

# Índice

Resumo/Abstract	
1. Introdução .....	1
2. Objetivos .....	2
3. Materiais e Métodos.....	2
4. Vias Metabólicas Ativadas pela Hiperglicémia.....	3
4.1 Produtos terminais de glicosilação avançada .....	3
4.2 Via do Poliál /Sorbitol.....	5
4.3 Ativação Poli (ADP-ribose) Polimerase .....	5
4.4 Via da Hexosamina .....	6
4.5 Proteína Quinase C.....	6
5. Inflamação.....	8
6. Papel do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona.....	11
7. Neurodegenerescência .....	12
7.1 Apoptose Neuronal.....	14
7.3 Acumulação extracelular de Glutamato .....	20
Papel dos Fatores de Neuroprotecção .....	21
7.4.1 Fator Epitelial Derivado do Epitélio Pigmentado .....	22
7.4.2 Somatostatina .....	23
7.4.3 Proteína de Ligação do Fotorreceptor Retinoide.....	23
7.4.4 Fator de Crescimento Nervoso .....	24
7.4.5 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro .....	24
7.4.6 Papel do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina - 1 .....	24
8. <i>Stress</i> Oxidativo .....	26
9. Mecanismos fisiopatológicos que ligam a Neurodegenerescência às Anomalias Microvasculares .....	28
10. Implicações Terapêuticas .....	29
10.1 Agentes Anti-apoptóticos.....	29
10.2 Antagonistas do Glutamato .....	29
10.3 Agentes Anti-inflamatórios .....	30
10.4 Neuroprotecção Local .....	31
11. Discussão e Conclusão .....	32
12. Agradecimentos.....	35
13. Referências Bibliográficas .....	36

## **Resumo**

A Diabetes Mellitus (DM) é uma patologia metabólica caracterizada pela hiperglicémia crónica devido a defeitos na secreção e/ou ação da insulina.

Pelo facto de ser uma patologia multiorgânica apresenta múltiplas complicações associadas, particularmente a retinopatia diabética, que afeta cerca de um terço dos diabéticos, e que constitui nos dias de hoje a causa mais comum de cegueira na população ativa.

Comumente classificada como uma complicação microvascular da diabetes, atualmente, pode também ser classificada como complicação neurológica devido à lesão que ocorre em múltiplos elementos neuronais retinianos.

A neurodegeneração é um evento precoce na patogénese da RD, pelo que será de maior importância o desvendar dos mecanismos que contribuem para a apoptose neuronal de modo a que se desenvolvam novas estratégias terapêuticas que possam atuar em fases mais precoces da RD.

Nesta revisão é comentado como é que os distúrbios metabólicos associados à diabetes, nomeadamente as vias metabólicas que são ativadas pela hiperglicémia, como sejam, a via do poliol e da hexosamina, a síntese de novo de diacilglicerol, proteína cinase C, a produção de radicais livres e de produtos finais de glicosilação avançada podem contribuir para o processo neurodegenerativo da retina durante a diabetes.

Em relação à neurodegeneração propriamente dita é aqui enfatizado o papel da apoptose neuronal e da disfunção glial, bem como a desregulação do metabolismo do glutamato, do stress oxidativo, o papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona bem como a perda de fatores de neuroprotecção.

Potenciais alvos terapêuticos, com base nestas vias fisiopatológicas da RD, também são aqui discutidas.

**Palavras-Chave:** Retinopatia Diabética, Neurodegeneração, Neuroprotecção, Hiperglicémia, Patogénese

## **Abstract**

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia due to defects in secretion and / or insulin action.

Because it is a multi-organ disease has many associated complications, particularly diabetic retinopathy, which affects about a third of diabetic patients, which is nowadays the most common cause of blindness in working population.

Commonly classified as a microvascular complication of diabetes, currently, it can also be classified as a neurological complication due to the injury that occurs in multiple retinal neuronal elements.

Neurodegeneration is an early event in the pathogenesis of RD, so is critical to unravel the mechanisms that contribute to neuronal apoptosis so that the development of new therapeutic strategies that may act in the early stages of RD is possible

In this review we comment how the metabolic disorders associated with diabetes, including the metabolic pathways that are activated by hyperglycemia, such as pathway of the polyol and hexosamine, the diacylglycerol the novo synthesis, protein kinase C, the production of free oxygen radicals and advanced glycosylation end products may contribute to the neurodegenerative process of the retina during the diabetes.

Regarding neurodegeneration itself here we emphasized the role of neuronal apoptosis and glial dysfunction, the deregulation of metabolism of glutamate, the oxidative stress, the role of the renin angiotensin aldosterone system and the loss of neuroprotective factors.

Potential therapeutic targets, based on these pathophysiological pathways of RD, are also discussed here.

**Key Words:** Diabetic Retinopathy, Neurodegeneration, Neuroprotection, Hyperglycemia, Pathogenesis

## **Lista de Acrónimos**

**AR**- Aldose Redutase

**AGE**- Produtos Terminais de Glicosilação Avançada

**RAGE**- Recetor dos Produtos Terminais de Glicosilação Avançada

**Ang I**- Angiotensina I

**Ang II**- Angiotensina II

**AIF**- Fator de Indução da Apoptose

**ACE**- Enzima de Conversão da Angiotensina

**AGEs**- Produtos Terminais de Glicosilação Avançada

**AT-1**- Recetores da Angiotensina tipo 1

**AT-2**- Recetores da Angiotensina tipo 2

**BDNF**- Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

**BRB**- Barreira Hemato-Retiniana

**BDNF**- Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

**DAG**- Diacilglicerol

**DM**- Diabetes *Mellitus*

**DISC**- “death-inducing signaling complex”

**GS**- Glutamina Sintetase

**GFAP**- Proteína Fibrilar Acídica da Glia

**IGF-1**- Fatores de Crescimento Semelhantes à Insulina - 1

**IL-1 $\beta$** - Interleucina 1 $\beta$

**ICAM-1**- Molécula de Adesão Celular Intracelular

**IRBP**- Proteína de Ligação Retinoide do Fotorreceptor

**MCP-1**- Proteína de Quimioatração Monocitária

**mfERG**- Eletrorretinograma Multifocal

**iNOS** - Isoforma Induzível da Óxido Nítrico Sintetase

**NO** - Óxido Nítrico

**NSC**- Canais Não Específicos de Cátions

**NF- $\kappa$ B**- Fator Nuclear  $\kappa$ B

**NGF**- Fator de Crescimento Nervoso

**NADPH** - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

**NMDAR1**- Recetores de Glutamato, N-Metil-D-Aspartato

**PACAP**- Polipeptídeo de Ativação da Adenil Ciclase Pituitária

**PEDF**- Fator Epitelial Derivado do Epitélio Pigmentado

**PARP**- Poli (ADP-ribose) Polimerase

**PKC**- Proteína Quinase C

**RGCs**- Células Ganglionares Retinianas

**ROS**- Espécies Reativas de Oxigénio

**RD**- Retinopatia Diabética

**RAAS**- Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

**Ras-MAPK**- Via Ras Mitogénica da Proteína Quinase Ativada

**SST**- Somatostatina

**SD-OCT**- Tomografia De Coerência Ótica *Spectral Domain*

**TNF- $\alpha$** - Fator de Necrose Tumoral alfa

**VEGF**- Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

# 1. Introdução

A Diabetes Mellitus é uma patologia metabólica caracterizada pela hiperglicémia crónica devido a defeitos na secreção e/ou ação da insulina.(1)

Pelo facto de ser uma patologia multiorgânica apresenta múltiplas complicações associadas, particularmente a retinopatia diabética, que afeta cerca de um terço dos diabéticos, e que constitui nos dias de hoje a causa mais comum de cegueira na população ativa.(2)

Estima-se que a DM afete, atualmente, cerca de 382 milhões de pessoas e que em 2035 esse número aumentará para os 592 milhões(3), e sendo a retinopatia diabética a complicação mais frequente da diabetes esta constituirá um enorme fardo socioeconómico para os serviços de cuidados de saúde a nível mundial.(4)

Apesar da retinopatia diabética ser classicamente descrita como uma patologia microvascular, evidências recentes sugerem que a sua fisiopatologia envolve alterações em todos os elementos celulares da retina, incluindo células do endotélio vascular e pericitos; células da glia (macroglia e microglia); e neurónios, incluindo fotorreceptores, células bipolares, células amácrinas, e ganglionares, sendo que o dano nestes grupos celulares sugere que a RD possa ser também classificada como uma patologia neurodegenerativa.(5)

Tendo em conta que alguns estudos apontam para a neurodegenerescência como um processo que ocorre previamente às alterações microvasculares (6)(7) é fundamental desvendar os seus mecanismos fisiopatológicos de modo a poder desenvolver novas abordagens terapêuticas para fases mais precoces da RD.

O que se pretende nesta revisão bibliográfica é enfatizar o papel da neurodegeneração na fisiopatologia da RD, dando particular importância à apoptose neuronal e à disfunção glial que está subjacente à mesma.

Outro aspeto importante na RD é a ativação de diversas vias por intermédio da hiperglicémia, como sejam, a via do poliol, poli(ADP-ribose) polimerase (PARP), da hexosamina, a síntese de novo de diacilglicerol proteína quinase C (PKC), a produção de radicais livres e de

produtos intermediários de glicosilação(8), que poderão estar implicadas na fisiopatologia tanto das anomalias microvasculares e neuronais.

