $129,1 \pm 7,9$ % do controlo, tendo esse aumento sido mantido após um mês da indução da diabetes ($121,4 \pm 4,7$ % do controlo)

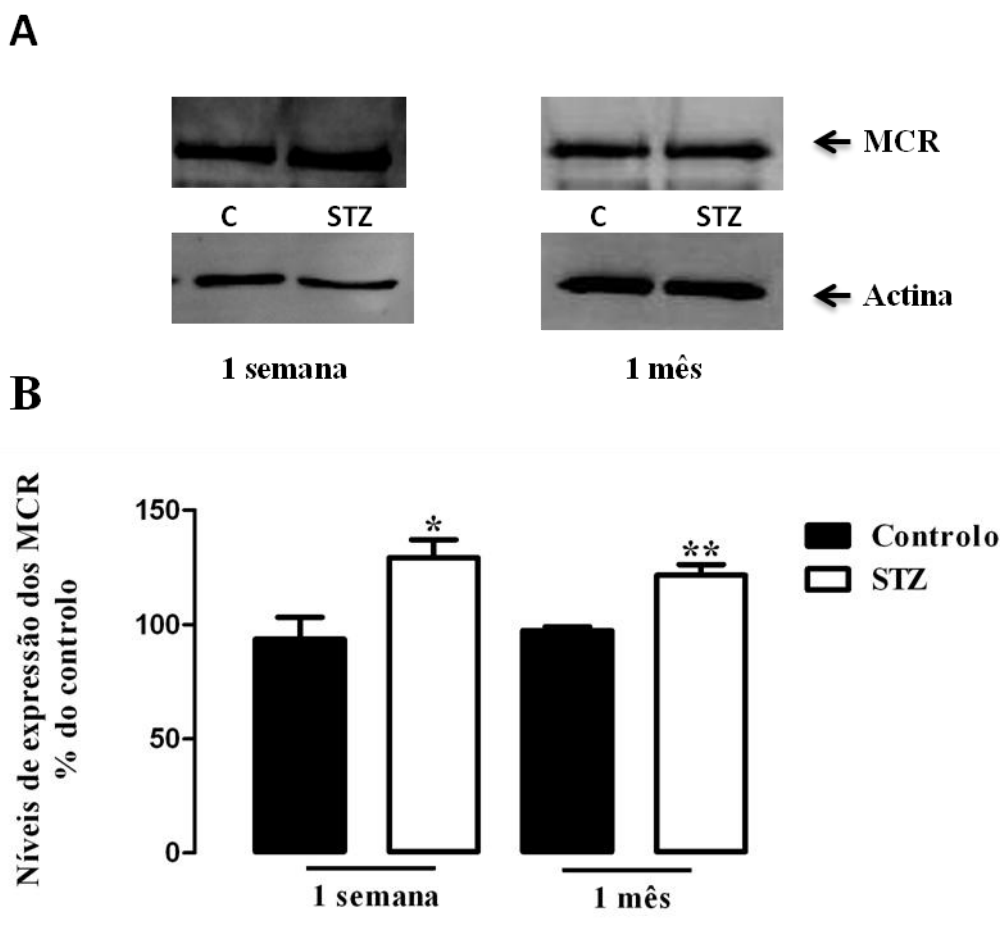


Figura 7: Efeito da diabetes, induzida por STZ, nos níveis de proteína dos MCR em retina de rato. (A) Os ratos foram sujeitos a uma injeção intraperitoneal de STZ e mantidos por um período de 7 ou 30 dias. 50 μ g de proteína, presentes na amostra, foram aplicadas num gel de 7,5 %. Realizou-se o controlo de carregamento das proteínas no gel de electroforese, utilizando a proteína actina como controlo. (B) Os níveis de proteína total foram normalizados em relação ao controlo de carregamento e expressos como percentagem do grupo controlo. As barras representam valores médios \pm S. E. de 4-5 experiências independentes. * $p < 0,03$, ** $p < 0,01$, diferença significativa em relação ao controlo; Teste t.

3.2- Efeito da diabetes/hiperglicemia na aldosterona sintetase

A aldosterona, uma hormona esteroide, é sintetizada principalmente nas glândulas supra-renais por acção de três enzimas principais: 21-hidroxilase, 11- β -hidroxilase e pela aldosterona sintetase (Wilkinson-Berka et. al., 2009). No entanto, vários estudos têm já demonstrado que esta hormona pode ser sintetizada fora das glândulas supra-renais. Num estudo realizado por Wilkinson-Berka foi demonstrado que os genes das enzimas responsáveis pela síntese da aldosterona são expressos na retina (Wilkinson-Berka et. al., 2009). Sabe-se também que os níveis de aldosterona no plasma estão aumentados em pacientes com diabetes (Hollenberg, N. K. et. al., 2004) e em modelos animais com diabetes do tipo 1 (O'Neill, H. et. al., 2008) e do tipo 2 (Fredersdorf, S. et. al., 2009), o que sugere que os níveis das enzimas responsáveis pela síntese da aldosterona possam ser afectados. Contudo, não é ainda conhecido se de facto a diabetes/hiperglicemia afecta as enzimas responsáveis pela síntese da aldosterona na retina. Por este motivo estudamos o efeito da diabetes/hiperglicemia nos níveis de proteína da aldosterona sintetase, enzima envolvida no último passo da síntese de aldosterona.

O estudo foi realizado em retinas de modelos de animais diabéticos e em culturas celulares de retina expostas a elevadas concentrações de glicose. Os resultados para as culturas celulares de retina estão representados na figura 8.

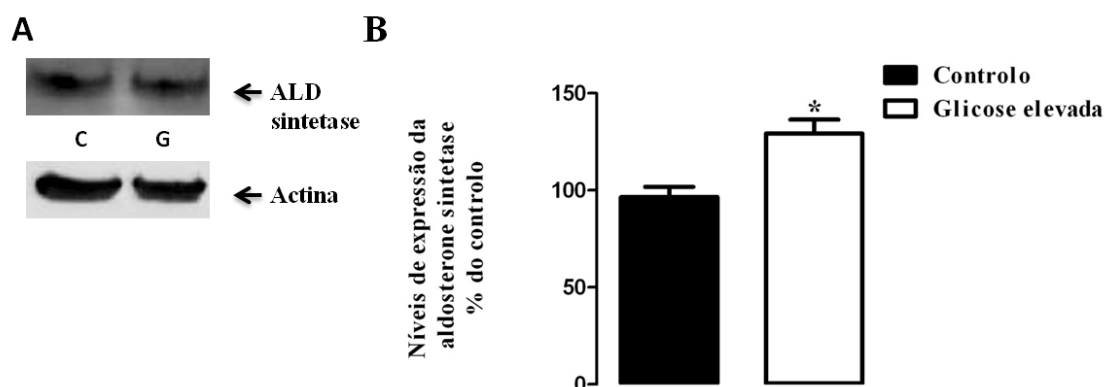


Figura 8: Níveis totais de proteína da aldosterona sintetase em culturas celulares de retina. (A) As células foram incubadas com 30 mM de glicose, mimetizando condições hiperglicémicas, por um período de 7 dias. 100 μ g de proteína, presentes na amostra, foram aplicadas num gel de 7,5 %. Realizou-se o controle de carregamento das proteínas no gel de electroforese, utilizando a proteína actina como controlo. (B) Os níveis de proteína total foram normalizados em relação ao controlo de carregamento e expressos como percentagem do grupo controlo. As barras representam valores médios \pm S. E. de 4 experiências independentes. * $p < 0.05$, diferença significativa em relação ao controlo; Teste t.

Como se pode observar pela figura 8, quando as culturas celulares foram expostas a elevadas concentrações de glicose, mimetizando condições de hiperglicemia, os níveis de proteína da aldosterona sintetase aumentaram significativamente em relação à situação controlo. Este aumento foi de aproximadamente 30% ($129,3 \pm 7,1$ % do controlo).

Relativamente aos resultados obtidos no estudo com retinas de animais diabéticos, observou-se que nos animais mantidos por 7 dias após injeção de STZ ocorria um aumento dos níveis de proteína da aldosterona sintetase. O aumento foi de $100 \pm 11,6$ % para $192,1 \pm 16,4$ %, como se pode observar através da figura 9.

