

Mestrado em Bioquímica

ESTUDO DOS EFEITOS PROTETORES DOS AGONISTAS DO RECETOR DO GLP-1 NA RETINOPATIA DIABÉTICA

Lia Marques e Costa

Tese no âmbito do Mestrado em Bioquímica, orientada pela Doutora Rosa Cristina Simões Fernandes e co-orientada pela Doutora Paula Veríssimo e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Agosto de 2018



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Trabalho realizado no Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (iCBR), Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Este trabalho foi financiado pela European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD)/ Glaxo Smith Kline (GSK) Programme, Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Pest UID/NEU/04539/2013), COMPETE-FEDER (POCI-01-0145-FEDER-007440) e Programa Operacional Regional do Centro 2020: HEALTHYAGING 2020 (CENTRO-01-0145-FEDER-000012), BRAINHEALTH 2020 (CENTRO-01-0145-FEDER-000008).



“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você para e encara o medo.”

Eleanor Roosevelt

Agradecimentos

Quando decidi iniciar esta caminhada estava consciente que o que aí vinha não seria fácil. Sabia que esta seria uma batalha na qual teria de enfrentar muitos medos e angústias. Mas como sozinha não seria capaz de vencer, reservo esta secção para agradecer a todos aqueles que lutaram comigo e que me fizeram acreditar que seria possível ultrapassar todos os meus fantasmas.

Em primeiro lugar quero deixar uma palavra de apreço à minha orientadora, a Doutora Rosa Fernandes. Agradeço a orientação que me deu ao longo deste ano, os incentivos constantes que nunca me deixaram desistir, mesmo quando a frustração queria aparecer. Agradeço a confiança que depositou em mim, os desafios que me propôs e as críticas construtivas que me fez, que me tornaram uma pessoa mais ambiciosa. Acima de tudo agradeço a amizade. Aquilo que sou hoje, também a si o devo. Obrigada!

À Doutora Paula Veríssimo pela co-orientação, por todo o apoio prestado e pelas constantes palavras de incentivo ao longo dos anos de mestrado.

Ao Professor Carlos Fontes Ribeiro agradeço o privilégio de poder desenvolver este estudo no Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Ao Doutor Francisco Ambrósio por me ter aceite e acolhido de uma forma tão generosa no seu grupo, *Retinal Dysfunction and Neuroinflammation Lab*, e por me lembrar constantemente que os nossos medos só existem para serem ultrapassados.

À Rita Gaspar, à Raquel Boia e à Maria agradeço a generosidade e disponibilidade que sempre tiveram para comigo. Foram incansáveis nos ensinamentos que me passaram e na ajuda que me prestaram. Obrigada por me ouvirem, por me aconselharem, por me chamarem à realidade... Acima de tudo obrigada por acreditarem e me fazerem acreditar em mim. Vocês são um exemplo de dedicação e persistência!

À Joana Martins e à Catarina Neves pela alegria constante que foram capazes de me transmitir. A vossa boa disposição e o vosso sorriso contagiante fizeram-me encarar até os dias menos bons, de uma forma mais leve. Obrigada por toda a ajuda que, desde sempre, me prestaram. Obrigada pelas conversas, pelos conselhos e, acima de tudo, obrigada por nunca me terem deixado desistir. Vocês têm um brilho especial!

À minha doce Beatriz agradeço a constante força que me passou. Desde início dizíamos estar no mesmo barco. E assim foi! Contra ventos e marés, remámos no mesmo sentido, apoiámo-nos mutuamente. E quando as minhas fraquezas pareciam ser mais fortes do que eu, lá estavas tu a mostrar-me a força que eu não sabia que tinha. Obrigada por todo o apoio que me deste e pelo companheirismo. “Levo-te comigo para a vida!”

À Filipa, à Inês Aires, à Joana Silva, ao Ricardo, ao Fábio e à Elisa agradeço a generosidade que tiveram para comigo, disponibilizando-se sempre para me ajudar no que fosse necessário. Obrigada pela partilha dos bons e maus momentos, pelo incentivo e boa disposição constantes.

À minha companheira de laboratório, a Marisa, agradeço as conversas, os risos e o apoio que me tem dado ao longo destes últimos meses.

A todos os restantes elementos do laboratório o meu agradecimento por todos os momentos de partilha, compreensão, generosidade e ensinamentos que me passaram.

Ao Guedes pelo incentivo e força constantes que me passou. Desde o início que me incentivou a seguir aquele que eu achei ser o melhor caminho para mim, sem nunca me cobrar nada. Agradeço estares sempre lá, seja para brilhar comigo, seja para me amparar as quedas, lembrando-me sempre que o amanhã será melhor. Obrigada a ti, por existires e por me tornares uma pessoa melhor.

À minha irmã pelo apoio incondicional, pela força constante e pela ajuda. Desde sempre que caminhou ao meu lado e sempre acreditou mais em mim do que eu própria. Apesar da tenra idade, és um exemplo de dedicação e persistência! Quero ver-te brilhar!

À minha família por me apoiarem constantemente nas minhas escolhas, e por serem tão importantes na minha vida. Aquilo que hoje sou, a eles o devo.

Índice

Abreviaturas	III
Resumo.....	VII
Abstract.....	IX
1. Introdução	3
1.1 Diabetes <i>Mellitus</i>	3
1.1.1 Epidemiologia e etiologia da diabetes.....	3
1.1.2 Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 1 (DMT1).....	4
1.1.3 Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2 (DMT2).....	5
1.1.4 Complicações da diabetes.....	6
1.2 A retina.....	7
1.2.1 Os componentes celulares da retina	8
1.2.1.1 Os neurónios.....	9
1.2.1.2 As células da glia (neuroglia e microglia).....	9
1.2.2 A barreira hemato-retiniana (BHR).....	10
1.3 A retinopatia diabética	12
1.3.1 Evolução da retinopatia diabética.....	12
1.3.2 A diabetes e rutura da barreira hemato-retiniana.....	13
1.3.3 A inflamação na retinopatia diabética.....	14
1.3.4 Mecanismos moleculares associados à retinopatia diabética.....	16
1.3.5 Terapêuticas atuais para a retinopatia diabética.....	17
1.4 As incretinas e as suas aplicações terapêuticas.....	18
2. Objetivos	23
3. Materiais e Métodos	27
3.1 Modelo animal de diabetes.....	28
3.1.1 Tratamento com liraglutido.....	27
3.1.2 Tratamento com exendina-4 (Ex-4).....	28
3.2 Preparação de extratos totais de retina.....	28
3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida e análise dos níveis de proteína por <i>Western Blotting</i>	29
3.4 Imunohistoquímica em secções de retina.....	30
3.5 Avaliação da rutura da BHR.....	31
3.6 Marcação em <i>Whole mount</i> (ou retinas intactas).....	31

3.7 Análise morfológica das células da microglia	32
3.8 Análise estatística.....	32
4. Resultados.....	37
4.1 Estudo dos potenciais efeitos protetores do liraglutido na retina diabética.....	37
4.1.1 Estudo dos efeitos do liraglutido no peso corporal e parâmetros bioquímicos no modelo animal de DMT1.....	37
4.1.2 O liraglutido previne o aumento da permeabilidade da BHR, induzida pela diabetes.....	38
4.1.3 O liraglutido previne as alterações nos níveis das proteínas das JO induzidas pela diabetes.....	39
4.1.4 A diabetes aumenta tendencialmente os níveis de GL-1R na retina.....	40
4.1.5 A diabetes e o liraglutido modulam a capacidade migratória das células da microglia na retina.....	41
4.2 Estudo dos potenciais efeitos protetores da Ex-4 na retina diabética.....	42
4.2.1 A Ex-4 protege contra o aumento da permeabilidade da BHR induzida pela diabetes.....	43
4.2.2 A diabetes aumenta tendencialmente os níveis proteicos de GLP-1R na retina.....	44
4.2.3 A Ex-4 tem um efeito anti-inflamatório nas retinas dos ratos diabéticos..	44
4.2.4 A Ex-4 previne a alteração da distribuição das células da microglia nas diferentes camadas da retina, induzida pela diabetes.....	45
4.2.5 A Ex-4 previne as alterações morfológicas nas células da microglia induzidas pela diabetes.....	47
5. Discussão	53
6. Conclusões.....	61
7. Referências.....	65

Abreviaturas**A**

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AVC	Acidente vascular cerebral
AGEs	Produtos finais de glicação avançada

B

BCA	Ácido bicinconínico
BHR	Barreira hemato-retiniana
BSA	Albumina de soro bovino

D

DAPI	Dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DL-DTT	(2S,3S)-1,4-Bis-sulfanilbutano-2,3-diol
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DMT1	Diabetes <i>Mellitus</i> do tipo 1
DMT2	Diabetes <i>Mellitus</i> do tipo 2
DPP-4	Dipeptidil peptidase-4
DOC	Desoxicolato de Sódio
DTT	Ditiotreitol