O desvendar destes diversos mecanismos fisiopatológicos neurodegenerativos, terá grandes implicações sob o ponto de vista terapêutico e poderá conduzir ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para além das utilizadas atualmente, que permitam uma atuação numa fase mais precoce da patogénese da retinopatia diabética.

## **2. Objetivos**

Este artigo de revisão teve como objetivo a exploração de diversas vias metabólicas que são ativadas na retina, durante a história natural da DM e que contribuem para o processo fisiopatológico da RD, dando particular ênfase ao processo neurodegenerativo da mesma.

## **3. Materiais e Métodos**

Este trabalho consiste numa revisão bibliográfica, tendo como apoio pesquisas realizadas em bases de dados na Internet, incluindo o Pubmed e ScienceDirect.

A pesquisa realizada nas bases de dados do Pubmed e ScienceDirect foi feita com as seguintes palavras-chave, na língua inglesa: Diabetic Retinopathy, Neurodegeneration, Neuroprotection, Hyperglycemia, Pathogenesis

Foi utilizado um limite temporal dos últimos 10 anos. Contudo, outros artigos mais antigos foram incluídos por constituírem uma referência nesta temática.

A seleção dos artigos foi feita após a leitura do título e resumo, sendo incluídos aqueles que abordavam questões relevantes para o trabalho. Foram excluídos os artigos que na leitura do resumo não apresentaram relação com o tema em questão.

No site da ClinicalKey foi realizada uma pesquisa de livros científicos na secção de Oftalmologia tendo sido selecionados os livros mais recentes e relevantes.

O intervalo temporal para a recolha de dados foi de Setembro de 2015 a Outubro de 2015.

## 4. Vias Metabólicas Ativadas pela Hiperglicémia

A hiperglicémia tem sido geralmente considerada como um fator chave para a ativação e desregulação de diversas vias metabólicas que danificam a retina na RD. A nível celular, as altas concentrações de glucose poderão aumentar o fluxo de vias glicolíticas e também as vias de glicosilação não enzimática.(8)

As principais alterações que contribuem para o processo de neurodegeneração da retina induzidas por estas vias encontram-se sumariadas abaixo (Tabela 1).

**Tabela 1: Contribuição das vias ativas pela hiperglicémia no processo neurodegenerativo da retina**

<b>AGE</b>	Apoptose via caspase-3 das RGCs e da camada nuclear externa, gliose reativa, aumento da expressão de VEGF, geração de ROS
<b>Via Poliol</b>	Diminuição dos níveis de Glutathiona, multiplicação de vários mecanismos de lesão celular
<b>Poli(ADP-ribose) Polimerase</b>	Aumento do stress oxidativo e apoptose por aumento da caspase-3 e diminuição de fatores de neuroprotecção
<b>Via Hexosamina</b>	Apoptose de células endoteliais e neuronais da retina
<b>Proteína cinase C</b>	Aumenta a expressão do VEGF

### 4.1 Produtos terminais de glicosilação avançada

Devido ao estado crónico de hiperglicémia na diabetes, derivados reativos são formados por via não enzimática (reação de Maillard) entre açúcares redutores (glucose) e resíduos de amina provenientes de proteínas, lípidos ou ácidos nucleicos que passam por uma série de reações complexas (rearranjos, desidratações e condensações) formando assim grupos complexos de ligações cruzadas a que chamamos de produtos terminais de glicosilação avançada (AGEs).(9)



Na retina diabética os AGEs acumulam-se nas células vasculares, nos neurónios e na glia.(9)

Alguns estudos (10) demonstraram que os AGEs têm a capacidade de induzir apoptose (através da ativação da caspase-3) em todas as camadas celulares da retina, com particular predominância na camada de células ganglionares(11) e na camada nuclear externa. Estes AGEs também possuem a capacidade de aumentar a expressão da proteína fibrilar acídica da glia (GFAP) por parte das células de Müller, sugerindo assim um papel patológico no que toca à indução da neurodegeneração da retina via gliose reativa.(12)(13)

Os AGEs também se acumulam nos pericitos, células fundamentais para manter a homeostasia microvascular, levando à perda dos mesmos por diversos mecanismos, tais como, através da interação AGE-RAGE que conduz à sua apoptose por intermédio da geração de espécies reativas de oxigénio (ROS) e através da indução do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)(14), fazendo com que estes aumentem a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), causando assim a disrupção da barreira hemato-retiniana que conduz ao aumento da permeabilidade vascular.(9)

Esta interação AGE-RAGE também afeta as células endoteliais microvasculares ao aumentar a transcrição genética do VEGF através da geração de ROS mediada pela NADPH oxidase e a subsequente ativação do NF- $\kappa$ B através da via Ras mitogénica da proteína quinase ativada (Ras-MAPK).(15)

Outra das ações dos AGEs a nível das células do endotélio vascular passa pela capacidade de induzir a expressão da Molécula de Adesão Celular Intracelular (ICAM-1) e da Proteína de Quimioatração Monocitária (MCP-1) através da geração intracelular de ROS.(15)

Posto isto o AGE poderão exercer um papel central no que toca à inflamação, neurodegeneração e disfunção microvascular na RD.

## 4.2 Via do Poliol /Sorbitol

A via do poliol é uma via de dois passos onde a glucose é reduzida a sorbitol, que depois é convertido em frutose.

Esta via torna-se ativa quando os níveis intracelulares de glucose estão elevados.(16)

A Aldose Redutase (AR), a primeira enzima limitadora da via, reduz a glucose a sorbitol, utilizando NADPH como cofator. O sorbitol é depois metabolizado em frutose através da sorbitol desidrogenase que utiliza  $\text{NAD}^+$  como co-fator. A utilização de NADPH pela AR tem como consequência a diminuição dos níveis de glutathione intracelulares, visto que o NADPH é um cofator da glutathione redutase. Sendo a glutathione um importante antioxidante, a capacidade das células da retina responderem ao *stress* oxidativo diminui.(17)(16)

Tanto as células ganglionares da retina, Müller, pericitos vasculares e células endoteliais são afetadas pela ativação da via do poliol na diabetes.(17)

Pela sua atividade nas células endoteliais e de Müller esta via pode contribuir fortemente para a perturbação da homeostasia de fluidos que ocorre na retina diabética e para a apoptose das células endoteliais e pericitos vasculares.(17)

Além disso a ativação desta via inicia e multiplica vários mecanismos de lesão celular através da ativação e interação da AR e outros fatores patogénicos tais como a formação de AGEs, ativação da via da proteína quinase C, e PARP que pode levar à iniciação de fenómenos inflamatórios e desequilíbrio de fatores de crescimento. (8)(16)

## 4.3 Ativação Poli (ADP-ribose) Polimerase

Uma das consequências major do *stress* oxidativo é a lesão do DNA. Os altos níveis de ROS induzem quebras das cadeias DNA, sendo este processo obrigatório para a ativação da via Poli (ADP-ribose) polimerase.(18)

A PARP é uma enzima nuclear que regula vários eventos celulares incluindo a reparação do DNA, divisão e diferenciação celular, replicação do DNA, transformação, expressão e amplificação genética, função mitocondrial, e morte celular.(18)

Na diabetes a expressão desta enzima encontra-se aumentada na camada de células ganglionares e na camada nuclear interna da retina.(18)

Esta ativação da PARP mediada pela diabetes tem como consequências o aumento do stress oxidativo, da caspase-3, e a diminuição de alguns fatores de neuroprotecção como sejam o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a sinaptofisina e a glutamina sintetase (GS).(18)

Estas alterações, nomeadamente o aumento do *stress* oxidativo, desempenham um importante papel na patogenia da disfunção endotelial e neuronal na retina diabética.(8)

#### **4.4 Via da Hexosamina**

A via de biossíntese da hexosamina tem sido sugerida como uma das vias implicadas no desenvolvimento da RD, estando a ativação da mesma aumentada nos tecidos da retina tanto em humanos como em ratos.(8)

Esta via é ativada como uma alternativa à glicólise para utilizar a frutose-6-fosfato que é produzida em excesso devido à hiperglicémia.(19)

A ativação desta via está associada com a apoptose de células endoteliais e neuronais da retina, e na limitação da proliferação de pericitos.(19)

#### **4.5 Proteína Quinase C**

A hiperglicémia tem a capacidade de induzir a síntese de novo de diacilglicerol (DAG) com conseqüente ativação de várias isoformas de Proteínas Quinase C. A atividade destas isoformas clássicas (PKC-  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$ ) é fortemente aumentada pelo DAG, que tem sido associado à disfunção vascular na RD, estando portanto implicado na patogénese da mesma.(20)

Diversos estudos têm também demonstrado que o aumento da ativação das PKCs está associado a diversas anomalias estruturais e celulares que ocorrem na RD. Algumas dessas alterações incluem um aumento do fluxo sanguíneo, espessamento da membrana basal, expansão de matriz extracelular, permeabilidade vascular, apoptose de células retinianas, angiogénese, adesão leucocitária e ativação de citocinas.(8)(21)

## 5. Inflamação

A inflamação é uma resposta não específica a uma agressão que inclui uma variedade de mediadores moleculares e funcionais, incluindo o recrutamento e/ou ativação de leucócitos.(22) Esta resposta aparentemente tem um papel significativo na patogénese da RD.