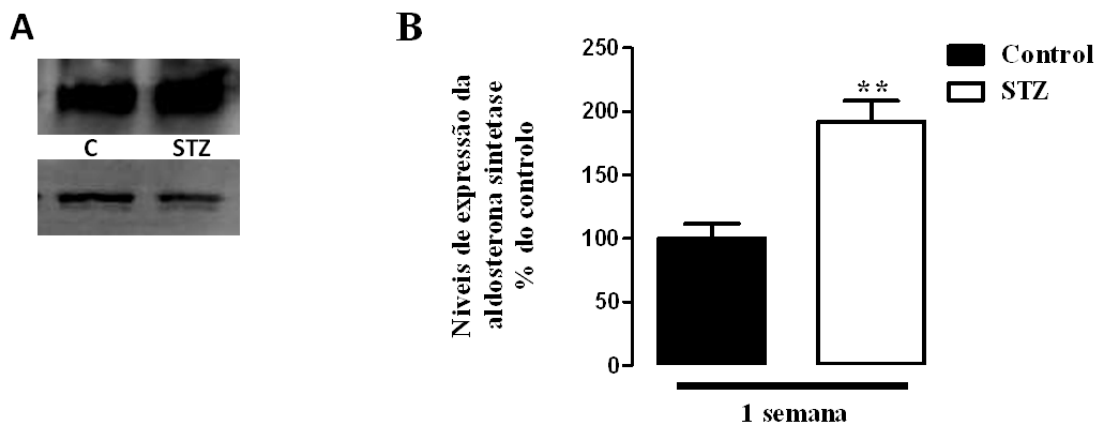


Figura 9: Efeito da diabetes, induzida por STZ, nos níveis de proteína da aldosterona sintetase em retinas de rato. (A) Os ratos foram sujeitos a uma injeção intraperitoneal de STZ e mantidos por um período de 7 dias. 100 µg de proteína, presentes na amostra, foram aplicadas num gel de 7,5 %. Realizou-se o controle de carregamento das proteínas no gel de electroforese, utilizando a proteína actina como controlo. (B) Os níveis de proteína total foram normalizados em relação ao controlo de carregamento e expressos como percentagem do grupo controlo. As barras representam valores médios \pm S. E. de 4-5 experiências independentes. * $p < 0.005$, diferença significativa em relação ao controlo; Teste t.

3.3- Efeito da diabetes nos níveis da aldosterona

Como já foi referido anteriormente, vários estudos têm demonstrado que os níveis de aldosterona no plasma estão aumentados em pacientes com diabetes, o que sugere que a diabetes pode afectar a síntese desta hormona. Pelos resultados apresentados anteriormente, vimos que os níveis de uma das enzimas (aldosterona sintetase) responsáveis pela síntese da aldosterona, tanto em culturas celulares de retina expostas a

elevadas concentrações de glicose como em modelos de animais diabéticos, se encontram aumentados. O que nos permite induzir que em condições de diabetes / hiperglicemia poderá ocorrer um aumento da síntese de aldosterona.

Por forma a confirmar o aumento dos níveis de aldosterona, os níveis desta hormona foram medidos no plasma de ratos diabéticos mantidos por um mês após injeção de STZ. Os resultados obtidos estão ilustrados na figura 10.

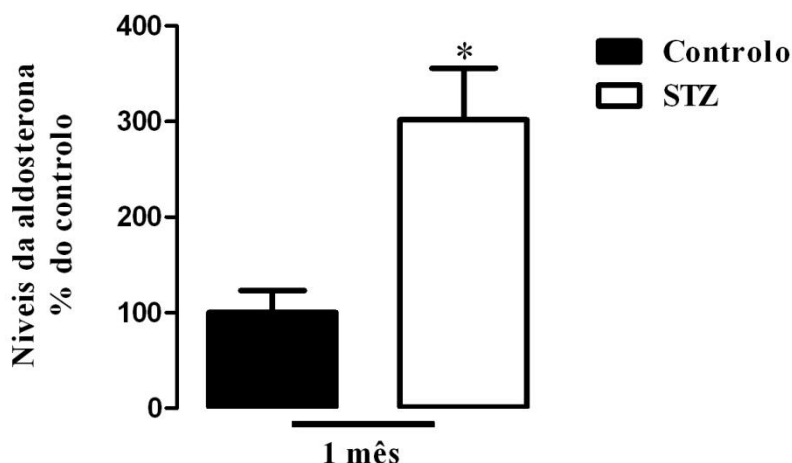


Figura 10: Efeito da diabetes, induzida por STZ, na concentração de aldosterona no plasma. Os ratos foram sujeitos a uma injeção intraperitoneal de STZ e mantidos por um período de 30 dias. Os valores foram expressos em percentagem do grupo controlo. As barras representam valores médios ± S. E. de 3-4 experiências independentes. * $p < 0.03$, diferença significativa em relação ao controlo; Teste t.

Como se pode observar na figura 10, os níveis de aldosterona, no plasma de ratos diabéticos, mantidos por um mês após injeção de STZ, triplicaram atingindo $301,9 \pm 54,05$ % do controlo (em pg/mL triplicou para $879,7 \pm 157,5$).

3.4- Efeito do antagonismo dos MCR na morte celular induzida pela hiperglicemia

Vários estudos têm já demonstrado que a diabetes/hiperglicemia causam morte das células neuronais da retina e promovem o aumento dos níveis de aldosterona (Chaturvedi, N. et. al., 2008; Moravski, C. J. et. al., 2003; Sjolie, A. K. et. al., 2008). Em estudos preliminares feitos pelo nosso grupo foi observado que a aldosterona potencia a morte celular na retina em condições hiperglicémicas e que o antagonismo

dos MCR, com eplerenona, previne este efeito. Dado que os níveis de aldosterona estão aumentados na diabetes, os resultados preliminares sugerem que a aldosterona pode estar envolvida na morte celular observada na retina de ratos diabéticos. Possivelmente através da sua acção sobre os MCR, que leva a um aumento dos mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- α e IL-6, provocando a morte celular na retina.

Com o intuito de testar esta hipótese, foram usadas culturas celulares de retinas de rato para avaliar o potencial efeito neuroprotector do antagonismo dos receptores mineralocorticóides. As culturas celulares de retina foram mantidas em condições controlo (5 mM de glicose; controlo) ou na presença de glicose 30 mM (condições hiperglicemiantes). Após quatro dias foram incubadas com aldosterona 10^{-7} M (+ALD), eplerenona 10^{-5} M (+EPL) ou com aldosterona mais eplerenona (+ALD+EPL). A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).

Os resultados obtidos estão representados na figura 11.

Como visto em estudos anteriores, a exposição das células da retina de rato a elevadas concentrações de glicose (30 mM) causa uma redução na viabilidade celular (Costa, et. al., 2012; Santiago, et.al., 2007).

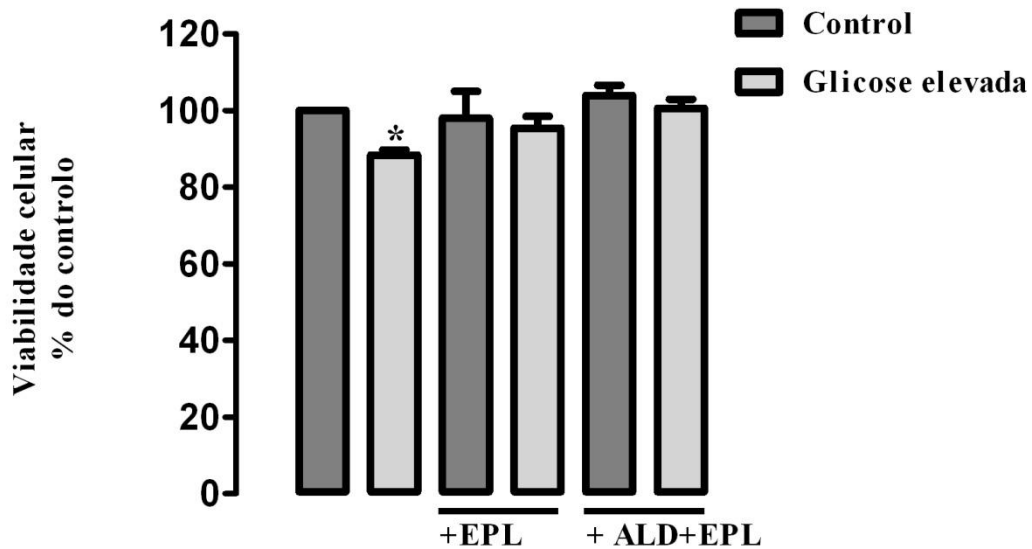


Figura 11: Efeito da modulação dos MCR na viabilidade celular de culturas celulares de retina expostas a condições hiperglicémicas. Culturas celulares de retina em situação controlo (5 mM de glicose; controlo) ou na presença de 30 mM de glicose (glicose elevada), após 4 dias em cultura foram incubadas com eplerenona 10^{-5} M (+ EPL) ou com aldosterona 10^{-7} M e eplerenona 10^{-5} M (+ALD+EPL), um antagonista dos receptores mineralocorticóides. A viabilidade celular foi medida como foi descrito previamente no ensaio do MTT. O MTT, quando na presença de células vivas, é convertido a um precipitado insolúvel em água de cor azul por desidrogenases celulares. As barras representam valores médios \pm S. E. de 6-9 experiências independentes, realizadas em duplicado. * $p < 0.05$, diferença significativa em relação ao controlo; one-way ANOVA seguido pelo teste Dunnett post hoc.

Quando as culturas celulares foram expostas a elevadas concentrações de glicose ocorreu uma diminuição significativa da viabilidade celular ($88,4 \pm 1,4$ %) relativamente ao controlo. No entanto, quando as culturas em situação de hiperglicemia foram incubadas com eplerenona, antagonista dos receptores MCR, este efeito foi prevenido, observando-se uma redução da viabilidade para $95,42 \pm 3,1$ % do controlo. Efeito semelhante foi observado nas culturas incubadas com eplerenona e aldosterona, o efeito da diminuição na viabilidade celular foi anulado ($100,6 \pm 2,4$ % do controlo). Em relação às culturas incubadas com eplerenona ($98,0 \pm 7,0$ % do controlo) ou eplerenona e aldosterona ($103,9 \pm 2,7$ % do controlo) não se observaram quaisquer diferenças significativas em relação ao controlo.