E

ECL	Quimioluminescência melhorada
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Ex-4	Exendina-4

G

GCL	Camada das células ganglionares
GIP	Peptídeo insulínico dependente da glicose
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagão
GLP-1R	Recetor do peptídeo semelhante ao glucagão

H

HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>

I

Iba-1	<i>Ionized calcium binding adaptor molecule</i>
iBHR	Barreira hemato-retiniana interna
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1

IDF	Federação Internacional da Diabetes
IgG	Imunoglobulinas
IL	Interleucina
INL	Camada nuclear interna
Ip	Intraperitoneal
IPL	Camada plexiforme interna
IR	Isquémia-reperfusão
J	
JO	Junções oclusivas
K	
KCl	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
M	
MAJ	Molécula de adesão juncional
N	
NaCl	Cloreto de sódio
Na₂HPO₄(2H₂O)	Di-hidrogenofosfato dissódico di-hidratado
Na₃VO₄	Ortovanadato de sódio
NF-KB	Fator nuclear KB
NFL	Camada das fibras nervosas
O	
oBHR	Barreira hemato-retiniana externa
OCT	<i>Optimal cutting temperature</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONL	Camada nuclear externa
OPL	Camada plexiforme externa
P	
PBS	Tampão salino de fosfato
PKC	Proteína cinase C
PMFS	Fenilmetilsulfunilo
PRL	Camada dos fotorreceptores
PVDF	Difluoreto de polivildieno
R	
RD	Retinopatia diabética
RDNP	Retinopatia diabética não proliferativa
RDP	Retinopatia diabética proliferativa

RE	Retículo endoplasmático
S	
SDS	Lauril sulfato de sódio
STZ	Streptozotocina
T	
TNF-α	Fator de necrose tumoral
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
Triton X-100	4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenoglicol
V	
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
Z	
ZO-1	<i>Zonula occludens</i>

Resumo

A retinopatia diabética é uma das principais causas de perda de visão, incluindo cegueira, em indivíduos diabéticos em idade ativa, nos países desenvolvidos. Atualmente, os tratamentos disponíveis para a retinopatia diabética são direcionados para as fases mais avançadas da doença, em que a visão já se encontra comprometida. Estes tratamentos são invasivos, não sendo eficazes para todos os doentes, e possuem vários riscos associados, nomeadamente o de infeções como a endoftalmite infecciosa e o risco de descolamento da retina. Além disso, a adoção destes tratamentos permite apenas retardar a progressão da doença e não a sua cura. Neste sentido é importante que sejam desenvolvidas e implementadas estratégias terapêuticas direcionadas para as fases mais iniciais da retinopatia diabética, em que os processos sejam reversíveis e que seja possível prevenir a perda de visão.

As terapias antidiabéticas baseadas nas incretinas são divididas em duas classes: os inibidores da enzima dipeptidil-peptidase-4 (DPP-4) e os agonistas do recetor do peptídeo semelhante ao glucagão (GLP-1R). Ambas visam o aumento do tempo de meia-vida da hormona incretina GLP-1 em circulação (composto importante para a manutenção da homeostase da glicose). A administração destes fármacos melhora o controlo glicémico através do aumento de produção e secreção de insulina em doentes com diabetes tipo 2. Estudos anteriores do nosso grupo mostraram que a sitagliptina, que é um inibidor da DPP-4, tem efeitos pleiotrópicos, prevenindo a inflamação e a apoptose das células da retina e exercendo um efeito benéfico na integridade da barreira hemato-retiniana (BHR) em modelos animais de diabetes, tanto do tipo 2 (DMT2) como do tipo 1 (DMT1). Ainda, estudos mais recentes do grupo mostraram que a Exendina-4 (Ex-4), um agonista do GLP-1R, previne a rutura da BHR e a inflamação na retina, através da inibição de citocinas inflamatórias pelas células da microglia, num modelo animal de lesão retiniana por isquémia-reperfusão (IR), que mimetiza as principais características da retinopatia diabética (neurodegenerescência, neuroinflamação e aumento da permeabilidade da BHR).

Este trabalho teve como objetivo avaliar os potenciais efeitos benéficos dos agonistas do GLP-1R na retina diabética, por um mecanismo independente do aumento da produção e secreção de insulina. Para tal utilizou-se um modelo animal de diabetes do tipo 1, com diabetes induzida por streptozotocina e estudou-se o efeito de dois agonistas do GLP-1R, o liraglutido e a Ex-4. Mais especificamente, avaliou-se o potencial efeito protetor destes agonistas na rutura da BHR, bem como de que forma estes compostos modulam a reatividade das células da microglia. Este aspeto foi avaliado em termos da sua capacidade migratória nas camadas da retina e das suas alterações morfológicas.

O tratamento com liraglutido (200 µg/Kg/2x dia) foi iniciado duas semanas após a indução da diabetes e prolongou-se por mais duas semanas, não se tendo verificado nenhuma alteração no peso e nos níveis de glicémica e hemoglobina glicosilada dos animais diabéticos tratados com o fármaco, comparativamente com os animais diabéticos. O liraglutido preveniu o aumento da permeabilidade da BHR, induzido pela diabetes, bem como as alterações nos níveis das proteínas das junções oclusivas (claudina-5 e ocludina). Além disso, verificou-se que este agonista do GLP-1R modula a capacidade migratória das células da microglia na retina, induzida pela diabetes.

O tratamento com a Ex-4 (10 µg/Kg/2x dia) foi iniciado uma semana após a indução da diabetes, tendo-se prolongado por mais três semanas. A Ex-4 não teve qualquer efeito nos níveis de insulina dos animais diabéticos. Os resultados obtidos mostraram que a Ex-4 previne a rutura da BHR e que este fármaco tem um efeito anti-inflamatório nas retinas de ratos diabéticos, através da inibição de citocinas pró-inflamatórias, prevenindo o aumento dos níveis da molécula de adesão molecular (ICAM-1). A Ex-4 mostrou, ainda, que tem a capacidade não só de prevenir a alteração da distribuição das células da microglia, nas diferentes camadas da retina, como também previne as alterações morfológicas destas células, induzidas pela diabetes.

Na sequência de um estudo anterior do grupo, este trabalho vem reforçar a ideia de que os agonistas do GLP-1R, liraglutido e Ex-4, conseguem prevenir a rutura da BHR por diminuição do estado pró-inflamatório via inibição da reatividade das células da microglia da retina.

PALAVRAS-CHAVE: Retinopatia diabética, barreira hemato-retiniana, inflamação, Exendina-4, Liraglutido

Abstract

Diabetic retinopathy is one of the leading causes of vision loss, in developing-age diabetic individuals, in developed countries. Currently, the treatments available for diabetic retinopathy are against to the advanced stages of the disease, where vision is already compromised. These treatments are invasive and not effective for all patients and have several associated risks, namely infections such as endophthalmitis, and the risk of retinal detachment. In addition, they only delay the progression of the disease, being not able to healing it. In this sense, it is important to develop new therapeutic strategies directed to the earliest stages of diabetic retinopathy, in which the processes are reversible, and could prevent the loss of vision.

Incretin-based antidiabetic therapies are divided into two classes: dipeptidyl peptidase-4 inhibitors (DPP-4) and glucagon-like peptide receptor agonists (GLP-1R). Both aim to increase the half-life of the circulating incretin hormone GLP-1 (which is an important compound for the maintenance of glucose homeostasis). Administration of these drugs improves glycemic control by increasing insulin production and secretion in patients with type 2 diabetes. Previous studies in our group have shown that sitagliptin, which is a DPP-4 inhibitor, has pleiotropic effects, preventing inflammation and apoptosis of retinal cells and exerting a beneficial effect on the integrity of the blood-retinal barrier (BRB) in animal models type 2 (T2DM) and type 1 (T1DM) of diabetes. Furthermore, recent studies of the group have shown that Exendin-4 (Ex-4), a GLP-1R agonist, prevents BRB rupture and inflammation in the retina by inhibiting inflammatory cytokines by microglial cells in an ischemia-reperfusion animal model (IR), which mimics the main features of diabetic retinopathy (neurodegeneration, neuroinflammation and increased permeability of BRB).

This work aimed to evaluate the potential beneficial effects of GLP-1R agonists on the diabetic retina, by an independent mechanism of increased insulin production and secretion. For this purpose, an animal model of type 1 diabetes with streptozotocin-induced diabetes was used and the effect of two GLP-1R agonists, liraglutide and Ex-4, was evaluated. More specifically, the potential protective effect of these agonists on the breakdown of BHR was evaluated, as well as how these compounds modulate the reactivity of microglial cells. This aspect was evaluated in terms of its migratory capacity in the different layers of the retina as well as morphological changes.

Treatment with liraglutide (200 µg/kg/2x day) started two weeks after the induction of diabetes and lasted for two more weeks. No changes were observed between diabetic and diabetic treated animals, in terms of body weight, glycemic levels and glycosylated hemoglobin levels. Liraglutide prevented the increase of BHR permeability and changes in occlusive junction protein levels (claudin-5 and

occludin), in diabetic animals. In addition, it has been found that this GLP-1R agonist modulates the migratory capacity of the microglial cells in the retina, induced by diabetes.