O aumento da expressão da isoforma induzível da óxido nítrico sintetase (iNOS) tem sido relatado em retinas de modelos experimentais de roedores diabéticos e em doentes em diversos estudos(23), sendo que este aumento da expressão da iNO está associado a um aumento da produção de óxido nítrico (NO). A produção de NO por sua vez conduz à nitração e nitrosilação de proteínas retinianas, acarretando assim efeitos potencialmente tóxicos a nível da retina.(22)

A diabetes também tem a capacidade de alterar o perfil lipídico da retina.(24) Os eicosanóides são metabolitos do ácido araquidónico, e são mediadores de inflamação conhecidos. Duas das famílias *major* dos eicosanóides são as prostaglandinas (sintetizadas pelas ciclooxigenases) e os leucotrienos (sintetizados via lipoxigenases).(22) A nível da retina de animais diabéticos a produção de prostaglandinas está aumentada maioritariamente devido à indução da COX-2.(22) A inibição da COX-2 tem a capacidade de inibir a indução do aumento da expressão do VEGF, e do aumento da permeabilidade vascular e leucostasis, bem como a morte de células endoteliais da retina em determinados meios de cultura.(22)

A utilização do inibidor da COX, Nepafenac, tem a capacidade de inibir o aumento da produção retiniana de prostaglandinas e a adesão leucocitária nos vasos retinianos, bem como a apoptose de células capilares retinianas, e a degeneração dos pericitos retinianos.(22)

A adesão leucocitária tem um papel fulcral na lesão do endotélio vascular da retina. Estudos constataram que a molécula de adesão leucocitária ICAM-1 se encontra elevada tanto nos vasos da retina como na coróide em diabéticos(25), permitindo desta forma a adesão de leucócitos e de hemácias à superfície dos vasos endoteliais. Este aumento da expressão da

ICAM-1 pode ser mediado por vários estímulos, incluindo VEGF, ativação da PARP, *stress* oxidativo, dislipidemia e, pelo menos em parte via NF- $\kappa$ B.(22)

Outra molécula que também se encontra elevada na vasculatura da retina na diabetes é a VCAM.(22)

O aumento destes mediadores e a decorrente leucostasis têm como consequência a lesão direta e morte de células endoteliais, bloqueio de capilares, disrupção das *tight-junction* endoteliais e um aumento da permeabilidade vascular mediada pela expressão aumentada de VEGF.(25)

O VEGF é conhecido por ser uma molécula pró-inflamatória cujos níveis vítreos estão altamente correlacionados com a neovascularização e edema da retina. As ações do VEGF a nível do aumento da permeabilidade vascular/disrupção da barreira hemato-retiniana (BRB) e da migração/proliferação celular durante a angiogênese estão bem documentados, podendo estes ocorrer através da inflamação vascular visto que este também é capaz de promover a expressão endotelial de ICAM-1, o que conduz à ativação leucocitária e à libertação de citocinas, causando assim uma maior expressão do VEGF e uma amplificação da resposta inflamatória. (22)(26) O bloqueio específico do VEGF endógeno resulta numa supressão significativa da leucostasis retiniana e da rotura da BRB tanto na diabetes em fases iniciais ou numa diabetes já bem estabelecida.(22)

Os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  estão aumentados em retinas de animais diabéticos. A caspase-1 é a enzima responsável pela geração de IL-1 $\beta$  ativa, sendo que a sua atividade também se encontra aumentada em retinas de ratos diabéticos.(22) A IL-1 $\beta$  tem um papel importante na degeneração dos capilares da retina e na ativação do NF- $\kappa$ B.(22)

O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição induzível altamente expresso que é um importante regulador de muitos genes envolvidos em respostas inflamatórias e imunes, proliferação celular e apoptose.(22) Na diabetes, foi demonstrado em modelos roedores que existe uma ativação do NF- $\kappa$ B, ativação esta que conduz à transcrição de diversas proteínas pró-

inflamatórias (incluindo iNOS, ICAM, e citocinas) a nível das células endoteliais da retina, pericitos, células ganglionares, ou células da camada nuclear interna.(22)

O Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é outro dos mediadores inflamatórios que está aumentado na diabetes.(5)

O TNF- $\alpha$  atua através de interações ligando recetor, promovendo um grande número de processos inflamatórios, incluindo o aumento da expressão de moléculas de adesão, recrutamento de leucócitos, indução de apoptose(27), quimioatração de monócitos, aumento da transcrição de fatores de crescimento e outros mediadores inflamatórios.(25)

A Angiotensina II, um efector major do sistema renina-angiotensina, é atualmente reconhecido como um mediador pró-inflatório, pois a sua sinalização causa a transcrição de genes pró-inflamatórios via NF- $\kappa$ B.(22)

O RAGE também está significativamente elevado na retina diabética, sendo que a sua sinalização induz alterações inflamatórias e o aumento da expressão da ICAM *in vivo*.(22)

Todas estas alterações moleculares parecem ter uma relação causal com o desenvolvimento do aumento de permeabilidade e degeneração dos capilares retinianos que ocorre em fases iniciais da RD, visto que a inibição destas cascatas inflamatórias previne o aparecimento das lesões vasculares em modelos animais.(22)

## **6. Papel do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona**

A hipertensão tem sido identificada como um fator de risco major para complicações microvasculares, levando à disfunção de pequenos vasos na RD.

Nos diabéticos um controlo apertado da pressão arterial atrasa a progressão da doença, sendo que evidências recentes sugerem que o Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS) desempenha um importante papel na regulação da mesma.(8)

O RAAS é uma cascata enzimática na qual o angiotensinogénio é um precursor dos peptídeos da angiotensina. A cascata tem início com a conversão da forma inativa da renina, a pró-renina, em renina ativa. A renina converte o angiotensinogénio em angiotensina I (Ang I) que é posteriormente clivada pela enzima de conversão da angiotensina (ACE) em angiotensina II (Ang II). A Ang II é o peptídeo efetor major do RAS, atuando essencialmente em dois recetores, o da angiotensina tipo 1 (AT-1) e da angiotensina tipo 2 (AT-2).(28)

O papel patogénico do RAAS na RD vem de relatos antigos de que pacientes diabéticos apresentam níveis plasmáticos de pró-renina elevados(28). Para além disso, mais recentemente também se demonstrou que em amostras de retinas humanas pós-morte as concentrações de Ang II se encontravam aumentados a nível das células da glia.(29)

A nível da retina os componentes do RAAS são maioritariamente encontrados nas células neuronais, da glia e nos capilares.(28)

A ação nefasta da Ang II ocorre essencialmente pela sua interação com os recetores AT-2 e AT-1, que na diabetes, contribuem para a angiogénese, derrame vascular, fibrose, inflamação, aumento da expressão de fatores de crescimento(28)e diminuição de fatores de neuroproteção (sinaptofisina)(29) em modelos animais.(28)



## 7. Neurodegenerescência

Apesar da RD ser normalmente discutida relativamente às características e clínica das aparentes alterações vasculares, evidências recentes sugerem que a RD envolve alterações em todos os elementos celulares da retina, incluindo as células do endotélio vascular e pericitos, células da glia, incluindo macroglia (células de Müller e astrócitos) e microglia, e neurónios, incluindo fotorreceptores, células bipolares, células amácrinas, e células ganglionares (Tabela 2)

**Tabela 2: Alterações dos elementos celulares da retina na RD**

<b>Tipo de célula</b>	<b>Alterações</b>
<b>Vasculares</b>	<i>“Tight junctions”</i> alteradas
	Morte de células endoteliais e pericitos
<b>Glia</b>	Contacto alterado com os vasos
	Libertação de mediadores inflamatórios
	Compromisso do metabolismo do glutamato
<b>Microglia</b>	Aumento do número de células
	Libertação de mediadores inflamatórios
<b>Neuronais</b>	Morte de células ganglionares, camada nuclear interna
	Atrofia axonal

(Adaptado de Gardner TW, Antonetti DA, Barber AJ et al.: Diabetic retinopathy: More than meets the eye. *Surv Ophthalmol* 47 (Suppl 2): S253. © Elsevier, 2002.)

Cada um destes elementos tem uma contribuição única para a função visual e participa em múltiplas relações homeostáticas com outros elementos celulares.(5)

Portanto a neurodegenerescência na RD pode explicar algumas das anomalias da função visual que se iniciam pouco depois do início da diabetes, mesmo antes da observação clínica de lesões tradicionalmente associadas com a RD.(8)(30)(1)

Algumas destas alterações de função incluem a perda de discriminação cromática e sensibilidade de contraste. Estas alterações podem ser detetadas por estudos eletrofisiológicos nos diabéticos tipo 2 com menos de 2 anos de diabetes, ou seja, antes das alterações microvasculares serem detetadas pelo exame oftalmoscópico.

Além disso, anomalias características no eletrorretinograma (ERG) tais como a redução da amplitude e o atraso na latência dos potenciais oscilatórios têm sido encontradas tanto em diabéticos tipo 1 como em ratos sem qualquer evidência de anomalias microvasculares. (31) (32)

A utilização do ERG multifocal (mfERG) também forneceu evidências que sugerem uma ligação direta entre a disfunção neuronal e as anomalias vasculares presentes na RD, visto que um mfERG com tempo implícito atrasado é preditor do desenvolvimento de anomalias microvasculares.(31)(4)

Outra forma de aferir este dano neuronal da retina é através da Tomografia De Coerência Ótica com *Spectral Domain* (SD-OCT). (5)

A nível estrutural as alterações neurodegenerativas incluem a apoptose neuronal, perda de corpos de células ganglionares, reatividade glial e a diminuição da espessura das camadas internas retina, que têm sido descritas nas fases iniciais da diabetes.(33)

Estas alterações estruturais podem ser evidenciadas *in vivo* (em humanos) através da utilização de uma polarimetria com scâner a laser, onde é possível verificar uma diminuição da espessura da camada de fibras nervosas na diabetes, consistente com a perda de células ganglionares retinianas (RGCs) e dos seus axónios na diabetes.(30)

Outros estudos imunohistoquímicos realizados em amostras de retinas humanas também demonstraram que existe um aumento da expressão de Bax, caspase-3 e 9 nas RGCs de doentes diabéticos, sugerindo assim que algumas das células ganglionares da retina podem morrer via apoptose.(30)

Outras alterações estruturais específicas das RGCs em modelos animais incluem edemaciação dos axónios, frequentemente associada a uma constrição junto aos corpos celulares.(30)

As alterações neurodegenerativas induzidas pela diabetes encontram-se sumariadas abaixo (Tabela 3).