Contudo, este ensaio de viabilidade celular, o MTT, mostrou-se pouco sensível. Por este motivo, prosseguimos o estudo através do ensaio de iodeto de propídio. Os resultados obtidos estão representados na figura 12.

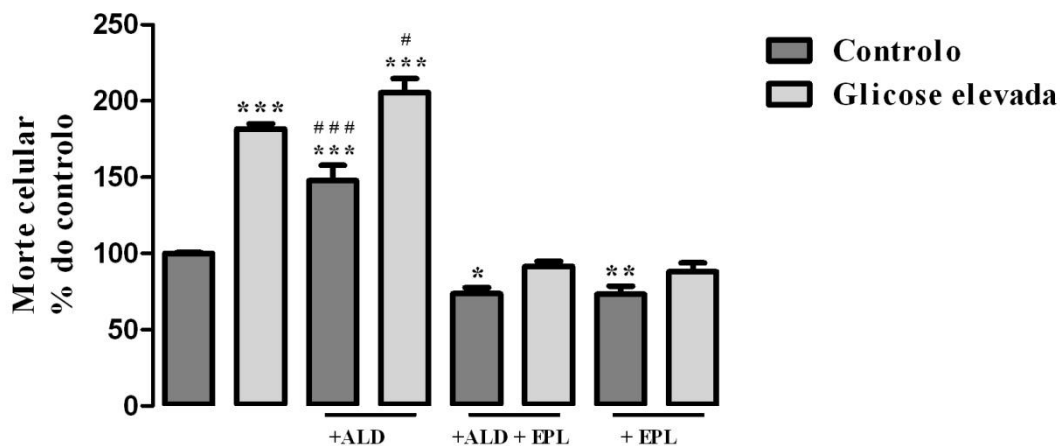


Figura 12: O antagonismo dos MCR previne a morte celular na retina induzida pela hiperglicemia. Culturas celulares de retina em situação controlo (5 mM de glicose; controlo) ou na presença de 30 mM de glicose (glicose elevada), após 4 dias em cultura foram incubadas com aldosterona 10^{-7} (+ ALD), ou eplerenona 10^{-5} M (+ EPL) ou com aldosterona 10^{-7} M e eplerenona 10^{-5} M (+ALD+EPL), um antagonista dos receptores mineralocorticóides. A morte celular foi medida como descrito previamente no ensaio do iodeto de propídeo. As barras representam valores médios \pm S. E. de 5-6 experiências independentes, realizadas em duplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0,0001$ diferença significativa em relação ao controlo; one-way ANOVA seguido pelo teste Dunnett post hoc.

Através deste ensaio podemos observar que, nas culturas expostas a elevadas concentrações de glicose, ocorreu um aumento de aproximadamente 80 % ($181,8 \pm 3,2$ %) da morte celular relativamente ao controlo ($100 \pm 0,7$ %). A aplicação de aldosterona ao quarto dia de cultura aumentou a morte celular, quer em situações controlo ($147,7 \pm 10,1$ % do controlo), quer nas células cultivadas na presença de alta glicose ($205,5$ % do controlo). O antagonismo dos MCR com eplerenona não só a morte celular induzida por aldosterona, quer nas células cultivadas em condições controlo ($73,7 \pm 3,9$ % do controlo), quer nas células cultivadas em condições de alta glicose ($91,5 \pm 3,4$ % do controlo), mas também o aumento da morte celular induzida apenas pela exposição das células a altas concentrações de glicose ($73,1 \pm 5,5$ % do controlo).

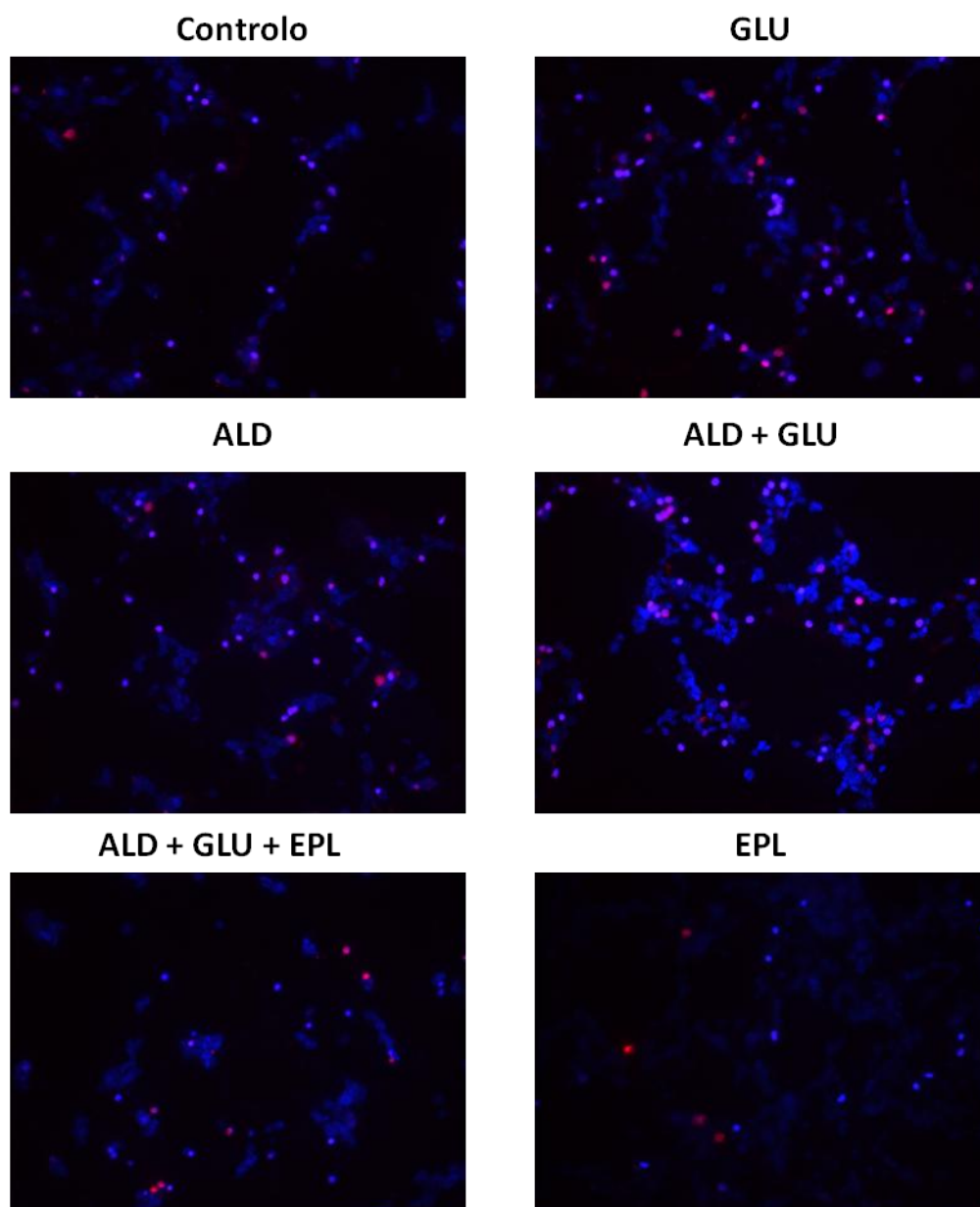


Figura 13: O antagonismo dos MCR previne a morte celular na retina induzida pela hiperglicemia. Imagens de microscopia de fluorescência representativas da morte celular na retina induzida pela hiperglicemia. Culturas celulares de retina em situação controlo (5 mM de glicose; controlo) ou na presença de 30 mM de glicose (glicose elevada), após 4 dias em cultura foram incubadas com aldosterona 10^{-7} (+ ALD), ou eplerenona 10^{-5} M (+ EPL) ou com aldosterona 10^{-7} M e eplerenona 10^{-5} M (+ALD+EPL), um antagonista dos receptores mineralocorticóides. A morte celular foi medida como descrito previamente no ensaio do iodeto de propídeo.

3.5- Efeito do antagonismo dos MCR no tipo de morte celular induzida pela hiperglicemia

Por forma a perceber se a morte celular na retina ocorre por apoptose ou necrose, recorreremos à análise da morfologia nuclear. Este método foi usado para complementar os estudos de viabilidade celular, efectuados com o ensaio do MTT, e os estudos de morte celular, efectuados pelo ensaio do iodeto de propídio. O estudo foi realizado em culturas de células da retina mantidas em condições controlo (5 mM de glicose; controlo) ou na presença de glicose 30 mM (condições hiperglicemiantes). Após quatro dias foram incubadas com aldosterona 10^{-7} M (+ALD), eplerenona 10^{-5} M (+EPL) ou com aldosterona mais eplerenona (+ALD+EPL). Os resultados obtidos estão representados na figura 14.