Treatment with Ex-4 (10 µg/kg/ 2x day) was started one week after the induction of diabetes and lasted for another three weeks. Ex-4 had no effect on the insulin levels of diabetic animals. The results showed that Ex-4 prevents the breakdown of BRB and has an anti-inflammatory effect in the retinas of diabetic rats, by inhibiting pro-inflammatory cytokines and preventing the increase of levels of the molecular adhesion molecule (ICAM-1). Ex-4 also has the ability not only to prevent alteration of the distribution of microglia cells in the different layers of the retina, but also to prevent the morphological alterations of these cells, induced by diabetes.

Following an earlier study by the group, this work reinforces the idea that GLP-1R agonists, liraglutide and Ex-4, can prevent BRB rupture by decreasing the pro-inflammatory state via inhibition of cell reactivity microglia of the retina.

KEYWORDS: *Diabetic retinopathy, blood-retinal barrier, inflammation, Exendin-4, Liraglutide*

1. Introdução

1.1 Diabetes *Mellitus*

1.1.1 Epidemiologia e etiologia da diabetes

A Diabetes *Mellitus* (DM) é considerada um grave problema de saúde pública, não apenas pela sua crescente incidência e prevalência a nível mundial, mas também pela elevada morbidade e mortalidade associada (Owu *et al.*, 2013), sendo atualmente, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma das principais causas de morte no mundo. Esta doença é cada vez mais frequente na nossa sociedade e a sua prevalência aumenta significativamente com a progressão da idade, atingindo ambos os sexos e todas as idades (Sociedade Portuguesa de Diabetologia, 2015). Segundo dados da Federação Internacional da Diabetes (IDF) existem mais de 425 milhões de pessoas com diabetes em todo o mundo (International Diabetes Federation, 2017). Porém, estima-se que este valor aumente consideravelmente, atingindo, em 2045, aproximadamente 629 milhões de pessoas (Fig. 1.1).

Portugal encontra-se entre os países europeus com maior prevalência da doença: dados do Observatório Nacional da Diabetes, relativos ao ano 2015, indicam uma prevalência de 13,3% da população (mais de 1 milhão de indivíduos), com idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos. No entanto, esta doença apenas se encontra diagnosticada em 7,5% dos casos (Gardete-Correia *et al.*, 2010).

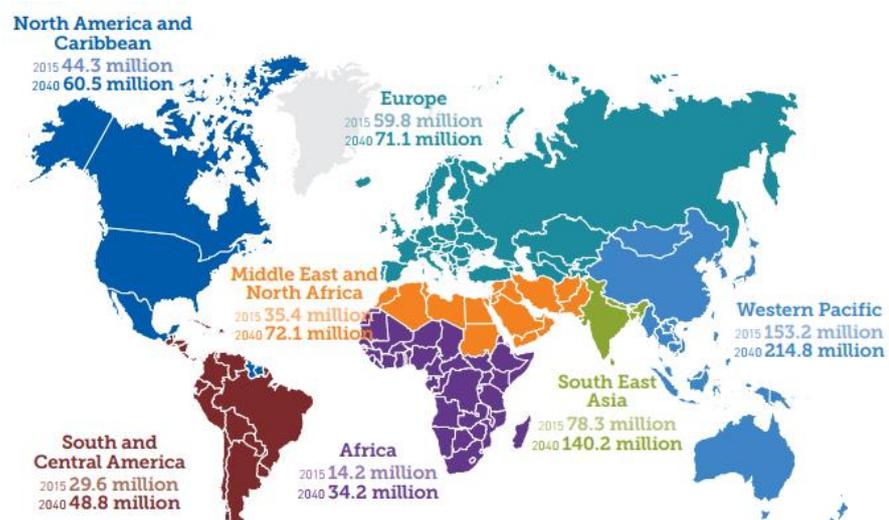


Figura 1.1 Prevalência global (%) de DM na população adulta (20-79 anos) em 2015, em função da região geográfica. (Fonte: International Diabetes Federation, 2017)

Apesar de ser uma doença cuja prevalência é transversal aos mais diversos grupos sociodemográficos, salientam-se algumas diferenças, nomeadamente no que respeita ao género e à idade. É de notar, portanto, que existe uma maior incidência da diabetes em indivíduos do sexo masculino (15,8%), comparativamente ao sexo feminino (10,8%), bem como uma maior prevalência no escalão etário compreendido

entre os 60 e os 79 anos de idade (cerca de um quarto dos indivíduos deste escalão sofrem de DM) (Sociedade Portuguesa de Diabetologia, 2015).

A DM é descrita como um transtorno metabólico, de etiologia múltipla, que se caracteriza por um estado de hiperglicemia crónica, com alterações no metabolismo dos hidratos de carbono, gorduras e proteínas, resultante de distúrbios na secreção e/ou ação da insulina (Alberti and Zimmet, 1998).

De acordo com a OMS e a IDF, a DM divide-se em duas classes clínicas principais distintas: a DM tipo 1 (DMT1) e a DM tipo 2 (DMT2) (World Health Organization, 1999), ainda que existam outros tipos de diabetes, entre as quais a diabetes gestacional, a diabetes *Insipidus* e outros tipos específicos (Robertson GL, 1995; Gardete-Correia *et al.*, 2010). Recentemente, num estudo de indivíduos com diabetes, foi feita a identificação de cinco grupos de diabetes, com base em seis variáveis (idade de diagnóstico, hemoglobina glicosilada, grau de resistência à insulina, presença de auto-anticorpos específicos contra os ilhéus no soro, índice de massa corporal e marcadores de resistência à insulina). Com base nesta estratificação, foram considerados 5 tipos de diabetes, um correspondendo à DMT1 e quatro de DMT2 (Ahlqvist *et al.*, 2018).

Na origem da DM está uma diminuição do número de células β pancreáticas, devido à morte celular por apoptose e/ou a uma deficiente regeneração deste tipo de células, processos estes que são mediados pela ativação das vias metabólicas, em resposta à condição de hiperglicemia crónica estabelecida (M Cnop *et al.*, 2005).

1.1.2 Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1)

A DMT1 é considerada a forma mais grave entre os tipos de diabetes, sendo muitas vezes denominada por diabetes juvenil, uma vez que, embora possa ocorrer em qualquer idade, é geralmente diagnosticada em crianças e jovens adultos, representando cerca de 5-10% dos casos diagnosticados (Ding, Gysemans and Mathieu, 2013). Apesar dos doentes que apresentam esta forma de diabetes não serem geralmente obesos, a presença de obesidade não é incompatível com este diagnóstico.

Na base dos eventos patofisiológicos da DMT1 está uma disfunção e destruição auto-imune seletiva e progressiva das células β dos ilhéus de Langerhans pancreáticos, responsáveis pela produção de insulina que, em conjunto com múltiplas predisposições genéticas e fatores ambientais, contribuem para a ativação imunológica que irá desencadear este processo destrutivo. Como tal, esta forma de DM é também designada como insulino-dependente.

A etiologia auto-imune da DMT1 é confirmada pela presença de anticorpos circulantes específicos contra antígenos das células β pancreáticas ou contra insulina, os quais são detetados em 85-90% dos indivíduos com DMT1, no momento do diagnóstico (Roep, 2003). Esta destruição auto-imune das células β pancreáticas conduz a uma deficiência severa na produção de insulina e, conseqüentemente, a

uma hiperglicemia crónica. Quando não tratados, estes distúrbios metabólicos conduzem gradualmente à disfunção do sistema nervoso central, coma e, conseqüentemente, morte. Na sequência da incapacidade de produção de insulina, torna-se imprescindível a administração exógena da mesma, de modo a assegurar a manutenção dos níveis normais de glicémia e assim garantir a homeostasia do organismo (M Cnop *et al.*, 2005; Ichinose, Kawasaki and Eguchi, 2007; Reimann *et al.*, 2009) (Fig. 1.2).