**Tabela 3: Alterações neurodegenerativas induzidas pela diabetes**

<b>Alterações Funcionais</b>	Perda de discriminação cromática
	Perda sensibilidade de contraste
	Anomalias características no ERG
	Atraso do tempo implícito do mfERG
<b>Alterações Estruturais</b>	Diminuição da espessura da camada de fibras nervosas
<b>Imunohistoquímica</b>	Expressão aumentada de Bax, caspase-3 e 9 nas RGCs

## 7.1 Apoptose Neuronal

Como já foi referido anteriormente a apoptose neural é uma característica proeminente da RD tanto em humanos como em modelos animais, sendo as RGCs o tipo de células neuronais mais suscetíveis a este processo.(21)

A apoptose é um tipo distinto de morte celular que se caracteriza por alterações morfológicas que podem ser observadas através de microscopia de luz e eletrónica que é regulada por programas genéticos internos. Esta pode ser fisiológica ou patológica, sendo as duas principais vias identificadas, a via extrínseca e a via intrínseca, ambas com um estágio

final em comum, a ativação da via de execução, que é essencialmente mediada pela ativação das caspases levando assim à fragmentação do DNA.(21)

Alguns estudos verificaram que nas retinas de ratos STZ após três semanas de indução de diabetes, o número de neurónios apoptóticos e a expressão de Bax se encontravam aumentados, o que sugere a existência de uma via dependente do Bax que é ativada pela hiperglicémia.(21)

A proteína quinase mitogénica ativada p38 (p38MAPK) é uma proteína quinase ativada pelo *stress* que apresenta diversas isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ), sendo que estas, recentemente foram reconhecidas como importantes mediadores apoptóticos, especialmente em neurónios da retina.(21)

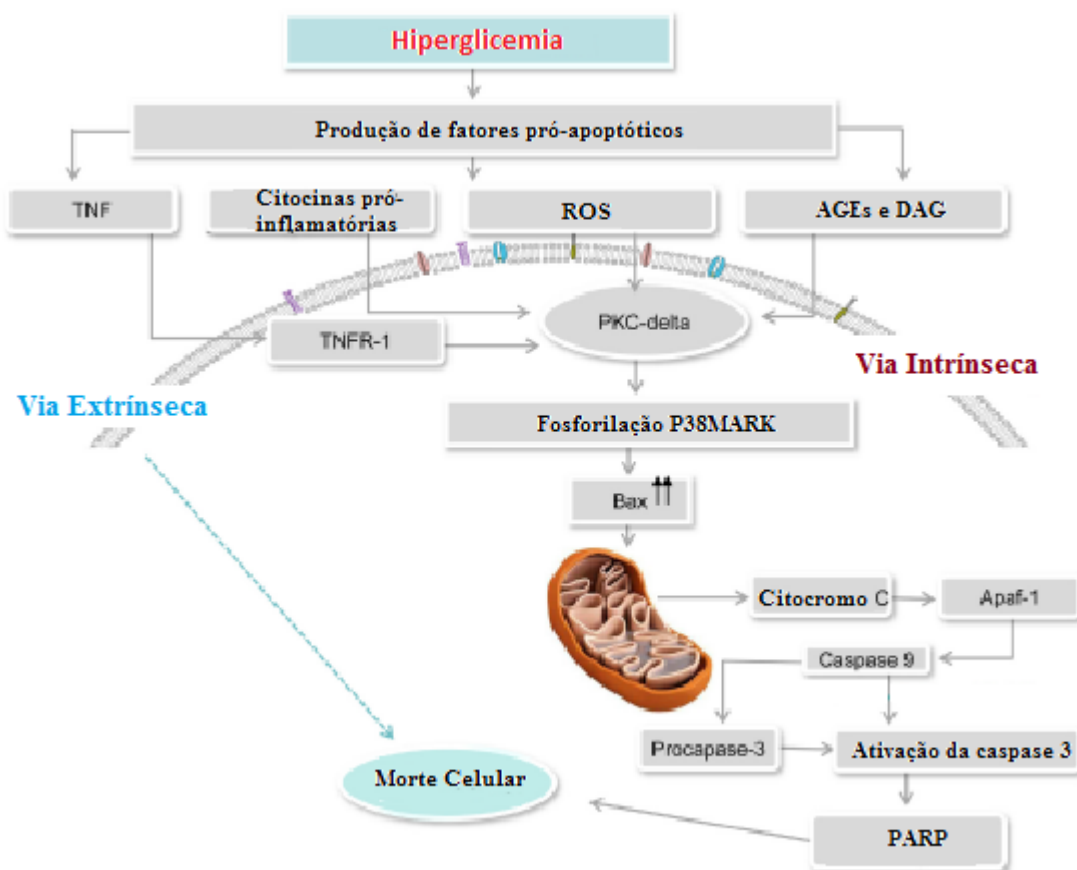
A via dependente da Bax-caspase-3 e a via de morte celular intrínseca iniciada pela mitocôndria são ativadas pela fosforilação da p38MAPK.(21)

Para além disso, a p38MAPK também pode ser ativada por diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, TGF-1 $\beta$ , IL-6 e 8, e quimiocinas, incluindo CCL2, MCP-1, CXCR3, recetor de quimiocina 5 e CXR4.(21)

A família PKC, especialmente a PKC-delta, também é um importante efetor na apoptose das células retinianas.(21)

Também foi demonstrado que a Caspase-3 é um efetor a jusante da p38MAPK fosforilada (Pp38), que causa morte neuronal induzida pela hiperglicémia.(21)

Uma expressão aumentada de caspase-3, caspase-9 e de Bax têm uma grande correlação com a apoptose neuronal que ocorre na RD.(21) A via apoptótica proposta para a RD encontra-se sumariada na Figura 1.



**Figura 1: Via apoptótica proposta na RD**

(Adaptado de Zhang X, Wang N, Barile GR, Bao S, Gillies M. Diabetic retinopathy: Neuron protection as a therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol.* Elsevier Ltd; 2013)

Outros estudos também demonstraram que a expressão do FasL, um componente pró-apoptótico da via do recetor de morte, está significativamente aumentada na retina dos diabéticos, mais especificamente nas células ganglionares e da glia, quando comparado com indivíduos controlo.(34)

A interação do FasL com o recetor de morte Faz/CD95 forma o complexo de sinalização indutor de morte (DISC) que recruta e ativa a caspase-8.(34)

Outra molécula que também se encontra aumentada em amostras de retina diabética é o fragmento truncado do Bid (tBid) e o Bim, ambos membros da família pró-apoptótica Bcl2, que estão envolvido na via intrínseca mediada pela mitocôndria, sendo fortes ativadores da caspase-3.(34)

Recentemente também foi descrito um mecanismo de morte celular induzido pela hiperglicemia independente das caspases em culturas de células retinianas, sendo este mediado pela translocação mito-nuclear do fator de indução da apoptose (AIF).

Esta translocação do AIF do espaço mitocondrial intermembranar para o núcleo causa fragmentação do DNA e condensação da cromatina.(35)

Em contraste com esta grande expressão de marcadores pró-apoptóticos, nestes estudos não foram encontradas quaisquer alterações significativas na expressão de marcadores anti-apoptóticos tais como o FLIP, um componente do DISC, e BclxL, um membro anti-apoptótico da família Bcl2.(34)

Em suma podemos dizer que existe um importante desequilíbrio entre fatores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos nas neuroretinas de doentes diabéticos e em modelos animais. Estes desequilíbrios levam à ativação de diversas vias chave que contribuem para o processo de apoptose neuronal que ocorre em fases precoces da RD, daí que o desvendar destas mesmas vias e o desvendar destes marcadores apoptóticos seja de maior importância de modo a que se possam desenhar novas estratégias terapêuticas que possam prevenir a progressão da RD.

## **7.2 Disfunção da Glia**

Existem dois tipos de células da glia na retina, a macroglia e a microglia.

A célula mais predominante da macroglia é a célula de Müller, que é exclusiva da retina. As células de Müller são células fusiformes que abrangem toda a retina desde a membrana limitante externa até às células ganglionares retinianas.

O segundo tipo celular são os astrócitos, que migram para a retina através do nervo óptico durante o desenvolvimento embrionário da mesma. Os astrócitos são menos abundantes que as células de Müller formando uma monocamada na membrana limitante interna.(4)

Em relação à gliose reativa nas células de Müller, pensa-se que esta ocorre como tentativa de proteção do tecido da retina a uma agressão, de modo a promover a reparação da mesma e limitar processo de remodelação tecidual.(36)

A Diabetes é uma das muitas patologias capazes de induzir este processo de gliose reativa, sendo que este um processo que envolve diversas moléculas (Tabela 4).