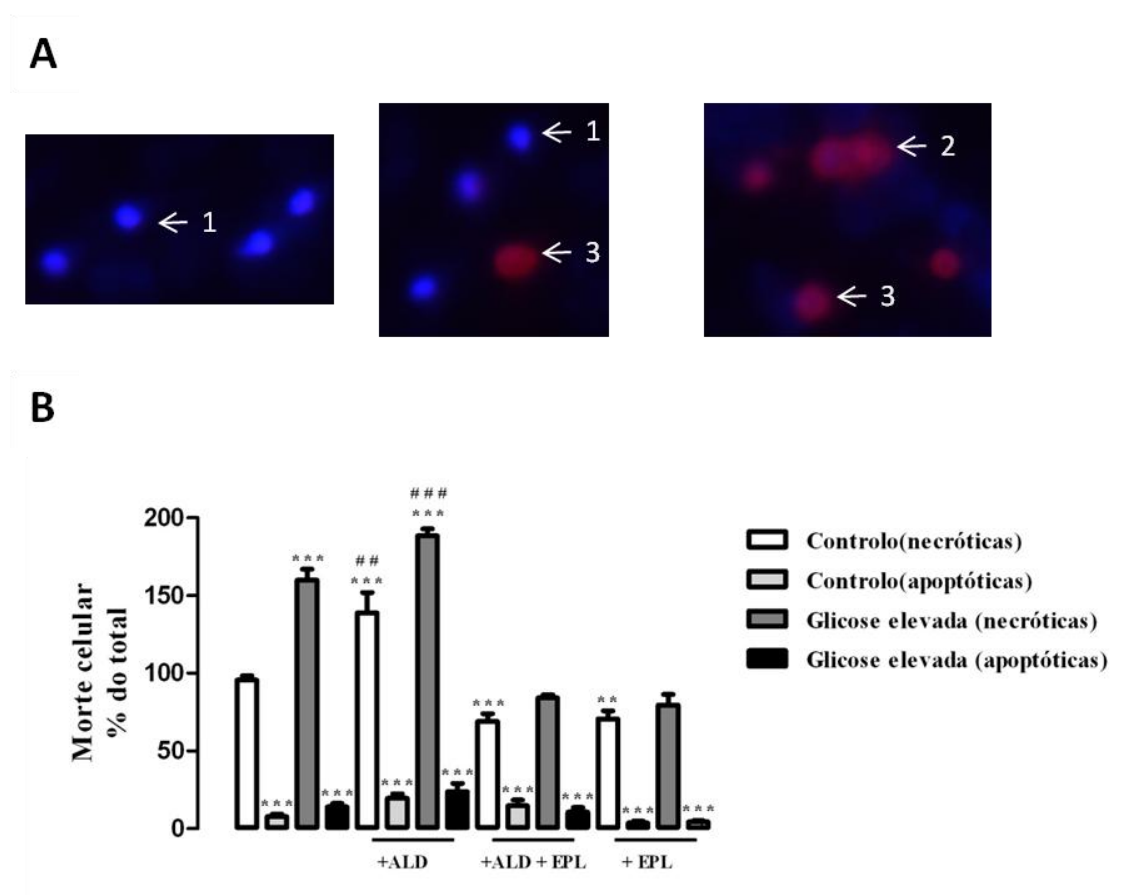


Figura 14: Efeito do antagonismo dos MCR no tipo de morte celular induzida pela hiperglicemia. (A) Imagens de microscopia de fluorescência representativas dos diversos tipos de morfologia das células da retina em cultura. 1 – cultura com núcleo de célula apoptótica corado de azul (seta); 2-cultura controlo com núcleo de célula em necrose secundária corado de vermelho (PI) (seta); 3- cultura com núcleo de célula necrótica corado de vermelho. Todas as imagens foram adquiridas com uma ampliação de 40 ×. (B) Culturas celulares de retina em situação controlo (5 mM de glicose; controlo) ou na presença de 30 mM de glicose (glicose elevada), após 4 dias em cultura foram incubadas com aldosterona 10^{-7} M (+ ALD), ou eplerenona 10^{-5} M (+ EPL) ou com aldosterona 10^{-7} M e eplerenona 10^{-5} M

(+ALD+EPL), um antagonista dos receptores mineralocorticóides. A morte celular foi medida pelo método do iodeto de propídio. As barras representam valores médios \pm S. E. de 5-6 experiências independentes, realizadas em duplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$ diferença significativa em relação ao controlo; one-way ANOVA seguido pelo teste Dunnett post hoc.

Em relação à morte por necrose, nas culturas expostas a elevadas concentrações de glicose, ocorreu um aumento para $159,9 \pm 7,1$ % da morte celular relativamente ao controlo. Quando as culturas foram expostas a aldosterona e a elevadas concentrações de glicose este aumento tornou-se ainda mais significativo ($188,4 \pm 4,4$ %). Contudo, na presença de eplerenona este efeito não só foi prevenido, como a morte celular diminuiu-a significativamente relativamente ao controlo, para $69,0 \pm 5,0$ %, quando as culturas celulares foram incubadas com aldosterona e eplerenona, e para $70,7 \pm 5,0$ %, quando as culturas foram expostas a eplerenona.

Através da análise da figura 14 podemos ainda observar que em todas as condições a morte por necrose se encontra aumentada relativamente à morte por apoptose. No entanto, quando as culturas celulares foram expostas a elevadas concentrações de glicose e aldosterona ocorreu um aumento significativo da morte celular por apoptose ($23,8 \pm 5,4$ %), relativamente às células apoptóticas observadas no controlo ($7,7 \pm 1,7$ % do total de células mortas). Tendo em conta que a maioria dos estudos já realizados sugerem que a morte neuronal observada na retina ocorre pelo processo apoptótico é tentador dizer que a morte pelo mecanismo de apoptose está a ser sobreposta devido a uma maior diferença na morte por necrose relativamente ao controlo.

Por forma a perceber se de facto a morte pelo processo apoptótico estará a ser sobreposto traçamos o gráfico no qual estão representados os valores correspondentes à razão entre morte celular por necrose e apoptose. Os resultados estão representados na figura 15.

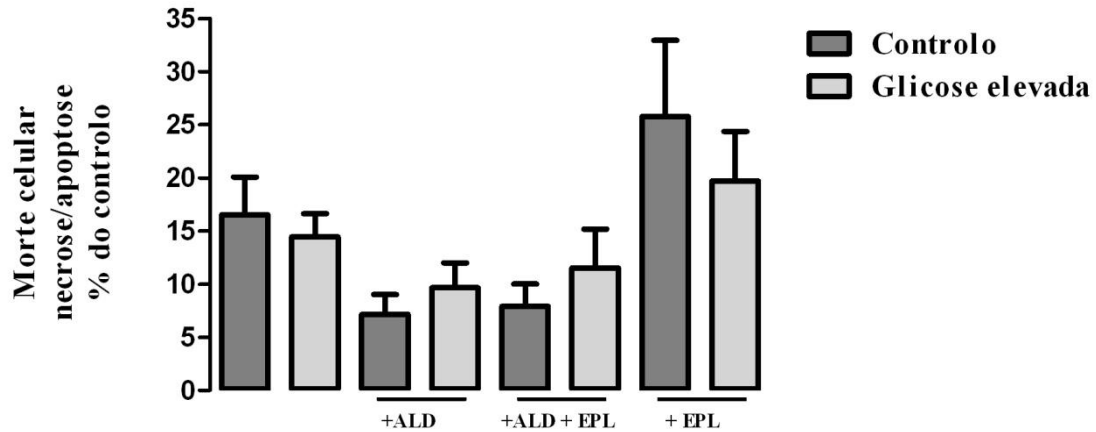


Figura 15: Efeito do antagonismo dos MCR no tipo de morte celular induzida pela hiperglicemia. Culturas celulares de retina em situação controle (5 mM de glicose; controle) ou na presença de 30 mM de glicose (glicose elevada), após 4 dias em cultura foram incubadas com aldosterona 10^{-7} (+ ALD), ou eplerenona 10^{-5} M (+ EPL) ou com aldosterona 10^{-7} M e eplerenona 10^{-5} M (+ALD+EPL), um antagonista dos receptores mineralocorticóides. A morte celular foi medida como descrito previamente no ensaio do iodeto de propídeo. Este ensaio baseia-se na permeabilidade selectiva da membrana plasmática aos marcadores de DNA utilizados. A membrana plasmática não é permeável ao iodeto de propídeo, que entra na célula apenas quando a membrana celular apresenta rupturas, enquanto que o Hoechst permeia a membrana plasmática, penetrando em células com a membrana celular intacta. As barras representam valores médios \pm S. E. de 5-6 experiências independentes, realizadas em duplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$ diferença significativa em relação ao controle; one-way ANOVA seguido pelo teste Dunnett post hoc.

Como se pode observar pela figura 15, em nenhuma das condições estudadas ocorreram diferenças estatisticamente significativas na razão entre a percentagem de morte celular por necrose e apoptose, relativamente ao controle. No entanto, quando as culturas celulares foram incubadas com aldosterona ($7,1 \pm 1,9$) e aldosterona mais eplerenona ($7,9 \pm 2,1$) observa-se uma diminuição na razão entre a percentagem de morte celular por necrose e apoptose, relativamente ao controle ($16,5 \pm 3,6$).

Capitulo 4

Discussão

4.1- Discussão

O RAAS é o sistema responsável pelo controlo da pressão arterial, volémia e equilíbrio hidroelectrolítico. Nos últimos 20 anos têm vindo a surgir evidências de que todos os componentes do RAAS são expressos na retina e que a angiotensina II, o péptido efectivo principal do RAS, regula a função retiniana (Fletcher EL et. al., 2010). Além disso, a desregulação do RAS foi implicada em doenças vasculares da retina, tais como a retinopatia da prematuridade e a retinopatia diabética. Em particular os agentes que inibem o RAAS, previnem o desenvolvimento de uma variedade de efeitos patológicos em modelos animais e em pacientes com retinopatia diabética (Fletcher EL et. al., 2010).