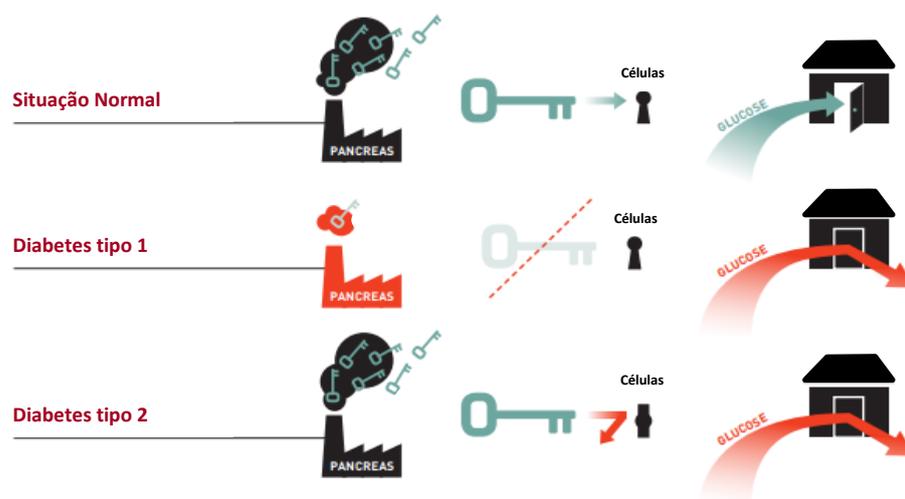


Figura 1.2 Caracterização dos diferentes tipos de Diabetes. (Adaptado: International Diabetes Federation (IDF), 2013)

1.1.3 Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DMT2)

A DMT2 constitui a forma mais comum de diabetes, contribuindo para aproximadamente 70 a 85% dos casos de diabetes em todo o mundo e ocorre predominantemente em adultos acima dos 30 anos de idade (Ahlqvist *et al.*, 2018). Esta forte prevalência deve-se, em grande parte, a um estilo de vida sedentário, falta de atividade física, aumento da obesidade e dieta não saudável, características cada vez mais comuns na sociedade atual (Hossain, Kavar and El Nahas, 2007). No entanto, na última década, registou-se um aumento significativo nos casos de DMT2 diagnosticados em indivíduos em idades mais jovens (crianças e adolescentes), sugerindo uma associação com o aumento da obesidade infantil (Blaschke, Caglayan and Hsueh, 2006; Hossain, Kavar and El Nahas, 2007; Badyal and Kaur, 2008).

Como referido atrás, a DMT2 parece abranger quatro categorias (Ahlqvist *et al.*, 2018), sendo duas delas consideradas severas e as outras duas formas moderadas. Entre os dois tipos mais severos de DMT2, foi identificado um subgrupo de doentes (11-17%) com severa resistência à insulina, associado principalmente à obesidade, e na qual foi encontrada uma maior incidência de desenvolvimento de doença renal diabética. Um outro grupo relativamente jovem (9-20%), caracterizado

por severa deficiência na produção de insulina e com níveis elevados de hemoglobina glicosilada apresentou uma maior predisposição para desenvolver retinopatia diabética (RD). A percentagem mais elevada de DMT2 pertence às formas moderadas: um grupo com obesidade moderada que é encontrada nos doentes obesos jovens (18-23%) e um outro grupo de diabéticos relacionado com a idade que consiste essencialmente em pessoas em idade avançada (cerca de 47%) (Ahlqvist *et al.*, 2018).

Contrariamente à DMT1, a DMT2 não é uma doença auto-imune e caracteriza-se por uma resistência à insulina e pela disfunção das células β pancreáticas. Numa fase inicial da DMT2, existe um estado de resistência à insulina, levando a mudanças qualitativas e quantitativas na sua secreção. Esta resistência à insulina é descrita como uma incapacidade da insulina, tanto endógena como a exógena, absorver moléculas de glicose, a partir do sangue, resultando num aumento dos níveis de glicémia (hiperglicemia) (Virally *et al.*, 2007). Em consequência do estado de hiperglicemia, há um aumento compensatório da secreção de insulina, pelas células β pancreáticas (hiperinsulinémia), a fim de tentar promover o adequado controlo dos níveis de glicose no sangue. Este processo diminui a capacidade de secreção de insulina pelas células β -pancreáticas, levando a uma eventual falha e perda progressiva dessas mesmas células (Butler *et al.*, 2003; Virally *et al.*, 2007)(Fig. 1.2).

1.1.4 Complicações da diabetes

A DM é considerada uma patologia “silenciosa”, uma vez que um indivíduo pode viver durante anos sem apresentar sintomas da doença, durante os quais os elevados níveis de glicose estarão a prejudicar de forma silenciosa vários órgãos. A frequência, a gravidade e a progressão das complicações diabéticas estão relacionadas com vários fatores, tais como a hiperglicemia, alterações metabólicas associadas à duração da doença, exposição a fatores de risco e também com o ambiente genético.

As complicações associadas à DM são resultantes da toxicidade da glicose e ativação de várias vias metabólicas intracelulares, ativação anormal de cascatas de sinalização, aumento da ativação das vias de hexosamina e poliols e produção elevada de espécies reativas de oxigénio (Giacco and Brownlee, 2010). Regra geral, surgem num período de 15 a 20 anos após o início da doença, sendo maioritariamente complicações tanto a nível micro, como macrovascular (Calcutt *et al.*, 2009; Fowler, 2011) (Fig. 1.3). Além disso, algumas evidências sugerem que a inflamação e o *stress* do retículo endoplasmático (RE) também desempenham um papel importante na patogénese da diabetes (Miriam Cnop *et al.*, 2005).

A diabetes não controlada pode conduzir a complicações macrovasculares (alterações nos grandes vasos sanguíneos) e microvasculares (lesões nos vasos sanguíneos pequenos). As primeiras englobam as doenças cardiovasculares, como o enfarte agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença vascular cerebral.

As complicações crônicas microvasculares da diabetes incluem a retinopatia, nefropatia e neuropatia. A retinopatia diabética é considerada a principal causa de perda de visão a nível mundial, entre os adultos em idade ativa (Hendrick, Gibson and Kulshreshtha, 2015; Ting, Cheung and Wong, 2015). Apesar desta complicação microvascular ser mais comum na DMT1, o desenvolvimento da doença parece ser semelhante em ambos os tipos de diabetes (DMT1 e DMT2) e a sua incidência está correlacionada com a duração da diabetes (Romero-Aroca *et al.*, 2017).

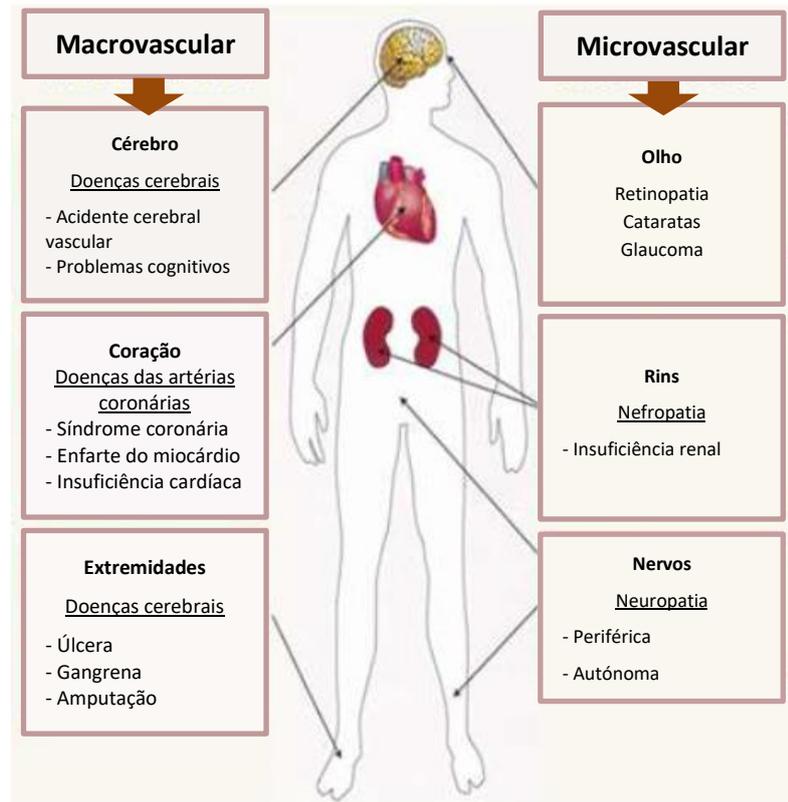


Figura 1.3 Complicações micro e macrovasculares associadas à diabetes (Adaptado de Cefalu e Canon, 2007).

1.2 A retina

A retina é uma estrutura transparente de tecido nervoso, sensível à luz, localizado na parte posterior do globo ocular, e cuja principal função consiste na conversão de estímulos luminosos em impulsos elétricos, que são, posteriormente, enviados através das vias óticas para o córtex visual, para posterior processamento de imagem.

Cerca de 80% das informações sensoriais, em humanos, têm origem na retina (Sharma *et al.*, 2003; Hildebrand and Fielder, 2011), o que evidencia a importância de uma função retiniana saudável.

A estrutura anatómica da retina é composta essencialmente, por uma camada neurosensorial interna (adjacente ao vítreo) e uma camada mais externa constituída por células epiteliais, designada de epitélio pigmentado da retina (junto à coróide).

A retina neurosensorial está dividida em sete camadas distintas: a camada de fibras nervosas (NFL, camada mais próxima do vítreo), a camada de células ganglionares (GCL), camada plexiforme interna (IPL), camada nuclear interna (INL), camada plexiforme externa (OPL), camada nuclear externa (ONL), camada dos fotorreceptores (PRL) (Fig. 1.4).