**Tabela 4: Moléculas envolvidas no processo de gliose reativa**

<b>Células de Müller</b>	Aumento da GFAP
	Aumento VEGF
	Aumento metaloproteinases de matriz
	Disrupção captação do glutamato
<b>Microglia</b>	Aumento VEGF e NO
	Aumento IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$

Uma das características mais proeminentes da gliose reativa é a expressão aumentada da GFAP por parte das células de Müller(12)(13)(26). Outras alterações incluem a hipertrofia e proliferação celular, bem como a diferenciação em células semelhantes a células progenitoras.(36)

Esta gliose pode ter efeitos protetores bem como efeitos tóxicos a nível dos neurónios da retina. Em condições de gliose massiva (proliferativa), as normais interações entre neurónios e a glia são interrompidas levando à degeneração da retina.(36)

Os capilares retinianos são constituídos por células endoteliais e pericitos que são cobertos por uma membrana basal, que é posteriormente envolvida pelas membranas dos astrócitos e das células de Müller. As células de Müller em condições normais, produzem

diversos fatores mantêm a integridade da barreira hemato-retiniana, entre eles fatores anti-proliferativos e antiangiogênicos.(12)(26).

Em condições diabéticas a produção do VEGF está aumentada por parte das células de Müller, promovendo assim a neovascularização patológica e o derrame vascular.(12)

As células de Müller sob condições de hiperglicemia são também uma importante fonte de metaloproteinases de matriz que degradam a ocludina, uma proteína das *tight-junction* presentes nas células do endotélio e epitélio pigmentado, podendo desta forma também facilitar a ocorrência do derrame vascular.(12)(36)

Outro dos mecanismos pelos quais as células de Müller induzem toxicidade celular é através da má função a nível da captação do glutamato extracelular, mecanismo que será discutido em maior pormenor posteriormente nesta revisão.

Portanto pelo que foi referido acima podemos aferir que as células de Müller podem contribuir para a lesão da retina, não só de forma direta (libertação de moléculas tóxicas) mas também de forma indireta, pelo compromisso das funções de neuro suporte.(12)

Outros estudos realizados em humanos verificaram uma marcada ativação da microglia nos diferentes estádios da RD.(37)

Esta ativação da microglia ocorre preferencialmente à volta da vasculatura da retina, especialmente nas vénulas dilatadas, microaneurismas, hemorragias intra-retinianas, manchas algodinosas, camada de fibras nervosas, e na neovascularização retiniana e vítrea.(37)(38)

A ativação da microglia é considerada uma fonte major de citocinas pró-inflamatórias e neurotóxicas e de outras substâncias tais como VEGF, TNF- $\alpha$ , Interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), e óxido nítrico. A libertação destas citocinas pode propagar a resposta inflamatória na retina, exacerbando ainda mais a permeabilidade vascular e o dano neuronal em olhos com RD, levando assim a um ciclo vicioso.(37)



### **7.3 Acumulação extracelular de Glutamato**

O glutamato é um neurotransmissor excitatório major da retina que está elevado no espaço extracelular da retina de modelos experimentais de diabetes bem como no fluido do vítreo de doentes com diabetes.(39)(40)

A toxicidade do glutamato é uma causa major de perdas neuronais em vários distúrbios da retina, incluindo a RD.(36)

Em condições normais as células de Müller são responsáveis pela remoção do excesso de glutamato extracelular do tecido retiniano interno.(12)(36)(41)

Esta acumulação extracelular de glutamato deve-se essencialmente a uma deficiente função do transportador glial de glutamato (GLAST) das células de Müller, induzida pela diabetes.(36)(41)

Outros mecanismos que levam à acumulação extracelular de glutamato são a redução da função da via de transaminação do mesmo e a diminuição da conversão de glutamato em glutamina, que se verifica em modelos animais.(42)(43)

A síntese de glutathione é dependente da disponibilidade extracelular de glutamato e cistina. O facto das células de Müller não conseguirem captar o glutamato extracelular na RD, faz com que a produção de glutathione, um importante antioxidante, esteja diminuída, o que resulta num aumento da expressão de glutaredoxina que por sua vez induz a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B e a expressão de fatores pro-inflamatórios.(36)

Em modelos animais(43) e humanos(44) de RD a expressão dos recetores de glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDAR) está aumentada, principalmente nas células ganglionares.

Outras alterações a nível dos recetores NMDAR que também podem ser verificadas na RD em humanos incluem a expressão alterada nas subunidades dos mesmos, o que poderá comprometer a normal transmissão sináptica.(44)

Este aumento extracelular e sináptico de glutamato por sua vez conduz a uma hiperativação do recetor NMDA, que proporciona um importante meio de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células neuronais ativando enzimas intracelulares dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  que iniciam a sinalização de cascatas pró-apoptóticas através de mecanismos dependentes e independentes de caspases que posteriormente conduzem ao processo de excitotoxicidade, com consequente perda de células neuronais.(43)(44) (11)(1)

## **Papel dos Fatores de Neuroprotecção**

A sobrevivência dos neurónios da retina em ambiente hostil depende da disponibilidade local de fatores de crescimento e neurotrofinas, que são peptídeos que promovem a diferenciação e a sobrevivência neuronal. Na diabetes, a eficácia e/ou concentração destas moléculas está reduzida, o que poderá comprometer a protecção contra fatores neurotóxicos envolvidos na neurodegeneração.(4)(1)

As principais funções dos diversos fatores de neuroprotecção encontram-se sumariadas abaixo (Tabela 5).

**Tabela 5: Papel/propriedades dos fatores de neuroprotecção a nível da retina**

<b>PEDF</b>	Diminui a expressão do VEGF, TNF- $\alpha$ e ICAM-1 nas células do endotélio vascular da retina
	Ação anti-apoptótica a nível das células neuronais da retina
<b>SST</b>	Propriedades neuromoduladoras
	Propriedades antiangiogénicas
<b>IRBP</b>	Fundamental no ciclo visual/ essencial à sobrevivência dos fotorreceptores
<b>NGF</b>	Protecção RGCs

<b>BNF</b>	Fundamental à sobrevivência das células amácrinas
	Modulador sináptico
<b>IGF-I</b>	Fator de sobrevivência neuronal
	Propriedades anti-apoptóticas (fosforilação/inibição do BAD)
	Potente indutor do VEGF

#### 7.4.1 Fator Epitelial Derivado do Epitélio Pigmentado

O fator epitelial derivado do epitélio pigmentado (PEDF) é uma glicoproteína com propriedades neurotróficas, neuroprotetoras e antiangiogénicas que é produzido essencialmente pelo epitélio pigmentado da retina e pelas células de Müller em quantidades consideráveis.(45)

O PEDF exerce funções anti-inflamatórias, atenuando a expressão de mediadores químicos, tais como o VEGF, TNF- $\alpha$  e ICAM-1 nas células endoteliais vasculares da retina.(46)(47)

Outros estudos também demonstraram estas propriedades anti-apoptóticas e anti-inflamatórias do PEDF a nível das células neuronais da retina, visto que a administração tópica de gotas do mesmo, em modelos animais de RD, reduziu significativamente a morte de células ganglionares e a ativação da glia. (48)

Para além do que já foi mencionado acima, o PEDF também oferece proteção às células neuronais da retina, contra o *stress* oxidativo e a excitotoxicidade mediada pelo glutamato.(49)

Portanto a diminuição da expressão do PEDF que ocorre na RD parece crucial no desenvolvimento da neurodegenerescência, podendo também ser responsável por algumas das alterações microvasculares que ocorrem em fases precoces da RD.(4)

#### **7.4.2 Somatostatina**

A somatostatina (SST) é um peptídeo largamente distribuído, cujas funções biológicas incluem a neurotransmissão, atividade anti-secretora e antiproliferativa. Os seus recetores podem ser encontrados na neuroretina dos humanos, sendo que esta atua tanto como um neuromodulador como fator antiangiogénico, sendo a sua síntese realizada maioritariamente no epitélio pigmentado da retina e nas células amácrinas.(50)

A redução da produção de SST é um evento precoce na RD que se associa à morte neuronal e à ativação da glia em retinas de diabéticos, pelo que poderá estar implicada na fisiopatologia da RD.(50)

#### **7.4.3 Proteína de Ligação do Fotorreceptor Retinoide**

A proteína de ligação retinoide do fotorreceptor (IRBP) é uma glicoproteína altamente restrita à matriz do inter-fotorreceptor, que facilita o transporte dos retinoides entre os segmentos externos dos fotorreceptores e as células do epitélio retiniano, tendo portanto um papel fulcral no ciclo visual.(51)

Estudos realizados em retinas humanas verificaram que a produção de IRBP está diminuída em fases iniciais da RD, devido à hiperglicémia e à libertação de citocinas pró-inflamatórias, como sejam o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ .(51)

Visto que a IRBP desempenha um papel importante a nível do ciclo visual e é essencial à sobrevivência dos fotorreceptores, o seu défice poderá estar envolvido no processo neurodegenerativo que ocorre na RD.(51)

#### **7.4.4 Fator de Crescimento Nervoso**

O fator de crescimento do nervoso (NGF) é uma neurotrofina produzida por múltiplas células, incluindo as células do sistema visual, sendo a sua ação mediada essencialmente através dos recetores TrkA e p75, ambos localizados em células responsivas ao NGF.(52)

Nas retinas de animais diabéticos os níveis de NGF e a expressão dos seus recetores encontra-se diminuída, particularmente na camada de células ganglionares da retina.(52)

Esta diminuição da expressão do NGF poderá levar à perda de células ganglionares por mecanismos que envolvem a apoptose.(52)