A angiotensina II é uma das principais promotoras da síntese de aldosterona, através da sua ligação aos AT₁R_s. Recentemente alguns estudos realizados têm mostrado que a aldosterona é responsável pela homeostase entre sais e água na retina (Min Zhao et. al., 2010). A aldosterona é uma hormona esteroide que actua através da sua ligação aos receptores mineralocorticóides. Apresenta-se já descrito que o mRNA dos receptores mineralocorticóides está presente na parte vascular da retina, nas células ganglionares, na camada nuclear interna e no epitélio pigmentado da retina de ratos Sprague – Dawley (Wilkinson-Berka et. al., 2009). A diabetes altera os níveis de expressão e de proteína de vários receptores e os MCR não são excepção. Foi já demonstrado que os níveis de mRNA e de proteína estão aumentados em rins de diferentes modelos diabéticos (Guo et. al., 2006). No entanto, o efeito da diabetes/hiperglicemia nos níveis de proteína dos MCR na retina não era ainda conhecido. Por esse motivo nós estudamos o efeito da diabetes/hiperglicemia na expressão dos MCR em dois modelos celulares: culturas celulares de retinas de ratos Wistar com 3-5 dias expostas a altas concentrações de glicose e em retinas isoladas a partir de ratos controlo e diabéticos.

4.1.1- Efeito da diabetes/hiperglicemia nos receptores mineralocorticóides

Neste trabalho podemos não só confirmar a presença dos MCR na retina, mas também observar que os níveis de proteína total dos MCR estão aumentados em

culturas celulares de retinas, expostas a elevadas concentrações de glicose (figura 6), e em modelos animais diabéticos (figura 7).

O aumento nos níveis de proteína dos MCR pode ser devido à activação do RAAS em condições de hiperglicemia na retina. Tem sido descrito em vários estudos que a diabetes leva ao aparecimento da hipertensão e conseqüentemente à activação dos sistema renina-angiotensina aldosterona (Fletcher, et. Al., 2010). Está já estabelecido que todos os componentes do sistema renina angiotensina são expressos na retina, incluindo o angiotensinogénio, pró-renina e a angiotensina I e II. Para além disso, alguns estudos têm descrito a existência de uma grande diferença nas concentrações de AngII, pró-renina e renina na retina de pacientes diabéticos comparativamente com as suas concentrações no plasma (Berka et. al., 1995; Danser et. al., 1994). A angiotensina II não consegue atravessar a barreira hematoretiniana, o que sugere que o aumento da concentração da Ang II observado na retina seja devido à sua síntese dentro da retina (Danser et. al., 1994). O aumento de Ang II por si só não teria qualquer efeito. No entanto, foi já descrito que os receptores (AT1R e AT2R), através dos quais a Ang II promove os seus efeitos celulares, são expressos na retina (células da glia e vasos sanguíneos expressam AT1R e os AT2R são expressos em células amacrinas) (Downie et. al., 2009; Murphy et. al., 1991). Quando a Ang II se liga aos receptores AT₁R, para além de induzir estado pró-inflamatório, pró-trombótico e pró-fibrótico, esta ligação vai induzir a síntese de aldosterona (Brown NJ, 2008). Por sua vez, um aumento dos níveis de aldosterona na retina, podem levar ao aumento dos MCR, pois é a partir destes receptores que a aldosterona apresenta a maioria dos seus efeitos biológicos.

Contudo, permanecem ainda algumas questões por responder. Apesar de já estar descrito que os níveis de mRNA dos MCR estão aumentados em rins de diferentes modelos diabéticos, o efeito da diabetes/hiperglicemia nos níveis de mRNA dos MCR na retina ainda não é conhecido. Portanto, seria de interesse, por RT – PCR, estudar o efeito da diabetes/hiperglicemia na expressão dos MCR. Desta forma poderíamos compreender como os elevados níveis de expressão dos MCR ocorrem, se pelo aumento da expressão do seu gene, pelo aumento da translação do seu mRNA ou se pelo aumento destes dois factores. Finalmente, por imunohistoquímica e imunocitoquímica seria ainda possível estudar o efeito da hiperglicemia/diabetes na distribuição dos receptores mineralocorticóides.

4.1.2- Efeito da diabetes/hiperglicemia na aldosterona sintetase

Apesar de se supor que ocorre a síntese de aldosterona na retina e que esta promove o aumento dos MCR, será se de facto esta síntese ocorre na retina? Por forma a responder a esta questão e a percebermos se a diabetes/hiperglicemia afectam a síntese de aldosterona, estudamos os níveis de proteína total da aldosterona sintetase em culturas celulares expostas a elevadas concentrações de glicose e em modelos animais diabéticos.

Neste estudo observamos que, não só a aldosterona está presente na retina, mas também que os níveis de proteína total da aldosterona sintetase estão aumentados em culturas celulares de retina, expostas a elevadas concentrações de glicose (figura 8), e também nas retinas de animais diabéticos (figura 9).

A aldosterona sintetase é a enzima responsável pelo último passo na síntese de aldosterona e o aumento dos níveis de proteína desta enzima observados em condições de diabetes/hiperglicemia, leva-nos a sugerir que a aldosterona é sintetizada na retina e que os níveis desta hormona poderão estar aumentados nas retinas diabéticas. Em concordância com os nossos resultados estão alguns estudos realizados por Wilkinson-Berka e colaboradores, nos quais têm vindo a surgir evidências de que a aldosterona apresenta um importante papel no controlo da homeostasia de sais e água na retina de modelos de ratos com retinopatia induzida pelo oxigénio (OIR) (Wilkinson-Berka et. al., 2009). Neste estudo Wilkinson-Berka mostrou que a aldosterona sintetase era expressa em células da retina e que os MCR se apresentavam expressos nas células de Muller e em fotoreceptores. Para além disso, neste mesmo estudo, foi demonstrado que a aldosterona aumenta a proliferação de células endoteliais bovinas, e que o tratamento com espiranolactona, um antagonista dos receptores mineralocorticóides, reduz a angiogénese da retina em modelos de retinopatia induzida pelo oxigénio em ratos. A inflamação pode ser um importante contributo para os efeitos patológicos da aldosterona em doenças vasculares na retina. Em particular, a espiranolactona reduz a expressão de mediadores inflamatórios como a MCP-1 em modelos de ratos OIR (Wilkinson-Berka et. al., 2009). Portanto, não é de forma alguma surpreendente que a aldosterona seja sintetizada na retina em condições de hiperglicemia/diabetes.

No presente estudo podemos ainda observar que os níveis de aldosterona no plasma de ratos diabéticos se encontram aumentados. O que vem confirmar, em

conjunto com o aumento da aldosterona sintetase, que de facto a diabetes induz uma desregulação no sistema renina-angiotensina-aldosterona, que por sua vez vai permitir um aumento da síntese de aldosterona.

Contudo, surge a dúvida se em condições de hiperglicemia/diabetes o aumento verificado nos níveis de aldosterona no plasma ocorre também na retina. Assim, por forma a confirmar a síntese de aldosterona na retina, seria importante no futuro quantificar os seus níveis não apenas no plasma, mas também na retina, pois, a aldosterona, sendo uma molécula de elevado peso molecular e apesar de a barreira hemoretiniana se apresentar danificada na diabetes, não consegue atravessar esta barreira. Para além disso, seria ainda importante perceber de que modo a aldosterona sintetase se encontra distribuída na retina e se os seus níveis de mRNA se encontram aumentados em condições de diabetes/hiperglicemia.

A aldosterona sintetase é uma das enzimas principais na síntese de aldosterona, mas não a única. Por este mesmo motivo era essencial avaliar, por RT-PCR e Western-blotting, o efeito da diabetes/hiperglicemia nos níveis de expressão e proteína das duas outras enzimas envolvidas na síntese da aldosterona (21-hidroxilase e 11- β -hidroxilase).

Em resumo, poderíamos estudar o efeito da diabetes/hiperglicemia nos níveis de aldosterona na retina e confirmar que a síntese desta hormona ocorre na retina.

4.1.3- Efeito do antagonismo dos MCR na morte celular induzida pela hiperglicemia

Ao longo dos últimos 20 anos têm vindo a surgir evidências de que todos os componentes do RAAS são expressos na retina e a desregulação do RAAS tem sido implicada em doenças vasculares da retina como a retinopatia da prematuridade e a retinopatia diabética. Uma abordagem terapêutica sobre o RAAS pode ser efectuada em várias etapas da sua cascata, tendo sido os primeiros estudos direccionados para as alterações vasculares provocadas pela desregulação deste sistema, ao nível da angiotensina (Fletcher EL et. al., 2010). No entanto, mostramos anteriormente a existência na retina de enzimas envolvidas na síntese de aldosterona bem como da presença dos seus receptores (receptores mineralocorticóides, MCR). A aldosterona é conhecida como um importante regulador da homeostase do volume e balanço de sódio, e é agora reconhecida como um potente mediador pró-fibrotico no coração, vasculatura,

e nos rins. Wilkinson-Berka e colaboradores estenderam este conceito para os olhos. Usando um modelo de rato com retinopatia induzida por oxigênio, demonstraram que o bloqueio dos MCR com a espiranolactona, diminui a angiogénese da retina pela atenuação da leucostase e diminuição das respostas inflamatórias (Wilkinson-Berka et. al., 2009). Apesar destes efeitos promissores através do bloqueio dos MCR no tratamento da componente vascular da retinopatia diabética, muito pouco se sabe sobre o possível efeito do antagonismo da aldosterona ou MCR na parte neural da retina.