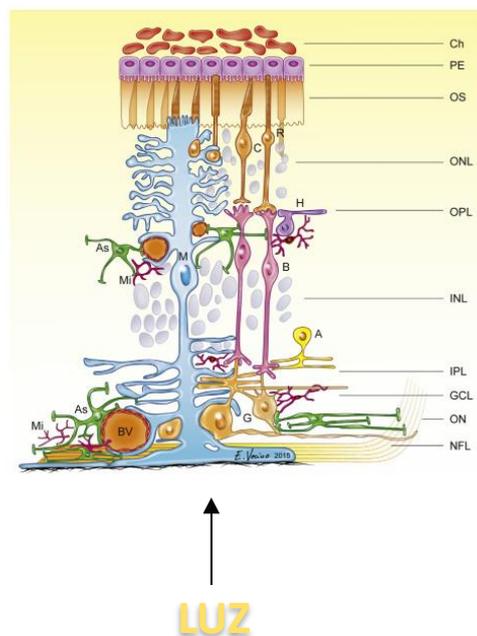


Figura 1.4 Representação esquemática de uma secção transversal da retina apresentando as diferentes camadas constituintes e os vários tipos de células da retina. Os componentes celulares da retina. Legenda: Vasos sanguíneos (BV), células amácrinas (A), astrócitos (AS), células bipolares (B), cones (C), células ganglionares (G), células horizontais (H), células de Müller (M), microglia (Mi), varas (R), cones (C). Observe a localização das diferentes camadas da retina (das camadas mais internas às externas): nervo ótico (ON), camada de fibras nervosas (NFL), camada de células ganglionares (GCL), camada plexiforme interna (IPL), camada nuclear interna (INL), camada plexiforme externa (OPL), camada nuclear externa (ONL), camada do segmento externo (OS), epitélio pigmentado da retina (PE), coróide (Ch). (Adaptado de Vecino *et al.*, 2016)

1.2.1 Os componentes celulares da retina

Os principais constituintes celulares da retina são os neurónios (fotorreceptores, células bipolares, células horizontais, células amácrinas e células ganglionares), as células da glia (células de Müller, astrócitos e células da microglia), as células do epitélio pigmentado da retina e as células vasculares (células endoteliais e pericitos) (Fig. 1.4) (Simó and Hernández, 2015; Vecino *et al.*, 2016).

1.2.1.1 Os neurónios

A retina é constituída por vários tipos de células, onde predominam os neurónios, com organelos semelhantes aos das outras células, mas com uma forma diferenciada (um segmento externo (fotopigmento), segmento interno (mitocôndria e retículo endoplasmático), um núcleo, uma fibra interna (análoga ao axónio) e um terminal sináptico (Hildebrand and Fielder, 2011). Os neurónios encontram-se divididos em cinco grupos: fotorreceptores, células bipolares, células ganglionares, células amácrinas e células horizontais.

Os fotorreceptores encontram-se na camada junto ao epitélio pigmentado da retina. Estas células são responsáveis pelo processo de conversão dos impulsos luminosos em sinais elétricos (Levin, 2003). Os interneurónios presentes na camada nuclear interna fazem a ponte entre os fotorreceptores e as células ganglionares, permitindo a transmissão do sinal à camada das células ganglionares, via células bipolares, horizontais, amácrinas e interplexiformes (Hildebrand and Fielder, 2011).

1.2.1.2 As células da glia (neuroglia e microglia)

As células da glia encontradas na retina podem ser de dois tipos distintos: as células da neuroglia, às quais pertencem os astrócitos e as células de Müller, e as células da microglia. Estas células são capazes de monitorizar o microambiente local e fornecer suporte nutricional e regulatório aos neurónios, devido à sua organização e disposição espacial na retina (Hildebrand and Fielder, 2011).

As células de Müller e os astrócitos

As células de Müller apresentam uma orientação radial e estendem-se desde a membrana limitante externa até à membrana limitante interna. Estas são consideradas as principais células da glia existentes na retina (Weale, 1974; Hildebrand and Fielder, 2011). São importantes na medida em que regulam o balanço iónico extracelular (Reichenbach *et al.*, 2007), estando envolvidos no ciclo da glutamina/glutamato, contribuindo assim, para a homeostase da retina. Estas células têm também um papel importante no controlo da neurotransmissão e proteção dos neurónios contra a excitotoxicidade do glutamato (Antonetti *et al.*, 1998; Lieth *et al.*, 2001).

Os astrócitos encontram-se geralmente a envolver os vasos sanguíneos nas camadas NFL e GCL, apesar de também se poderem encontrar na IPL e na INL (Provis, 2001). Estudos recentes sugerem que os astrócitos desempenham um papel importante, em condições patológicas de inflamação e lesão da retina (Wang *et al.*, 2014).

Os astrócitos, em conjunto com as células de Müller, fornecem aos neurónios substratos essenciais provenientes da circulação sanguínea e contribuem para a manutenção das propriedades de barreira dos capilares da retina (Gardner *et al.*,

1997). Além disso desempenham também um papel importante ao nível da função sináptica (Newman, 2003).

As células da microglia

As células da microglia são consideradas as células imunocompetentes do sistema nervoso central, que funcionam como os macrófagos na retina (Lee et al., 2008; Karlstetter et al., 2014).

Numa situação basal, as células da microglia encontram-se altamente ramificadas e distribuídas essencialmente pela IPL e OPL (Grigsby *et al.*, 2014). Em resposta a determinados estímulos, estas células são ativadas, alterando a sua morfologia ramificada para um estado amebóide. Uma vez ativadas, estas células podem migrar em direção ao local da lesão e podem assumir diferentes estados fenotípicos (Grigsby *et al.*, 2014): anti-inflamatório, expressando citocinas anti-inflamatórias (Kradý *et al.*, 2005; Madeira *et al.*, 2015) e removendo as células apoptóticas por um mecanismo de fagocitose; ou pró-inflamatório, libertando mediadores pró-inflamatórios. No entanto, na sequência de uma ativação prolongada, ocorre uma exacerbação da sua reatividade, o que pode contribuir para uma inflamação crónica e perda neuronal (Karlstetter *et al.*, 2014).

1.2.2 Barreira hemato-retiniana (BHR)

Devido à sua função sensorial, a retina é um tecido metabolicamente muito ativo, necessitando de uma complexa rede vascular para o fornecimento contínuo de nutrientes e de oxigénio. Apesar dos vasos retinianos terem como principal função fornecer nutrientes, eles têm a propriedade de barreira seletiva, restringindo o fluxo de iões, metabolitos, nutrientes, toxinas e células inflamatórias de e para a retina, de modo a assegurar a manutenção da estrutura e função da retina (Badyal and Kaur, 2008).

A BHR é constituída por duas componentes: a barreira hemato-retiniana interna (iBHR), constituída pelas células endoteliais unidas entre si por junções oclusivas (JO) e a barreira hemato-retiniana externa (oBHR), constituída pelas células do epitélio pigmentado da retina, unidas também por JO (Badyal and Kaur, 2008). Atualmente, a iBHR é considerada uma unidade neuroglialvascular, fazendo parte dela as células endoteliais, sendo que o seu desenvolvimento e manutenção são regulados pelas células da glia e pericitos, contribuindo, também, para a integridade das JO. As JO têm como função permitir a passagem seletiva de moléculas através da BHR (Cunha-Vaz, Shakib and Ashton, 1966) (Fig. 1.5A).