#### **7.4.5 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro**

Esta neurotrofina expressa nas células ganglionares e nas células de Müller é um importante fator de sobrevivência das mesmas, sendo que também já foi descrita a sua capacidade de prevenir a morte de células amácrinas.(53)

Em modelos animais de RD verificou-se que os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) se encontravam diminuídos, juntamente com a diminuição da densidade de células amácrinas. Após administração intraocular de BDGF nestes modelos conseguiram salvar-se algumas das células amácrinas, sugerindo assim que os baixos níveis de BDNF poderão estar implicados no processo degenerativo que conduz à morte de células amácrinas.(53)

#### **7.4.6 Papel do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina - 1**

O Fatores de Crescimento Semelhante à Insulina-1 (IGF-1) é um fator neurotrófico com capacidade de prevenir a morte de diversos tipos celulares, no entanto os níveis do mesmo estão reduzidos nos olhos de ratos diabéticos.(54)

Estudos realizados em retinas de ratos diabéticos mostraram que a administração subcutânea de IGF-I foi capaz de prevenir a morte celular ao bloquear determinados recetores apoptóticos, evitando assim a neurodegenerescência neuronal.(54)

Apesar destas propriedades neuroprotetoras descritas acima estudos mais recentes demonstraram que uma elevação crónica dos níveis de IGF-I intraoculares induzem processos deletérios na retina, como sejam o aumento da expressão de proteínas de fase aguda e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , MCP-1), que culminam com a perda de fotorreceptores, células bipolares, ganglionares e amácrinas.(55)

Outra das consequências deste aumento crónico do IGF-I é uma disfunção celular mediada pelo aumento da sinalização do mesmo com consequente formação de ROS em células neuronais e endoteliais, através da ativação da NADPH oxidase.(55)

Portanto altas concentrações intraoculares de IGF-I desencadeiam uma série de processos celulares que conduzem ao *stress* retiniano e à disfunção das funções homeostáticas da glia, levando à disfunção e morte neuronal.(55)

## 8. *Stress Oxidativo*

O *stress* oxidativo induzido pelo aumento da acumulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e/ou diminuição da capacidade antioxidante, desempenha um importante papel na patogenia da RD.(56)

O aumento da geração de ROS interage com um grande número de moléculas, incluindo pequenas moléculas inorgânicas e também proteínas, lípidos, hidratos de carbono, e ácidos nucleicos. Através destas reações, as ROS podem destruir ou alterar irreversivelmente as funções destas moléculas alvo.(56)

Na diabetes e/ou condições de hiperglicémia há um aumento da produção de ROS por parte da mitocôndria tanto em humanos como em modelos animais. (57)(19)

Outras fontes de ROS na retina incluem a ativação da via dos AGE, Polioliol, Hexosamina, e da PKC que são induzidas pela hiperglicémia, como referido anteriormente.

O *stress* oxidativo é capaz de induzir apoptose de células da retina, através de múltiplos mecanismos, um deles é a ativação do NF- $\kappa$ B e das caspases, sendo que este NF- $\kappa$ B conduz à iniciação do programa pró-apoptótico das células endoteliais e dos pericitos da retina. Para além disso o NF- $\kappa$ B também induz a expressão de mediadores pró-inflamatórios, TNF- $\alpha$  e indução da sintetase do óxido nítrico. Estes mediadores, por sua vez, aumentam ainda mais a produção de ROS levando a uma ampliação dos seus efeitos. (19)

Outro dos mecanismos proposto pelo qual as ROS conduzem à lesão da microvasculatura retiniana é através da ativação dos canais redutores sensíveis a ATP e Potássio ( $K_{ATP}$ ) e da ativação dos canais não específicos de catiões (NSC).

A ativação destes canais durante um período de *stress* oxidativo causa um aumento do influxo de cálcio a nível dos capilares, acentuando assim a letalidade do *stress* oxidativo.(58)

Outras células que são particularmente vulneráveis ao *stress* oxidativo são os fotorreceptores devido à grande quantidade de ácidos gordos que constituem as suas

membranas, o que faz dos mesmos extremamente suscetíveis a reações de peroxidação lipídica que danificam a sua estrutura e função.(59)

Também foi comprovado que as ROS têm a capacidade de alterar as funções visuais das células ganglionares da retina em modelos animais, sugerindo que estas desempenham um importante papel na mediação da neurodegenerescência na RD.(56)(60)

Outro mecanismo pelo qual as ROS conduzem a fenômenos neurodegenerativos passa pela desregulação no transporte de aminoácidos excitatórios nas células da retina. (56)(19)

Todos estes pontos mencionados acima apontam para o *stress* oxidativo como sendo um mecanismo que liga a neurodegenerescência com as anomalias microvasculares que ocorrem em fases precoces da RD.(4)



## **9. Mecanismos fisiopatológicos que ligam a Neurodegenerescência às Anomalias Microvasculares**

A relação entre a excitotoxicidade mediada pelo glutamato e a disrupção da BRB induzida pelo VEGF é uma das vias mais interessantes que liga a neurodegeneração ao comprometimento/lesão vascular. Neste aspeto foi demonstrado que a hiperglicémia conduz a um aumento do glutamato extracelular, com subsequente ativação dos recetores NMDA que medeiam a produção de VEGF e a disrupção da BRB.(6)

A disfunção da glia também possui um papel essencial nestes eventos fisiopatológicos ao interromper a normal interação entre as células neuronais e as células do endotélio vascular.(4)

Finalmente, a perda do PEDF e da SST podem contribuir diretamente para a disrupção da BRB ou através do aumento a expressão de VEGF.(4)

Outros fatores envolvidos nesta relação entre a neurodegeneração e as anomalias vasculares são o *stress* oxidativo(56)(29), ativação do RAGE(61) e do RAS.(4)

## **10. Implicações Terapêuticas**

### **10.1 Agentes Anti-apoptóticos**

Na diabetes, os neurónios e as células retinianas morrem através da apoptose, uma via final comum na neurodegeneração da retina. Quer seja desencadeada pela hiperglicémia, excitotoxicidade do glutamato ou défice de neurotrofinas, a apoptose liga estes potenciais mecanismos de lesão neuronal à morte celular. Portanto, a inibição da apoptose poderá ser um meio potencial de prevenir a neurodegeneração na RD.(1)

A apoptose tipicamente envolve a ativação de enzimas proteolíticas que destroem componentes celulares que mantêm a normal estrutura e função da célula. Duas proteínas que têm sido implicadas na apoptose induzida pelo glutamato incluem a caspase-3 e a calpaína.(31)

O Latanoprost, um análogo das prostaglandinas, tem a capacidade de reduzir a apoptose de células neuronais e da glia em retinas diabéticas quando aplicado topicamente em olhos de ratos, sendo a inibição da caspase-3 um dos mecanismos proposto para este fenómeno.(1)

Outros estudos também verificaram que a administração oral de inibidores da calpaína em ratos diabéticos preveniu a morte de células ganglionares, sugerindo que a inibição da calpaína poderá ser um mecanismo de neuroprotecção viável para o tratamento da RD.(1)

Outro agente com potencial terapêutico é o Polipeptídeo de ativação da Adenil Ciclase Pituitária (PACAP), visto que em alguns estudos onde foram administradas a modelos animais injeções intra-oculares deste polipeptídeo se verificou uma marcada atenuação da lesão retiniana através da inibição de algumas vias pró-apoptóticas.(62)

### **10.2 Antagonistas do Glutamato**

Dado o potencial papel da excitotoxicidade mediada pelo glutamato na contribuição da neurodegeneração que ocorre na RD, o bloqueio dos recetores de glutamato ou o aumento da

sua clearance/metabolização poderão ser uma estratégia viável para manter a integridade da neuroretina durante a diabetes.(1)(40)

A nível do sistema nervoso central os dois principais tipos de recetor de glutamato são o  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA) e o N-metil-D-aspartato (NMDA).

A Memantina é um antagonista não competitivo do recetor NMDA que está aprovado para a terapêutica da doença de Alzheimer. Em ratos diabéticos, a administração crónica tem a capacidade de reduzir a perda de células ganglionares da retina, melhorar a função da retina e diminuir os níveis intraoculares de VEGF. (1)(6)(30)(11)

### **10.3 Agentes Anti-inflamatórios**

A diabetes está associada ao aumento da expressão de citocinas inflamatórias, tais como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, e VEGF. Além disso, a expressão aumentada do ICAM-1 contribui para a leucostasis nos capilares retinianos podendo contribuir para a isquémia do tecido neuroretiniano, promovendo a neurodegeneração.(1)

As citocinas inflamatórias libertadas pelas células imunitárias durante a diabetes podem também ativar a microglia, contribuindo ainda mais para a neurodegeneração. Portanto o bloqueio dos efeitos destas citocinas poderá fornecer outra abordagem para reduzir a progressão da RD.(1)

O inibidor do TNF- $\alpha$ , etanercept mostrou-se promissor na prevenção da morte de células da retina e da expressão aumentada de ICAM-1 em modelos animais de diabetes. Contudo o mesmo não se verificou a quando da aplicação do mesmo em doentes com RD.(1)(25)

A minociclina, um antibiótico da família das tetraciclina com propriedades anti-inflamatórias, está neste momento sob investigação para o tratamento da RD. Em culturas de células retinianas, a minociclina inibe a produção microglial de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e de óxido nítrico após exposição a lipopolisacáridos, e reduz a ativação da caspase-3. (1)(26)