Desta forma, estudamos o potencial efeito neuroprotector do antagonismo dos MCR.

Tal como observado em estudos anteriores (Santiago et. al., 2007; Costa et. al., 2012) verificámos que a viabilidade celular se encontra diminuída quando as culturas celulares de retina foram expostas a elevadas concentrações de glicose. Contudo, este efeito foi prevenido na presença de eplerenona, um antagonista dos receptores mineralocorticóides, o que sugere que o antagonismo dos MCR previne a morte neuronal na retina em condições de diabetes/hiperglicemia. Estes resultados foram confirmados pelo estudo onde avaliamos o efeito do antagonismo dos MCR na morte celular de culturas celulares de retina, onde podemos observar que, nas culturas expostas a elevadas concentrações de glicose, o número de células mortas aumentou em cerca de 80% relativamente ao controlo. O aumento tornou-se mais significativo quando as culturas foram expostas a elevadas concentrações de glicose e aldosterona. No entanto, na presença de eplerenona, um antagonista dos MCR, este efeito não só foi prevenido, como a morte celular diminuiu significativamente em relação ao controlo. Mesmo nas culturas controlo, a aplicação do antagonista dos MCR induziu uma redução do número de células mortas. Assim, estes resultados não só confirmam que a diabetes/hiperglicemia induz a morte neuronal na retina, como mostram que o antagonismo dos MCR previne a morte neuronal na retina induzida pela diabetes/hiperglicemia, sugerindo que a aldosterona que pode estar a ser sintetizada endogenamente, possa ser a responsável, pelo menos em parte, pela morte de neurónios da retina que ocorre em situações de diabetes/hiperglicemia.

Um possível mecanismo para a morte neuronal observada na presença de elevadas concentrações de glicose e aldosterona é a desregulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Vários estudos têm demonstrado que a desregulação deste sistema induz o aumento da síntese de Ang II e, conseqüentemente, de aldosterona. A aldosterona, que actua através da sua ligação aos receptores mineralocorticóides, leva ao aumento da

expressão de factores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-6, e conseqüentemente à morte celular (Siragy, H. M. e Xue, C, 2008; Han, S. Y. et. al., 2006; Mathew, J. T. et. al., 2008). Vários estudos têm já demonstrado que os factores inflamatórios na retina são cruciais na progressão da RD. Foi demonstrado, em culturas celulares de retina, expostas a elevadas concentrações de glicose, que os níveis do mRNA do TNF- α aumentam (Costa G. N. et. al., 2012). Em retinas diabéticas, os níveis de TNF- α estão também aumentados (Gustavsson C. et. al., 2008) e resultados obtidos pelo nosso grupo mostram que a neutralização da acção do TNF- α , com anticorpos anti-TNFR1 previne a morte celular na retina induzida pela diabetes/hiperglicemia (Costa G. N. et. al., 2012). Estudos realizados noutras patologias que envolvem aumento dos níveis de TNF- α mostraram que a eplerenona inibiu o processo de shedding de TNF- α pela TACE, reduzindo assim os níveis da citoquina pró-inflamatória TNF- α (Satoh M. et al., 2006).

Portanto, é possível que a aldosterona, e a activação dos MCR, possam contribuir para o aumento dos níveis TNF- α na retina e, desse modo, ser responsável pela morte de neurónios que acontece nas fases iniciais da retinopatia diabética.

No entanto, não só a aldosterona se pode ligar e activar os receptores mineralocorticóides. Os MCR apresentam também afinidade na ligação de 11- β -hidroxiglucocorticóides, como a corticosterona e o cortisol, que são 100 a 1000 vezes mais abundantes no plasma do que a aldosterona (Guo C, 2006). O que sugere que a morte celular induzida pela diabetes/hiperglicemia possa ser devida à activação dos MCR por alguns destes glucocorticóides e não apenas pela aldosterona. Seria importante, no futuro próximo, estudar não só os níveis destas hormonas na retina mas também a expressão e níveis proteico da proteína 11- β -hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 2. Esta enzima confere especificidade à aldosterona na activação dos MCR, através da inactivação dos 11- β -hidroxiglucocorticóides., Estudos recentes mostraram a coexpressão dos MCR com a enzima 11- β -hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 2 nas células de Muller da retina, o que permite condições de especificidade para a ligação da aldosterona aos MCR. Assim, este trabalho permite-nos induzir que a morte celular na retina observada no nosso estudo, em condições de hiperglicemia, poderá dever-se à activação dos MCR pela aldosterona (Min Zhao et. al., 2010).

Um estudo recente realizado por Min Zhao e colaboradores (Min Zhao et. al., 2010) mostrou que a aldosterona aumenta a expressão dos canais de ENaC- α , Kir4.1 e AQP4 através da sua ligação aos MCR, o que sugere que a aldosterona controla a

hidratação na retina através da regulação da expressão dos canais responsáveis pela entrada e saída de iões e água. Para além disso, os autores mostraram ainda que a aldosterona promove a localização dos canais Kir4.1 e AQP4 para a região apical das células de Muller, junto ao epitélio pigmentado da retina, que forma a barreira entre a parte neural da retina e os vasos coroides. Estes resultados permitem-nos induzir que a ligação da aldosterona aos MCR poderá desregular a homeostasia normal de fluidos na retina. Neste estudo foi ainda demonstrado que a aldosterona promovia a acumulação de fluidos na retina (Min Zhao et. al., 2010).

Desta forma, o estudo descrito anteriormente veio comprovar que a aldosterona apresenta de facto um importante papel no desenvolvimento da retinopatia diabética. Esta hormona esteroide, não só induz o aumento de mediadores inflamatórios que levam a morte celular na retina, como promove a desregulação da homeostasia normal de fluidos e a sua acumulação na retina.

4.1.4- Efeito do antagonismo dos MCR no tipo de morte celular induzida pela hiperglicemia

Um dos mecanismos de morte celular na retina, em situações de diabetes/hiperglicemia, é a apoptose. As capazes, enzimas envolvidas no processo de apoptose, estão aumentadas em pacientes com diabetes e em modelos de animais diabéticos (Barber et. al., 1998; Kern e Barber, 2008). Vários estudos têm também demonstrado que a proteína pró-apoptótica Bax está associada com doenças degenerativas e em geral está aumentada em retinas de ratos diabéticos, confirmando, deste modo, o aumento da apoptose na retina (Kern, Du, Miller, Hatala e Levin, 2010).

Por outro lado, tem vindo a ser demonstrado em modelos experimentais de diabetes, que para além da apoptose, outro dos potenciais mecanismos da morte celular na retina é a activação da glia (Barber et. al., 1998; Barber, 2003). Na retinopatia diabética, tanto as células da glia como as células neuronais estão comprometidas, o que promove a desregulação das funções metabólicas e dos factores neurotróficos envolvidos na morte neuronal da retina (Whitmire, Al-Gayyar, Abdelsaid, Yousufzai e El-Remessy, 2011).

No presente trabalho, observamos que a morte celular em culturas celulares de retina, expostas a elevadas concentrações de glicose, ocorre maioritariamente pelo

processo de necrose. No entanto, pela figura 14, podemos também observar, apesar de estes valores não serem estatisticamente significativos, que quando as culturas celulares foram incubadas com aldosterona ou aldosterona e eplerenona ocorreu uma diminuição na razão entre a percentagem de morte celular por necrose e apoptose, relativamente ao controlo, o que sugere que nestas condições ocorreu um aumento superior da morte celular por apoptose. Contudo, para concluir mais inequivocamente sobre o processo de morte celular, será conveniente obter uma caracterização morfológica mais detalhada, por microscopia electrónica. Para além de estudos de caracterização morfológica seria também importante quantificar os níveis das enzimas envolvidas no processo de apoptose na retina de modelos animais diabéticos.

Capitulo 5

Conclusão

5.1- Conclusão

O principal objectivo deste trabalho foi investigar se a aldosterona e os seus receptores desempenham um papel na morte de neurónios da retina que ocorre nas fases iniciais da retinopatia diabética, mesmo antes da detecção de lesões vasculares.

Neste trabalho podemos não só confirmar a presença dos MCR na retina, mas também observar que os seus níveis de proteína se encontram aumentados na diabetes. A aldosterona sintetase, a enzima responsável pela síntese de aldosterona, encontra-se expressa na retina e os seus níveis de proteína estão aumentados na diabetes, o que sugere que a aldosterona pode ser sintetizada na retina. Para além de aldosterona poder ser sintetizada na retina, confirmamos que os seus níveis no plasma se encontram aumentados em modelos animais diabéticos. Os estudos de viabilidade e morte celular vieram demonstrar o envolvimento do sistema renina-angiotensina-aldosterona na morte neuronal da retina. Através destes estudos podemos observar que o antagonismo dos receptores mineralocorticóides previne a morte neuronal da retina que ocorre nas fases iniciais da retinopatia diabética.