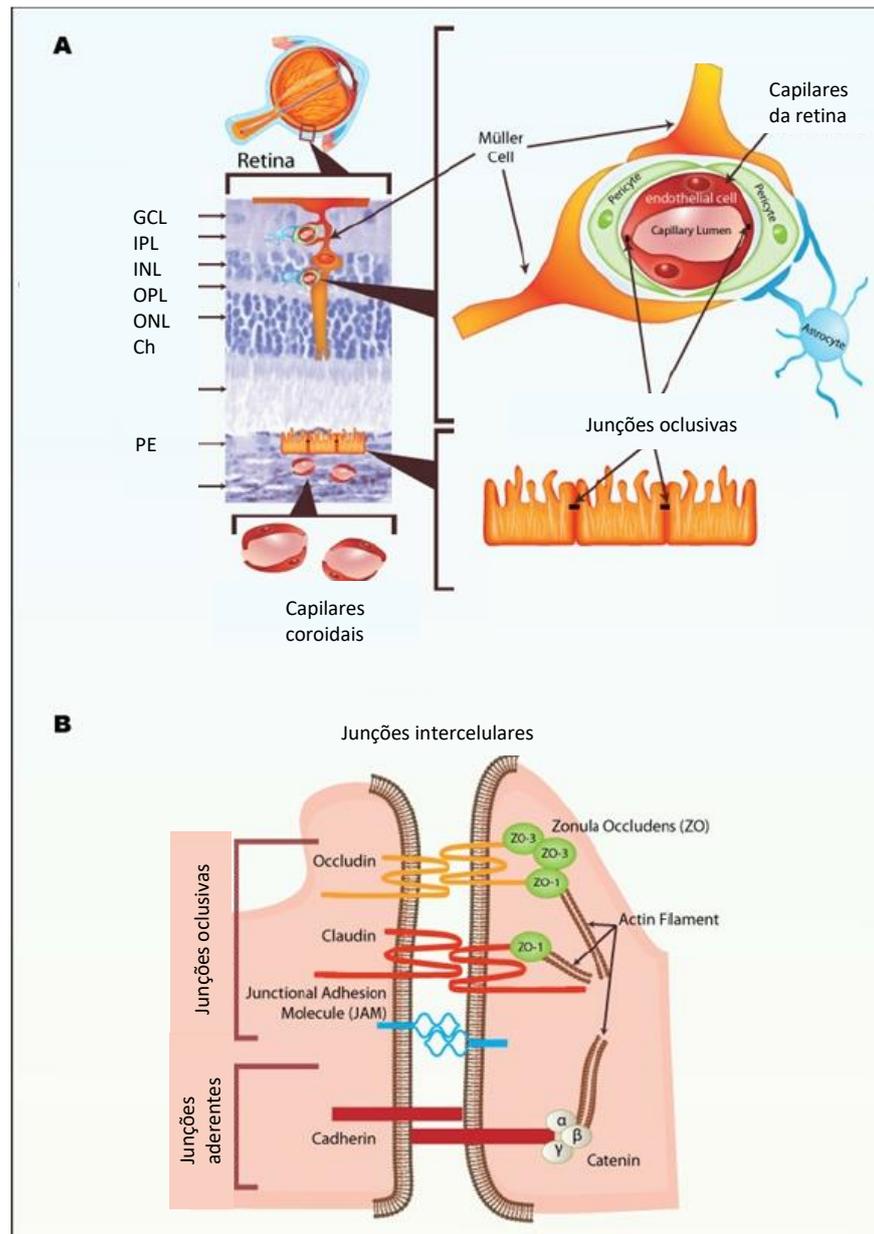


Figura 1.5 A: Representação esquemática da barreira hemato-retiniana; B: Representação esquemática da estrutura e componentes das junções oclusivas (H. and Huang, 2012).

O movimento de água e substâncias através da barreira é altamente regulado e ocorre de duas formas distintas: através das células – fluxo transcelular - e entre as células – fluxo paracelular. O fluxo transcelular envolve a intervenção de vesículas de transporte especializadas e o transporte é mediado por recetores. O fluxo paracelular, por sua vez, é regulado pelas JO, que se encontram entre células adjacentes. Este complexo inclui junções aderentes, junções de hiato e desmossomas (Gonçalves *et al.*, 2012).

As JO apresentam a função de barreira, regulando o fluxo de água, iões e solutos entre as células epiteliais e as células endoteliais. São ainda responsáveis pela manutenção da polaridade das células, evitando a difusão de substâncias entre as

membranas plasmáticas apicais e basolaterais (Gardner *et al.*, 2002; Badyal and Kaur, 2008) (Fig. 1.5B).

As JO são constituídas por uma combinação de várias proteínas transmembranares tais como claudinas, ocludina, molécula de adesão juncional (MAJ) e várias proteínas citosólicas como as *zonula occludens* (ZO-1, ZO-2 e ZO-3), podendo ser encontradas na região apical ou luminal das células epiteliais ou endoteliais (Fig. 1.5B).

A ocludina e as claudinas são proteínas transmembranares com a capacidade de selar as células adjacentes, restringindo, desta forma, o fluxo de substâncias entre células endoteliais adjacentes. A ocludina é expressa essencialmente ao nível das células epiteliais e endoteliais, pelo que os seus níveis estão relacionados com o grau de permeabilidade da barreira (Mitic and Anderson, 1998). De entre as várias isoformas conhecidas da claudina, destaca-se a claudina-5 que é predominantemente expressa nas células endoteliais do cérebro e da retina (Antonetti *et al.*, 1998; Gonçalves *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2014). As proteínas citosólicas, ZO-1/2/3, são fundamentais, pois conferem suporte estrutural às JO, uma vez que estabelecem interações específicas entre as proteínas transmembranares e as proteínas do citoesqueleto (Fanning, Mitic and Anderson, 1999; Wittchen, Haskins and Stevenson, 1999) (Fig. 1.5B).

1.3 A retinopatia Diabética

1.3.1 Evolução da Retinopatia Diabética

A RD é uma das complicações mais comum da diabetes e é a principal causa de cegueira em adultos, com idades compreendidas entre os 20 e os 74 anos (Aiello *et al.*, 1997). O diagnóstico da RD é feito essencialmente por exames oftalmológicos e por fotografia do fundo do olho, uma vez que se baseiam essencialmente na deteção do grau de severidade das lesões microvasculares. A presença de microaneurismas, permeabilidade vascular aumentada, hemorragias intraretinianas, exsudatos, anomalias microvasculares e neovascularização (formação de novos vasos) (Gardner *et al.*, 2011) são alterações que permitem a identificação dos diferentes estadios de progressão da doença. A RD manifesta-se, regra geral, num período de 15 a 20 anos após o início da diabetes, com o aparecimento de lesões nos vasos da retina (Ruas, 2003).

A RD pode ser classificada em dois tipos principais: retinopatia diabética não proliferativa (RDNP) e retinopatia diabética proliferativa (RDP) (Cunha-Vaz, 2006).

As alterações encontradas na RDNP consistem essencialmente num espessamento da membrana basal capilar, um aumento da permeabilidade vascular, oclusão capilar, perda de pericitos e células endoteliais, as quais poderão conduzir à formação de microaneurismas, hemorragias e edema macular.

Por sua vez, a RDP ocorre quando a oclusão dos capilares da retina leva à isquemia retiniana, promovendo o desenvolvimento de novos vasos disfuncionais (neovasos). Estes vasos são muito frágeis, devido ao facto de serem providos de um endotélio muito fino, sofrendo facilmente ruturas, aumentando assim o risco de hemorragia vítrea. O edema macular é o principal responsável pela perda de visão irreversível e eventual cegueira, como consequência do extravasamento de fluído na mácula (região central da retina) (Stitt *et al.*, 2013).

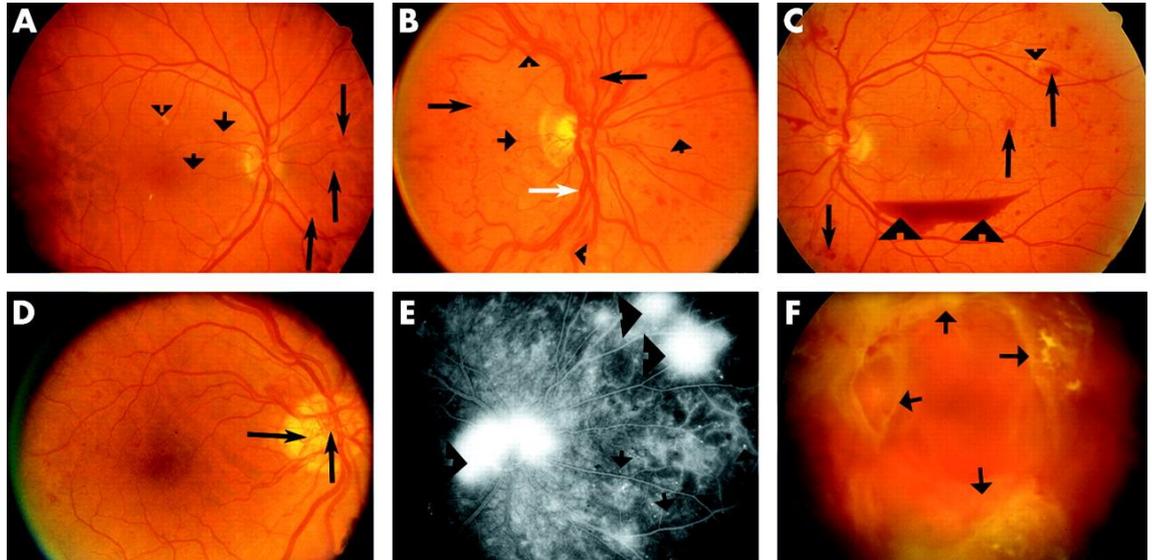


Figura 1.6 Fotografia colorida de fundo do olho e angiografia fluorescente evidenciando as alterações nos diferentes estadios de RD. (A) Olho com ligeira RDNP apresentando microaneurismas (setas curtas), hemorragias (setas longas), bem como exsudatos duros e moles (cabeça de seta). (B) Olho com RDNP grave, com maior número de microaneurismas (setas curtas), hemorragias (setas longas) e também anomalias nos vasos, como dilatação vascular (seta branca) e tortuosidade (cabeças de setas) dos vasos. (C) e (D) Olhos com RDP. (C) Identificação de hemorragias (setas longas), neovasos e hemorragia pré-retiniana (setas grandes). (D) Aparecimento de neovasos (setas longas). (E) Olho com RD em estadio avançado, evidenciando extravasamento da sonda fluorescente pelos novos vasos (cabeças de setas) e pequenas manchas de hiperfluorescência, que representam microaneurismas (setas). (F) Olho com RDP avançada mostrando extensa proliferação fibrovascular (setas) (Adaptado de Lai *et al.*, 2005).