Num ensaio clínico recente fase I/II, a toma oral de minociclina melhorou a acuidade visual, o edema macular central, e o derrame vascular em cinco pacientes com edema macular diabético, sugerindo portanto que a inibição da microglia pode ser uma das estratégias terapêuticas perante a RD.(1)(26)

#### **10.4 Neuroprotecção Local**

A descoberta de que o NGF, PEDF e o BDNF conseguem resgatar neurónios em processo de morte celular em modelos animais de diabetes e de que os níveis dos mesmos na retina estão reduzidos na diabetes, irá estimular possivelmente mais pesquisa em relação aos efeitos dos mesmos na função visual de humanos diabéticos.(1)

A somatostatina, outro potencial fator neurotrófico, está atualmente a ser avaliado num ensaio clínico de modo a determinar se a aplicação tópica de formulações com este composto pode ou não atrasar a progressão da RD.(1)(50)

Outro agente neurotrófico, tal como as gotas do peptídeo PEDF mencionadas anteriormente, também poderão ser avaliadas de forma semelhante de modo a averiguar a sua efetividade clínica a nível da neuroprotecção na RD.(1)(48)

Um estudo também demonstrou o potencial terapêutico da administração tópica de NGF em modelos animais de RD devido ao seu papel na proteção contra a degeneração de RGC que ocorre na camada ganglionar, comprovando que este poderá ser uma abordagem farmacológica efetiva.(52)

## 11. Discussão e Conclusão

A neurodegeneração é um evento central e precoce na fisiopatologia da RD que envolve diversos mecanismos moleculares complexos que muito provavelmente incluem diversos fatores tais como o aumento do *stress* oxidativo, perda de fatores neuroprotetores, aumento da inflamação, excitotoxicidade mediada pelo glutamato, e outros fatores sistêmicos como a hiperglicémia e a resistência à insulina.

A neurodegeneração caracteriza-se essencialmente pela apoptose neural e pela gliose reativa.

O estado de hiperglicémia crônica que ocorre no doente diabético tem como consequências a ativação e desregulação de diversas vias metabólicas que lesam a retina e contribuem para este processo neurodegenerativo de forma direta, por indução de vias apoptóticas (essencialmente mediada pelas caspases) a nível das células neuronais da retina, através da produção aumentada de AGEs, pela ativação da via do PARP e pela ativação da via da Hexosamina. Indiretamente a ativação das vias apoptóticas ocorre também pelo aumento da produção de ROS, mediado também pela produção aumentada de AGEs, pela via do Polioliol, pela via da PARP, e pela neuro inflamação, que têm como consequências o aumento do *stress* oxidativo, que por sua vez ativa outros mecanismos pró-apoptóticos.

Outro papel importante do *stress* oxidativo na fisiopatologia da RD, passa pela capacidade de induzir a formação de mediadores pró-inflamatórios e pela capacidade de desregulação do transporte de diversos amino-ácidos excitatórios a nível da retina.

Outro dos mecanismos associados à apoptose neuronal é a diminuição dos fatores de neuroprotecção que se verifica na RD.

Quanto ao processo de gliose reativa induzido pela diabetes, este tem efeitos tóxicos a nível das células neuronais da retina, ao interromper as normais interações entre os neurónios e a glia, condiciona a função de captação do glutamato extracelular por parte das células de

Müller, o que conduz à libertação de moléculas tóxicas comprometendo assim as normais funções de neurosuporte, que culminam assim na neurodegeneração da retina.

Para além disso ocorre também uma ativação da microglia, que constitui uma fonte major de citocinas pró inflamatórias e neurotóxicas com capacidade de exacerbar a permeabilidade vascular e o dano neuronal que ocorre na RD.

Outro dos mediadores deste processo degenerativo passa pela acumulação extracelular de glutamato, sendo esta uma causa major de perdas neuronais que ocorrem na RD, através de um processo chamado de excitotoxicidade.

O aumento de glutamato extracelular conduz a uma hiperativação dos recetores NMDA das células neuronais, principalmente nas RGCs, que tem como consequência a ativação de cascatas pró apoptóticas dependentes e independentes das caspases.

A maioria das terapêuticas atualmente disponíveis para a RD têm como principais alvos as sequelas vasculares que ocorrem em fases muito tardias da RD, pelo que parece razoável o desenvolvimento de estratégias que permitam uma atuação em fases mais precoces da história natural da doença, estratégias estas, que poderão passar pela intervenção nas vias que foram descritas neste artigo e pela neuroproteção.

Para além disso é importante que se desenvolvam novos métodos de rastreio para a RD para além da fundoscopia.

Os métodos atualmente disponíveis para identificação da neurodegeneração são o mfERG e a SD-OCT, pois avaliam as alterações que ocorrem na camada de fibras nervosas, densidade das células ganglionares, anomalias dos fotorreceptores, espessura da retina, permitindo assim a deteção de alterações morfológicas e funcionais que ocorrem muito antes das anomalias microvasculares poderem ser detetadas no exame oftalmoscópico, aumentando assim o nosso potencial de intervenção através de estratégias neuroprotetoras mais precoces.

Uma estratégia razoável de atuação a nível do processo neurodegenerativo parece ser a utilização de agentes neuroprotetores, nomeadamente através da utilização da via tópica, abrindo assim uma nova janela face à abordagem terapêutica na RD, muito menos invasiva quando comparada com as terapêuticas utilizadas atualmente, tendo como vantagem adicional a possibilidade de monitorização da ação/efeito destes mesmos fármacos através da utilização de meios complementares de diagnóstico, também não invasivos, como o mfERG e a SD-OCT.

Em suma, esforços deverão ser concentrados no desenvolvimento de novos exames de rastreio da RD no desvendar de todas as vias envolvidas no processo neurodegenerativo que ocorre na RD e no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que possibilitem uma atuação nestes mesmos mecanismos fisiopatológicos subjacentes ao processo neurodegenerativo, pelo que permitirão uma atuação muito mais precoce na história natural da doença face às estratégias terapêuticas que são utilizadas atualmente.

## **12. Agradecimentos**

As primeiras palavras de agradecimento dirijo-as ao Professor Doutor João Figueira, por todas as suas ideias e sugestões, como pelo acompanhamento, apoio e incentivos permanentes durante toda a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Anabela Mota Pinto, pela colaboração crítica dada desde sempre a este trabalho. Todo o apoio, carinho e compreensão dispensados foram fundamentais e contribuíram decisivamente para a concretização deste trabalho.

Aos meus Pais e toda a minha família, a maior gratidão por todo o apoio, confiança e orgulho que sempre demonstraram em mim.



### 13. Referências Bibliográficas

1. Stem MS, Gardner TW. Neurodegeneration in the pathogenesis of diabetic retinopathy: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Curr Med Chem* [Internet]. 2013;20(26):3241–50. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4071765&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
2. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;376(9735):124–36. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)62124-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)62124-3)
3. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2014;103(2):137–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.002>
4. Simó R, Hernández C. Neurodegeneration in the diabetic eye: New insights and therapeutic perspectives. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(1):23–33.
5. Yanoff M, Sassani JW. *Ocular Pathology*. Seventh. Inc E, editor. 2015. 527-553 p.
6. Hernández C, Simó R. Neuroprotection in diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep*. 2012;12(4):329–37.
7. Van Dijk HW, Verbraak FD, Kok PHB, Stehouwer M, Garvin MK, Sonka M, et al. Early neurodegeneration in the retina of type 2 diabetic patients. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(6):2715–9.
8. Ola MS, Nawaz MI, Siddiquei MM, Al-Amro S, Abu El-Asrar AM. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic retinopathy. *J Diabetes Complications* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;26(1):56–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacom.2011.11.004>
9. Sharma Y, Saxena S, Mishra A, Saxena A, Natu SM. Advanced glycation end products and diabetic retinopathy. *J Ocul Biol Dis Infor* [Internet]. 2012;5(3-4):63–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12177-013-9104-7>
10. Lecleire-Collet a, Tessier LH, Massin P, Forster V, Brasseur G, Sahel J a, et al. Advanced glycation end products can induce glial reaction and neuronal degeneration in retinal explants. *Br J Ophthalmol*. 2005;89(12):1631–3.
11. Schmidt K-G, Bergert H, Funk RHW. Neurodegenerative diseases of the retina and potential for protection and recovery. *Curr Neuropharmacol*. 2008;6(2):164–78.
12. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res*. 2006;25(4):397–424.