Isso poderá funcionar como uma nova abordagem farmacológica para o tratamento/prevenção da retinopatia diabética, a principal causa de cegueira em adultos. Esta abordagem farmacológica é de extrema importância, pois poderá prevenir a progressão da RD, quer a nível vascular, quer a nível dos efeitos que se observam na parte neuronal da retina e que antecedem as alterações vasculares. Consequente, esta abordagem terapêutica poderá evitar a perda de visão dos pacientes que apresentam esta patologia e cujo número continua a aumentar a nível mundial.

Capítulo 6

Prespectivas futuras

6.1- Perspectivas futuras

Para além de todos os estudos referidos na discussão, futuramente, seria ainda importante, através de estudos imunohistoquímicos, usando anticorpos contra vários tipos de neurónios e células da glia presentes na retina, estudar o efeito do antagonismo dos MCR na estrutura da retina, que é afectada em animais diabéticos.

O eletrorretinograma (ERG) é uma técnica não invasiva que detecta a actividade eletrofisiológica da retina. O ERG apresenta vários componentes característicos, muito parecidos com o electroencefalograma, e alguns destes componentes estão alterados em modelos animais diabéticos. Foi observado em pacientes diabéticos (Simonsen S. E., 1980), em modelos animais com diabetes do tipo I, induzida por STZ (Mihaly K. et. al., 1998) e em ratos Goto-Kakizaki, um modelo animal de diabetes do tipo II (Matsubara H. et. al., 2006) uma redução da amplitude das ondas- β e potenciais oscilatórios reduzidos ou ausentes mesmo antes do início da retinopatia e sem alterações visíveis na retina. Estes dados sugerem que a diabetes provoca deficiências subtis na visão que são acompanhadas por alterações nas medidas eletrofisiológicas da função retiniana. Estas alterações precedem as lesões vasculares detectáveis associadas à RD e sugerem que o diabetes compromete a função dos neurónios na retina antes da barreira hematoretiniana ser significativamente alterada. Portanto, seria importante, por técnicas não-invasivas, estudar se o antagonismo dos MCR pode prevenir a morte celular na retina e, portanto, evitar complicações fisiológicas que podem ocorrer nas fases iniciais da diabetes.

Além dos efeitos genômicos mediadas pela activação dos MRC, ações da aldosterona por vias não genómicas, que são independentes da tradução e transcrição, foram já descritas. Os mecanismos que permitem estes efeitos rápidos consistem numa multiplicidade de moléculas de sinalização que incluem o TNF-alfa. Foi demonstrado, em rins de ratos diabéticos, que os níveis do mRNA do TNF-alfa aumentam e que a inibição da síntese da aldosterona reduz significativamente os níveis de TNF-alfa (Siragy, H. M. e Xue, C., 2008). Em retinas diabéticas, os níveis de TNF-alfa estão também aumentados (Gustavsson C. et. al., 2008) e resultados preliminares do nosso grupo mostram que a neutralização de TNF-alfa, com anticorpos anti-TNFR1 previne a morte celular na retina induzida pela diabetes/hiperglicemia (Costa G. N. et. al., 2012). Portanto, é possível que a aldosterona, e a activação dos MCR, possam contribuir para o aumento dos níveis TNF-alfa na retina. A prevenção da activação do receptor poderia

reduzir esses níveis de citocinas e contribuir para reduzir a morte celular observada em condições diabéticas. O estudo sobre o efeito do antagonismo dos MCR nos níveis de TNF-alfa na retina, seria importante realizar num futuro próximo.

Capitulo 7

Referências

7.1- Bibliografia

- Ankarcrona M., Dypbukt J. M., Bonfoco E., Zhivotovsky B., Orrenius S., Lipton S. A. e Nicotera P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*. 15: 961-973.
- Barber A. J., Lieth E., Khin S. A., Antonetti D. A., Buchanan A. G. e Gardner T. W. (1998) Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J.Clin.Invest*. 102: 783-791.
- Barber, A. J. (2003) A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 27: 283-290.
- Barnes, A. J., Kohner, E. M., Johnston, D. G. e Alberti, K. G. (1985). Severe retinopathy and mild carbohydrate intolerance: possible role of insulin deficiency and elevated circulating growth hormone. *Lancet*. 1: 1465–1468.
- Berka, J. L., Stubbs, A. J., Wang, D. Z., DiNicolantonio, R., Alcorn, D., Campbell, D. J. e Skinner, S. L. (1995) Renin-containing Muller cells of the retina display endocrine features. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 36: 1450-1458.
- Berridge, M. V. e Tan, A. S. (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT. *Arch Biochem Biophys*. 303: 474-482.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P e Lipton, S. A. (1995) Techniques for distinguishing apoptosis from necrosis in cerebrocortical and cerebellar neurons. In: *Neuromethods: Apoptosis techniques and protocols*. Edited by Poirier J. Humana Press, New Jersey, p 237-253.
- Brown, NJ. (2008). Aldosterone e Vascular Inflammation. *American Heart Association*. 51:161-167.

- Chaturvedi, N., Porta, M., Klein, R., Orchard, T., Fuller, J., Parving, H. H., Bilous, R. and Sjolie, A. K. (2008) Effect of candesartan on prevention (DIRECT-Prevent 1) and progression (DIRECT-Protect 1) of retinopathy in type 1 diabetes: randomised, placebo-controlled trials. *Lancet*, 372: 1394-1402.
- Christ, M. e Wehling, M. (1999) Rapid actions of aldosterone: lymphocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Steroids* 64: 35–41.
- Christ, M., Douwes, K., Eisen, C., Bechtner, G., Theisen, K. e Wehling M. (1995) Rapid effects of aldosterone on sodium transport in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 25: 117–123.
- Connell, J. M. C. e Davies, E. (2005) The new biology of aldosterona. *Journal of Endocrinology*.186: 1–20.
- Coral, K., Angayarkanni, N., Gomathy, N., Bharathselvi, M., Pukhraj, R., e Rupak, R. (2009). Homocysteine levels in the vitreous of proliferative diabetic retinopathy and rhegmatogenous retinal detachment: its modulating role on lysyl oxidase. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 50: 3607–3612.
- Costa G.N., Vindeirinho J., Cavadas C., Ambrósio A.F. e Santos P.F. (2012) Contribution of TNF receptor 1 to retinal neural cell death induced by elevated glucose. *Molecular and Cellular Neuroscience* 50: 113–123.
- Danser, A. H., Derkx, F. H., Admiraal, P. J., Deinum, J., de Jong, P. T. e Schalekamp, M. A. (1994) Angiotensin level sinthe eye. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci*. 35: 1008-1018.
- Downie, L. E., Vessey, K., Miller, A., Ward, M. M., Pianta, M. J., Vingrys, A. J., Wilkinson- Berka, J. L. e Fletcher, E. L., (2009). Neuronal and glial cell expression of angiotensin II type 1 (AT1) and type 2 (AT2) receptors in the rat retina. *Neuroscience*. 161: 195-213.
- Fletcher, E. L., Phipps, J. A., Ward, M. M., Vessey, K. A., Wilkinson-Berka, J. L. (2010). The renine angiotensina system in retinal health and disease: Its influence on neurons, glia and the vasculature. *Progressin Retinal and Eye Research*. 29: 284-311.

- Fong, D. S. (2002) Changing Times for the Management of Diabetic Retinopathy. *Survey of ophthalmology*. 47: 238-245.
- Fredersdorf, S., Endemann, D. H., Luchner, A. et al. (2009) Increased aldosterone levels in a model of type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 117: 15-20.
- Fuller, P. J. e Young M. J. (2005). *Mechanisms of Mineralocorticoid Action*. *Hypertension*. 46: 1227-1235.
- Ganapathy, P. S., Roon, P., Moister, T. K., Mysona, B. e Smith, S. B. (2009). Diabetes accelerates retinal neuronal cell death in a mouse model of endogenous hyperhomocysteinemia. *Ophthalmology Eye Diseases*. 1: 3–11.
- Gardner, T. W., Antonetti, D. A., Barber, A. J., LaNoue, K. F. e Levison, S. W. (2002) Diabetic Retinopathy: More Than Meets the Eye. *Survey of ophthalmology*. 47: 253-262.
- Giestas, A., Palma, I. e Ramos, M. H. (2010). Sistema renina-angiotensina-aldosterona. *Acta Med Port*. 23: 677-688.
- Grant, M. B., Davis, M. I., Caballero, S., Feoktistov, I., Biaggioni, I. e Belardinelli, L. (2001). Proliferation, migration, and ERK activation in human retinal endothelial cells through A(2B) adenosine receptor stimulation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 42: 2068–2073.
- Guo, C., Martinez-Vasquez, D., Mendez, G. P. et al. (2006) Mineralocorticoid receptor antagonist reduces renal injury in rodent models of types 1 and 2 diabetes mellitus. *Endocrinology*, 147: 5363-5373.
- Guo, T. e Hebrok, M. (2009). Stem Cells to Pancreatic β -Cells: New Sources for Diabetes Cell Therapy. *Endocrine Reviews*. 30: 214–227.
- Gustavsson, C., Agardh, C. D., Hagert, P. e Agardh, E. (2008) Inflammatory markers in nondiabetic and diabetic rat retinas exposed to ischemia followed by reperfusion. *Retina*. 28: 645-652.
- Han, S. Y., Kim, C. H., Kim, H. S. et al. (2006) Spironolactone prevents diabetic nephropathy through an anti-inflammatory mechanism in type 2 diabetic rats. *J Am Soc Nephro*. 17: 1362-1372.