1.3.2 A diabetes e rutura da barreira hemato-retiniana

Atualmente as causas e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da RD não se encontram ainda bem conhecidos. Algumas das alterações bioquímicas e histológicas que ocorrem, já se encontram descritas na literatura. Sabe-se que inicialmente surge uma disfunção microvascular da retina e que a alteração de permeabilidade ao nível da BHR, é uma das principais características da RD (Cunha-Vaz *et al.*, 1975). À medida que a doença progride verifica-se um aumento da permeabilidade da BHR, o que, em estadios mais avançados, pode levar ao

aparecimento de edema macular retiniano, principal responsável pela perda de visão em casos de RD (Klein *et al.*, 1995).

As alterações de permeabilidade verificadas ao nível da BHR estão associadas à condição de hiperglicemia (Joussen *et al.*, 2004), bem como ao espessamento da membrana basal dos capilares (Badyal and Kaur, 2008), perda de pericitos e morte por apoptose das células endoteliais (Cogan, 1961).

Como referido anteriormente, sabe-se que a integridade da BHR se deve à presença de complexos juncionais, as JO, que se encontram entre as células endoteliais. Desta forma, é de esperar que a ocorrência de alterações ao nível das proteínas destes complexos tenha um impacto direto na função da BHR. Estudos anteriores demonstraram que em condições de hiperglicemia há uma alteração da distribuição das proteínas integrantes destas junções, o que contribui para o aumento da permeabilidade vascular (Antonetti *et al.*, 1998; Barber, Antonetti and Gardner, 2000; Leal *et al.*, 2007, 2010). Essa alteração está relacionada com a diminuição dos níveis e alterações na distribuição subcelular da proteína transmembranar ocludina. Estas alterações verificadas surgem na sequência de um aumento da fosforilação da ocludina, o que contribui fortemente para a sua degradação (Antonetti *et al.*, 1998; Barber, Antonetti and Gardner, 2000; Gonçalves *et al.*, 2012, 2014), comprometendo a interação com as proteínas ZO-1 e ZO-2 e da organização do próprio complexo juncional (Kale *et al.*, 2003). Níveis alterados e/ou redistribuição subcelular da proteína claudina-5 foram também descritos como estando associados a um aumento da permeabilidade vascular (Leal *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2014).

Para além das alterações verificadas ao nível das proteínas constituintes das JO existem outros fatores como a adesão de leucócitos, morte celular vascular, disfunção das células glias e ativação das células da microglia, que têm um forte contributo na rutura da BHR (Antonetti *et al.*, 2006).

1.3.3 A inflamação na retinopatia diabética

No decorrer dos estudos desenvolvidos ao longo da última década, compreendeu-se que a RD consiste numa doença inflamatória crónica de baixo grau, cuja inflamação constitui um fator de risco para o desenvolvimento e progressão da doença (Johnson *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2014). Esta inflamação é desencadeada por mediadores pró-inflamatórios, tais como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), e citocinas como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina-1- β (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6) (Johnson *et al.*, 2005). Nas fases mais iniciais da doença estes mediadores promovem o aumento da permeabilidade vascular e da adesão de leucócitos (Santiago *et al.*, 2018), podendo intensificar as lesões vasculares, em caso de persistência do estado de inflamação (Miyamoto *et al.*, 1999; Rungger-Brändle, Dosso and Leuenberger, 2000; Joussen *et al.*, 2009).

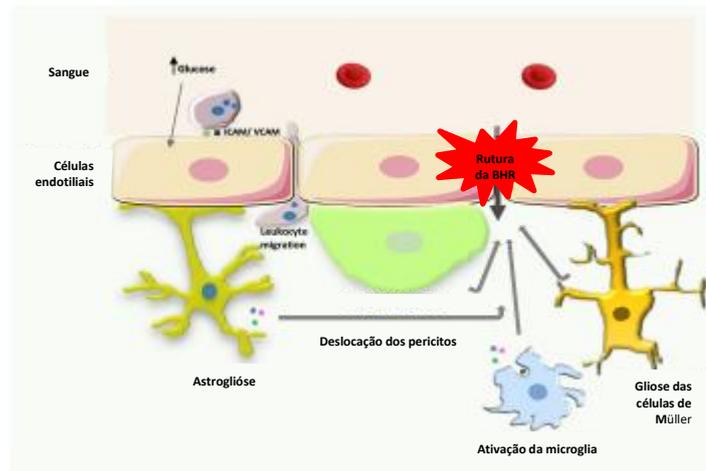


Figura 1.7 Processos associados à diminuição da permeabilidade da BHR, na RD. Numa situação de RD o aumento da produção das espécies de oxigénio reativas, leva a um aumento da expressão de moléculas de adesão, nas células endoteliais e, conseqüentemente ao aumento da adesão de leucócitos. Vários tipos de células, especialmente as da microglia, encontram-se ativadas na RD. (Adaptado de Santiago *et al.*, 2018).

O VEGF tem a capacidade de induzir alterações na conformação das proteínas das JO, das células endoteliais, aumentando assim a permeabilidade vascular (Aiello *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2009).

Evidências experimentais mostraram que a inflamação local parece ser de maior importância no desenvolvimento da RD, uma vez que os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β , e de moléculas de adesão se encontram aumentados na retina e no vítreo quer em modelos animais de diabetes quer em pacientes diabéticos (Fig. 1.7) (Joussem *et al.*, 2002; Simó and Hernández, 2015; Santiago *et al.*, 2018). O TNF- α aumenta a adesão dos leucócitos e a permeabilidade da BHR (Joussem *et al.*, 2002; Saishin *et al.*, 2003), enquanto que a IL-1 β está correlacionada com o aumento da permeabilidade vascular, pois tem a capacidade de acelerar a morte por apoptose das células vasculares da retina, por ativação do fator nuclear-kB (Kowluru & Odenbach, 2004). Uma vez aumentados os níveis de citocinas pró-inflamatórias, ocorre a morte das células endoteliais por apoptose, promovendo assim o aumento do *stress* oxidativo, através do aumento da produção das espécies reativas de oxigénio. Estes fenómenos contribuem uma amplificação da resposta imune (Gonçalves *et al.*, 2012).

Também as células da microglia, responsáveis pela manutenção da homeostase no cérebro e na retina, se encontram relacionadas com a patogénese da doença em estudo (Du *et al.*, 2017). Numa situação de RD as células da microglia encontram-se ativadas, produzindo e libertando citocinas pró-inflamatórias, contribuindo desta forma para a perda neuronal e diminuição da permeabilidade da BHR (Grigsby *et al.*, 2014) (Fig. 1.7). Nos últimos anos, estudos em modelos animais de RD mostraram evidências de que na fase inicial da doença, a microglia muda de um estado de repouso para um estado amebóide ativado, devido a um aumento da

expressão de IL-1 β e TNF- α (Kradý *et al.*, 2005). Estas citocinas conduzem a uma disfunção ao nível da BHR, por um aumento da atividade da caspase-3, nas células endoteliais.

A inflamação mediada por células da microglia, desempenha assim um papel importante da progressão da RD, sugerindo então que a manipulação do seu estado de ativação poderá eventualmente atrasar ou até mesmo prevenir os danos causados pela ativação destas células e, conseqüentemente, diminuir o estado pró-inflamatório observado na RD (Grigsby *et al.*, 2014).

1.3.4 Mecanismos moleculares associados à retinopatia diabética

Stress oxidativo

Os elevados níveis de glucose no sangue levam a um aumento dos níveis das espécies reativas de oxigénio (ERO) e a uma inativação das enzimas antioxidantes, contribuindo assim para o aumento do *stress* oxidativo (Fig. 1.8). Por sua vez, o aumento destas ERO resulta na ativação de várias vias metabólicas, como a oxidação da glucose, aumento do fluxo através da via do poliol e aumento da glicação das proteínas que estão envolvidas na patogénese da retinopatia diabética (Kowluru and Chan, 2007).

O *stress* oxidativo reflete um desequilíbrio entre os mecanismos antioxidantes de defesa e a produção de ERO. As ERO surgem como resultado da ativação ou redução do oxigénio molecular ou derivados de produtos da sua redução (anião superóxido e radical hidroxilo). A acumulação de ERO é prejudicial para as células, causando sucessivos danos ao nível da molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN), lípidos e proteínas, podendo resultar na alteração de genes específicos responsáveis por importantes funções na homeostasia celular. Desta forma, é importante existir um equilíbrio entre a produção e consumo das ERO, de modo a manter a homeostase celular apropriada.