13. Zong H, Ward M, Madden a., Yong PH, Limb G a., Curtis TM, et al. Hyperglycaemia-induced pro-inflammatory responses by retinal Müller glia are regulated by the receptor for advanced glycation end-products (RAGE). *Diabetologia*. 2010;53(12):2656–66.
14. Yamagishi S, Amano S, Inagaki Y, Okamoto T, Koga K, Sasaki N, et al. Advanced Glycation End Products-Induced Apoptosis and Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor in Bovine Retinal Pericytes. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2002;290(3):973–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X01963120>
15. Takeuchi M, Takino J, Yamagishi S. Involvement of TAGE-RAGE System in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *J Ophthalmol* [Internet]. 2010;2010:1–12. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/joph/2010/170393/>
16. Insulin R, Signaling R, Hyperosmotic IN. Retinal Insulin Receptor Signaling in Hyperosmotic. *Sci York*. 2010;6729(08):1–29.
17. Lorenzi M. The Polyol Pathway as a Mechanism for Diabetic Retinopathy: Attractive, Elusive, and Resilient. *Exp Diabetes Res* [Internet]. 2007;2007:1–10. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jdr/2007/061038/abs/>
18. Ghulam Mohammad, MohammadMairaj Siddiquei and AAE-A. Poly (ADP-Ribose) PolymeraseMediates Diabetes-Induced Retinal Neuropathy. 2013;2013:1–10.
19. Madsen-Bouterse S a., Kowluru R a. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Rev Endocr Metab Disord* [Internet]. 2008;9(4):315–27. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11154-008-9090-4>
20. Pedro Geraldés, Ph.D. and George L King MD. Activation of Protein Kinase C Isoforms & Its Impact on Diabetic Complications. 2011;106(8):1319–31.
21. Zhang X, Wang N, Barile GR, Bao S, Gillies M. Diabetic retinopathy: Neuron protection as a therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;45(7):1525–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.03.002>
22. Tang J, Kern TS. Inflammation in diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;30(5):343–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.05.002>
23. Ling Zheng TSK. Role of nitric oxide, superoxide, peroxynitrite and PARP in diabetic retinopathy. *Front Biosci*. 2009;(14):3974–87.
24. Tikhonenko M, Lydic T a, Wang Y, Chen W, Opreanu M, Sochacki A, et al. , eicosapentaenoic acid [EPA. 2010;59(January):219–27.
25. Adamis AP, Berman AJ. Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2008;30(2):65–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18340447>

26. Eisma JH. Current knowledge on diabetic retinopathy from human donor tissues. *World J Diabetes* [Internet]. 2015;6(2):312. Available from: <http://www.wjgnet.com/1948-9358/full/v6/i2/312.htm>
27. Costa GN, Vindeirinho J, Cavadas C, Ambrósio a. F, Santos PF. Contribution of TNF receptor 1 to retinal neural cell death induced by elevated glucose. *Mol Cell Neurosci* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;50(1):113–23. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044743112000541>
28. Wilkinson-Berka JL. Angiotensin and diabetic retinopathy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(5-6):752–65.
29. Kurihara T, Ozawa Y, Nagai N, Shinoda K, Noda K, Imamura Y, et al. Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling Contributes to the Diabetic Retina. 2008;57(August).
30. Kern TS, Barber AJ. Retinal ganglion cells in diabetes. *J Physiol*. 2008;586(Pt 18):4401–8.
31. Simo R, Hernandez C. Neurodegeneration is an early event in diabetic retinopathy: therapeutic implications. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 2012;96(10):1285–90. Available from: <http://bjo.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bjophthalmol-2012-302005>
32. Ozawa Y, Kurihara T, Sasaki M, Ban N, Yuki K, Kubota S, et al. Neural degeneration in the retina of the streptozotocin-induced type 1 diabetes model. *Exp Diabetes Res*. 2011;2011.
33. Van Dijk HW, Verbraak FD, Kok PHB, Stehouwer M, Garvin MK, Sonka M, et al. Early Neurodegeneration in the Retina of Type 2 Diabetic Patients. *Investig Ophthalmology Vis Sci* [Internet]. 2012;53(6):2715. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.11-8997>
34. Valverde AM, Miranda S, García-Ramírez M, González-Rodríguez Á, Hernández C, Simó R. Proapoptotic and survival signaling in the neuroretina at early stages of diabetic retinopathy. *Mol Vis* [Internet]. 2013;19(January 2012):47–53. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3541044&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
35. Santiago a. R, Cristóvão a. J, Santos PF, Carvalho CM, Ambrósio a. F. High glucose induces caspase-independent cell death in retinal neural cells. *Neurobiol Dis*. 2007;25(3):464–72.
36. Bringmann A, Wiedemann P. Müller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica*. 2011;227(1):1–19.
37. Zeng H, Green WR, Tso MOM. Microglial activation in human diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 2008;126(2):227–32.
38. Li L, Eter N, Heiduschka P. The microglia in healthy and diseased retina. *Exp Eye Res* [Internet]. 2015;136:116–30. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014483515001414>

39. Kowluru R a., Engerman RL, Case GL, Kern TS. Retinal glutamate in diabetes and effect of antioxidants. *Neurochem Int.* 2001;38(5):385–90.
40. Pulido JE, Pulido JS, Erie JC, Arroyo J, Bertram K, Lu MJ, et al. A role for excitatory amino acids in diabetic eye disease. *Exp Diabetes Res.* 2007;2007.
41. Li Q, Puro DG. Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Müller cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(9):3109–16.
42. Lieth E, LaNoue KF, Antonetti D a, Ratz M. Diabetes reduces glutamate oxidation and glutamine synthesis in the retina. The Penn State Retina Research Group. *Exp Eye Res.* 2000;70(6):723–30.
43. Ng YK, Zeng XX, Ling EA. Expression of glutamate receptors and calcium-binding proteins in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Res.* 2004;1018(1):66–72.
44. Santiago AR, Hughes JM, Kamphuis W, Schlingemann RO, Ambrósio AF. Diabetes changes ionotropic glutamate receptor subunit expression level in the human retina. *Brain Res.* 2008;1198:153–9.
45. Darius J, Claudepierre T, Schmidt M, Müller K, Yafai Y, Wiedemann P, et al. Enhanced survival of retinal ganglion cells is mediated by Müller glial cell-derived PEDF. *Exp Eye Res* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;127:206–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2014.08.004>
46. Elahy M, Baidur-Hudson S, Cruzat VF, Newsholme P, Dass CR. Mechanisms of PEDF-mediated protection against reactive oxygen species damage in diabetic retinopathy and neuropathy. *J Endocrinol* [Internet]. 2014;222(3):R129–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24928938>
47. Zhang SX, Wang JJ, Gao G, Parke K, Ma JX. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *J Mol Endocrinol.* 2006;37(1):1–12.
48. Liu Y, Leo LF. Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) Peptide Eye Drops Reduce Inflammation, Cell Death and Vascular Leakage in Diabetic Retinopathy in Ins2 Akita Mice. *Mol Med* [Internet]. 2012;18:1387–401. Available from: [http://www.molmed.org/pdfstore/12\\_008\\_Liu.pdf](http://www.molmed.org/pdfstore/12_008_Liu.pdf)
49. Barnstable CJ, Tombran-Tink J. Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: Molecular targets and therapeutic potential. *Prog Retin Eye Res.* 2004;23(5):561–77.
50. Carrasco E, Hernández C, Miralles A, Huguet P, Farrés J, Simó R. Lower somatostatin expression is an early event in diabetic retinopathy and is associated with retinal neurodegeneration. *Diabetes Care* [Internet]. 2007;30(11):2902–8. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17704349](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17704349)

51. Garcia-Ramírez M, Hernández C, Villarroel M, Canals F, Alonso M a., Fortuny R, et al. Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) is downregulated at early stages of diabetic retinopathy. *Diabetologia* [Internet]. 2009;52(12):2633–41. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-009-1548-8>
52. Valeria Colafrancesco, Marco Coassin SR and LA. Effect of eye NGF administration on two animal models of retinal ganglion cells degeneration. 2011;47(3):284–9.
53. Masaaki Seki, Tanaka T, Hiroyuki Nawa, Tomoaki Usui, Takeo Fukuchi KI, Abe H, Takei and N. Involvement of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Early Retinal Neuropathy of Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Diabetes*. 2004;53(September).
54. Seigel GM, Lupien SB, Campbell LM, Ishii DN. Systemic IGF-I treatment inhibits cell death in diabetic rat retina. *J Diabetes Complications* [Internet]. 2006;20(3):196–204. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16632241>
55. Villacampa P, Ribera A, Motas S, Ramírez L, García M, De La Villa P, et al. Insulin-like growth factor I (IGF-I)-induced chronic gliosis and retinal stress lead to neurodegeneration in a mouse model of retinopathy. *J Biol Chem*. 2013;288(24):17631–42.
56. Xiao C, He M, Nan Y, Zhang D, Chen B, Guan Y, et al. Physiological effects of superoxide dismutase on altered visual function of retinal ganglion cells in db/db mice. *PLoS One*. 2012;7(1).
57. Mandal LK, Choudhuri S, Dutta D, Mitra B, Kundu S, Chowdhury IH, et al. Oxidative stress-associated neuroretinal dysfunction and nitrosative stress in diabetic retinopathy. *Can J Diabetes* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;37(6):401–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcjd.2013.05.004>
58. Fukumoto M, Nakaizumi a., Zhang T, Lentz SI, Shibata M, Puro DG. Vulnerability of the retinal microvasculature to oxidative stress: ion channel-dependent mechanisms. *AJP Cell Physiol*. 2012;302(9):C1413–20.
59. Silva KC, Rosales M a B, Biswas SK, Faria JBL De, Faria JML De. Diabetic Retinal Neurodegeneration Is Associated With Mitochondrial Oxidative Stress and Is Improved by an Angiotensin Receptor Blocker in a Model Combining Hypertension and Diabetes. *Diabetes*. 2009;58(June 2009):1382–90.
60. Sasaki M, Ozawa Y, Kurihara T, Kubota S, Yuki K, Noda K, et al. Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes. *Diabetologia*. 2010;53(5):971–9.
61. Curtis TM, Hamilton R, Yong PH, McVicar CM, Berner a., Pringle R, et al. Müller glial dysfunction during diabetic retinopathy in rats is linked to accumulation of advanced glycation end-products and advanced lipoxidation end-products. *Diabetologia*. 2011;54(3):690–8.
62. Szabadfi K, Szabo A, Kiss P, Reglodi D, Setalo G, Kovacs K, et al. PACAP promotes neuron survival in early experimental diabetic retinopathy. *Neurochem Int* [Internet].

Elsevier Ltd; 2014;64:84–91. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018613002969>