- Harrower, A. D. e Clarke, B. F. (1976). Diabetic retinopathy with normal glucose tolerance. *The British Journal of Ophthalmology*. 60: 459–463.
- Hollenberg, N. K., Stevanovic, R., Agarwal, A., Lansang, M. C., Price, D. A., Laffel, L. M., Williams, G. H. e Fisher, N. D. (2004) Plasma aldosterone concentration in the patient with diabetes mellitus. *Kidney international*. 65: 1435-1439.
- Ismail-Beigi, F., Craven, T., Banerji, M. A., Basile, J., Calles, J., Cohen, R. M., Cuddihy, R., Cushman, W. C., Genuth, S., Grimm, R. H., Hamilton, B. P., Hoogwerf, B., Karl, D., Katz, L., Krikorian, A., O'Connor, P., Pop-Busui, R., Schubart, U., Simmons, D., Taylor, H., Thomas, A., Weiss, D. e Hramiak, I. (2010). ACCORD trial group. Effect of intensive treatment of hyperglycaemia on microvascular outcomes in type 2 diabetes: an analysis of the ACCORD randomised trial. *Lancet*. 376, 419–430.
- Kakinuma, Y., Hama, H., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Murakami, K. e Fukamizu, A., (1998) Impaired blood-brain barrier function in angiotensinogen deficient mice. *Nat. Med.* 4: 1078-1080.
- Kern, T. S. e Barber A. J. (2008). Retinal ganglion cells in diabetes. *The Journal of Physiology*. 15: 4401–4408.
- Kern, T. S., Du, Y., Miller, C. M., Hatala, D. A. e Levin, L. A. (2010) Overexpression of Bcl-2 in vascular endothelium inhibits the microvascular lesions of diabetic retinopathy. *The American Journal of Pathology*. 176: 2550–2558.
- Kuzuya, T., Nakagawa, S., Satoh, J., Kanazawa, Y., Iwamoto, Y., Kobayashi, M., Nanjo, K., Sasaki, A., Seino, Y., Ito, C., Shima, K., Nonaka, K. e Kadowaki, T. (2002) Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 55: 65–85.
- Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H. e Schubert, D. (1997) Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem*. 69: 581-593.
- Mathew, J. T., Patni, H., Chaudhary, A. N., Liang, W., Gupta, A., Chander, P. N., Ding, G. e Singhal, P. C. (2008) Aldosterone induces mesangial cell apoptosis both in vivo and in vitro. *American journal of physiology*. 295: F73-81.

- Matsubara, H., Kuze, M., Sasoh, M., Ma, N., Furuta, M. e Uji, Y. (2006) Time-dependent course of electroretinograms in the spontaneous diabetic Goto-Kakizaki rat. *Japanese journal of ophthalmology*. 50: 211-216.
- Mihaly, K., Toth, S., Szlavik, L., Toth, A. e Csermely, P. (1998) Attenuation of diabetic retinopathy by the molecular chaperone-inducer amino acid analogue canavanine in streptozotocin-diabetic rats. *Cell Mol Life Sci*. 54: 1154-1160.
- Mohamed, Q., Gillies, M. C. e Wong, T. Y. (2007) Management of Diabetic Retinopathy. *American Medical Association*. 298: 902-916.
- Moravski, C. J., Skinner, S. L., Stubbs, A. J., Sarlos, S., Kelly, D. J., Cooper, M. E., Gilbert, R. E. e Wilkinson-Berka, J. L. (2003) The renin-angiotensin system influences ocular endothelial cell proliferation in diabetes: transgenic and interventional studies. *The American journal of pathology*. 162: 151-160.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol*. 65: 55-63.
- Murphy, T. J., Alexander, R. W., Griendling, K. K., Runge, M. S. e Bernstein, K. E. (1991). Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensinII receptor. *Nature*. 351: 233-236.
- Ngarmukos, C. e Grekin, R. J. (2001) Nontraditional aspects of aldosterone physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 281: E1122-E1127.
- Nicolaidis, E. e Jones, C. Jh. (2002) Review: Type 2 diabetes -- implications for macrovascular mechanics and disease. *British Journal of Diabetes & Vascular Disease*. p 2: 9.
- Nugent, D. A., Smith, D. M, e Jones H. B. (2008) A Review of Islet of Langerhans Degeneration in Rodent Models of Type 2 Diabetes. *Toxicologic Pathology*. 36: 529-551.
- Ola, M. S., Nawaz, M. I., Siddiquei, M. M., Al-Amro, S. e El-Asrar, A. M. A. (2010) Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic retinopathy. *Journal of Diabetes and Its Complications*. p 1-9.

- O'Neill, H., Lebeck, J., Collins, P. B., Kwon, T. H., Frokiaer, J. e Nielsen, S. (2008) Aldosterone-mediated apical targeting of ENaC subunits is blunted in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant.* 23: 1546-1555.
- Patel, A., MacMahon, S., Chalmers, J., Neal, B., Billot, L., Woodward, M., Marre, M., Cooper, M., Glasziou, P., Grobbee, D., Hamet, P., Harrap, S., Heller, S., Liu, L., Mancia, G., Mogensen, C. E., Pan, C., Poulter, N., Rodgers, A., Williams, B., Bompoint, S., de Galan, B. E., Joshi, R. e Travert, F. ADVANCE Collaborative Group. (2008). Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine.* 358: 2560–2572.
- Paul, M., Poyan Mehr, A. e Kreutz, R. (2006) Physiology of local renine angiotensina systems. *Physiol.Rev.* 86: 747-803.
- Santiago, A. R., Cristóvão A. J., Santos, P. F., Carvalho, C. M. e Ambrósio A. F. (2007) High glucose induces caspase-independent cell death in retinal neural cells. *Neurobiology of Disease* 25: 464–472.
- Senanayake, P., Drazba, J., Shadrach, K., Milsted, A., Rungger-Brandle, E., Nishiyama, K., Miura, S., Karnik, S., Sears, J. E. e Hollyfield, J. G. (2007) Angiotensin II and its receptor subtypes in the human retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48: 3301-3311.
- Simonsen, S. E. (1980) The value of the oscillatory potential in selecting juvenile diabetics at risk of developing proliferative retinopathy. *Acta ophthalmologica.* 58: 865-878.
- Siragy, H. M. e Xue, C. (2008) Local renal aldosterone production induces inflammation and matrix formation in kidneys of diabetic rats. *Experimental physiology.* 93: 817-824.
- Sjolie, A. K., Klein, R., Porta, M., Orchard, T., Fuller, J., Parving, H. H., Bilous, R. e Chaturvedi, N. (2008) Effect of candesartan on progression and regression of retinopathy in type 2 diabetes (DIRECT-Protect 2): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 372: 1385-1393.

- Tikellis, C., Johnston, C. I., Forbes, J. M., Burns, W. C., Thomas, M. C., Lew, R. A., Yarski, M., Smith, A. I. e Cooper, M. E. (2004) Identification of angiotensina converting enzyme 2 in the rodent retina. *Curr.EyeRes.* 29: 419-427
- Warboys, C. M. e Fraser, P. A. (2010). Hyperglycemia attenuates acute permeability response to advanced glycation end products in retinal microvasculature. *Microvascular Research.* 80: 174–176.
- Whitmire, W., Al-Gayyar, M. M., Abdelsaid, M., Yousufzai, B. K. e El-Remessy, A. B. (2011) Alteration of growth factors and neuronal death in diabetic retinopathy: what we have learned so far. *Molecular Vision.* 17: 300–308.
- Wilkinson-Berka, J. L., Agrotis, A. e Deliyanti, D. The retinal renin–angiotensin system: Roles of angiotensin II and aldosterona. (2012) *Peptides.* 36: 142–150.
- Wilkinson-Berka, J. L., Tan, G., Jaworski, K. e Miller, A. G. (2009) Identification of a retinal aldosterone system and the protective effects of mineralocorticoid receptor antagonism on retinal vascular pathology. *Circulation research.* 104: 124-133.
- Wosik, K., Cayrol, R., Dodelet-Devillers, A., Berthelet, F., Bernard, M., Moumdjian, R., Bouthillier, A., Reudelhuber, T. L. e Prat, A., (2007) Angiotensin II controls occludin function and is required for blood brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis. *J. Neurosci.* 27: 9032-9042.
- Wright, J. W. e Harding, J. W. (1997) Important role for angiotensina III and IV in the brain renin-angiotensin system. *BrainRes.Rev.* 25: 96-124.
- Yanai, K., Saito, T., Kakinuma, Y., Kon, Y., Hirota, K., Taniguchi-Yanai, K., Nishijo, N., Shigematsu, Y., Horiguchi, H., Kasuya, Y., Sugiyama, F., Yagami, K., Murakami, K. e Fukamizu, A. (2000) Renin-dependent cardiovascular functions and renin-independent blood-brain barrier functions revealed by renin-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 275: 5-8.
- Zhao, M., Valamanesh, F., Celerier, I., Savoldelli, M., Jonet, L., Jeanny, J. C., Jaisser, F., Farman, N. e Behar-Cohen, F. (2010). The neuroretina is a novel mineralocorticoid target: aldosterone up-regulates ion and water channels in Muller glial cells. *The FASEB Journal.* 24: 3405-3415.