Numa situação de DM há produção exacerbada do anião superóxido, uma vez que o tempo de semi-vida da ubiquinona (que reduz o oxigénio molecular a anião superóxido) se encontra aumentado e, conseqüentemente, há um aumento do *stress* oxidativo. O *stress* oxidativo, por seu lado, acelera o processo de morte celular por apoptose (Fig. 1.8) e, conseqüentemente, contribui para o desenvolvimento da RD (Santiago *et al.*, 2018).

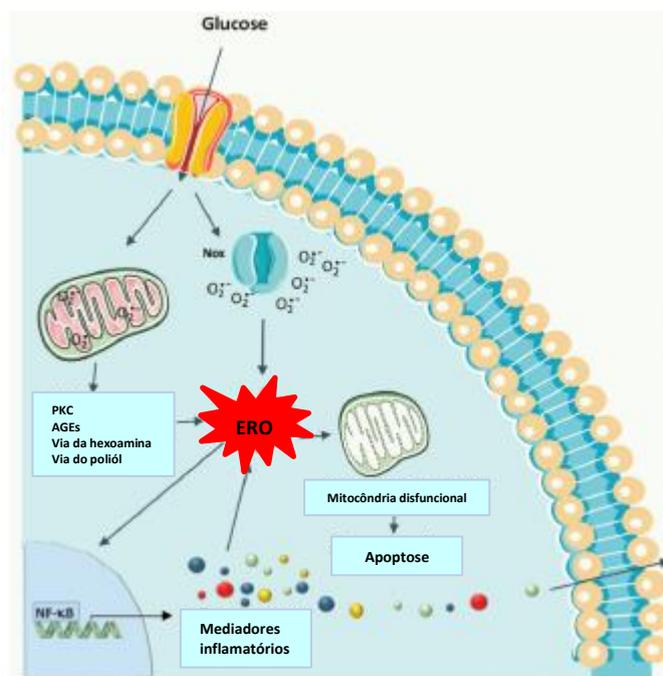


Figura 1.8 Vias metabólicas envolvidas na retinopatia diabética. A hiperglicemia crônica promove o aumento da formação das ROS, originadas na mitocôndria ou produzidas pela nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase (Nox), e ativa diversas vias metabólicas, incluindo a proteína cinase C (PKC), a via do polioli, os produtos finais de glicação avançada (AGEs) e a via das hexosaminas. O stress oxidativo danifica o DNA mitocondrial, ficando a função da mitocôndria diminuída, o que acelera o processo de apoptose celular e, consequentemente, contribui para o desenvolvimento de retinopatia diabética (Santiago *et al.*, 2018).

1.3.5 Terapêuticas atuais para a retinopatia diabética (RD)

Vários estudos clínicos mostraram que o controlo metabólico logo a partir das fases iniciais da DM e a sua manutenção ao longo da doença pode ajudar a diminuir os riscos de desenvolvimento da RD em 76% (Turner, 1998; Kowluru and Chan, 2007; Stitt *et al.*, 2016) bem como a progressão para a RD proliferativa em 54% dos doentes com DMT1. O controlo rigoroso da pressão arterial mostra-se também benéfico no atraso da progressão da RD (Turner *et al.*, 1998).

Nas fases mais avançadas da RD, existem várias opções terapêuticas, incluindo a fotocoagulação a laser, as injeções intravítreas de anti-VEGF ou de corticoesteróides e a cirurgia de vitrectomia. No entanto, todas estas intervenções terapêuticas são para as fases da RD em que a visão já se encontra seriamente comprometida e visam essencialmente o impedimento da deterioração da visão, não restaurando a visão perdida. Além disso, em muitos casos poderão apresentar efeitos adversos severos (Simó and Hernández, 2015).

A administração intraocular (nomeadamente injeção intravítrea) de compostos capazes de controlar e inibir o desenvolvimento ou produção de novos vasos anómalos na retina, surge como uma das terapias mais comuns. São

nomeadamente injetados agentes como corticosteróides e/ou agentes anti-VEGF. O VEGF está associado à rutura da BHR, pelo que a administração de compostos anti-VEGF poderá contribuir para a diminuição da permeabilidade da BHR (Barthelmes *et al.*, 2015). Por seu lado, os corticóides demonstraram ter efeitos anti-inflamatórios e, mais recentemente, mostraram-se benéficos como agentes neuroprotetores (Zhang *et al.*, 2013).

A fotocoagulação a laser é um tratamento que regride a formação de vasos anormais que se formam na retina. Por outro lado, a vitrectomia consiste numa cirurgia que visa a remoção do sangue que pode sair dos vasos da retina, para a parte central do olho (humor vítreo). Apesar de ser sugerida, a cirurgia é um tratamento muito dispendioso e extremamente complexo (Newman, 2010).

É importante, contudo salvaguardar que estas terapias não permitem uma cura da doença, mas apenas o atraso da sua progressão, podendo até surgir efeitos secundários significativos associados a estes tratamentos, nomeadamente o risco de endoftalmite infecciosa e descolamento da retina. Deste modo é essencial que se desenvolvam novos tratamentos para as fases iniciais da retinopatia diabética.

1.4. As incretinas e as suas aplicações terapêuticas

As incretinas são um grupo de hormonas peptídicas gastrointestinais libertadas por células endócrinas do intestino ao longo do dia, e os seus níveis encontram-se aumentados após uma refeição. Estas hormonas apresentam uma atividade insulínica, integrando um sistema endógeno envolvido na regulação fisiológica da homeostasia da glicose, isto é, potenciam a secreção de insulina pelas células β pancreáticas, em resposta ao aumento dos níveis de glicose do sangue, podendo ser responsáveis por mais de 70% da secreção pós-prandial de insulina. Além disso, é cada vez mais aceite que as incretinas possuem outras funções independentes da redução da glicose, tais como a expansão dos ilhéus pancreáticos através da indução da proliferação e sobrevivência das células β (Chyan, 2007), o metabolismo ósseo, neuroproteção e cardioproteção (Davidson, 2013).

O conceito de “efeito de incretina” baseou-se na observação de que a administração por via oral de nutrientes (glicose) potencia a secreção de insulina num grau muito mais elevado (aproximadamente 60%) em comparação com a mesma quantidade de glicose plasmática administrada por via parenteral (Ussher and Drucker, 2012).

Em indivíduos saudáveis, com o aumento das concentrações de glicose no sangue (período pós-prandial), as incretinas peptídeo-1 semelhante ao glucagão (GLP-1) e o peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) aumentam a síntese e libertação de insulina dependente de glicose, a partir das células β pancreáticas, através de mecanismos de sinalização intracelular (Fortin *et al.*, 2010; Lenski *et al.*, 2011). Os efeitos do GLP-1 e do GIP são dependentes da glicose pelo que, quando os níveis de glicose no sangue são baixos, não se observa estimulação da libertação de

insulina, nem supressão da secreção de *glucagão* logo, o GLP-1 não compromete a resposta normal do *glucagão* ao estado de hipoglicemia. Tanto as hormonas incretinas como os seus recetores contribuem para a manutenção da homeostasia normal da glicose e para a regulação do peso corporal (Fortin *et al.*, 2010). Quando são libertados para a corrente sanguínea, tanto o GLP-1 como o GIP sofrem a rápida ação da enzima dipeptidil peptidase-4 (DPP-4), que tem a capacidade de os clivar e inativar (Kieffer, McIntosh and Pederson, 1995; Gorrell, Gysbers and McCaughan, 2001). Estudos anteriores mostraram que a DPP-4 pode ser encontrada no plasma, na sua forma livre, e em vários tipos de células, na sua forma membranar, sendo extremamente abundante em células endoteliais e células T (Ludwig *et al.*, 2002).

Devido ao seu tempo de semi-vida no plasma ser extramente curto (pela ação da enzima DPP-4), o uso terapêutico do GLP-1 nativo torna-se facilmente inviabilizado. Assim, a administração exógena de GLP-1 a indivíduos diabéticos não é uma terapia viável já que os níveis e a atividade da DPP-4 se encontram aumentados em doentes com DMT2, levando então a uma rápida degradação do GLP-1 (Pala *et al.*, 2005).

Com o intuito de contornar esta situação surgiram os agonistas do recetor do GLP-1 (GLP-1R) e os agentes inibidores da atividade da enzima DPP-4. Os primeiros compostos funcionam de forma semelhante ao GLP-1 endógeno, no entanto são resistentes à ação da enzima DPP-4. Por outro lado, os inibidores da atividade da enzima visam prolongar o tempo de semi-vida do GLP-1 endógeno ativo, aumentando, desta forma, os seus níveis na circulação sanguínea (Kendall, Kim and Maggs, 2006; Lovshin and Drucker, 2009).

Dois dos compostos atualmente descritos como agonistas do recetor do GLP-1, liraglutido e a exendina-4 (Ex-4), serão o foco deste trabalho (Fig. 1.9).

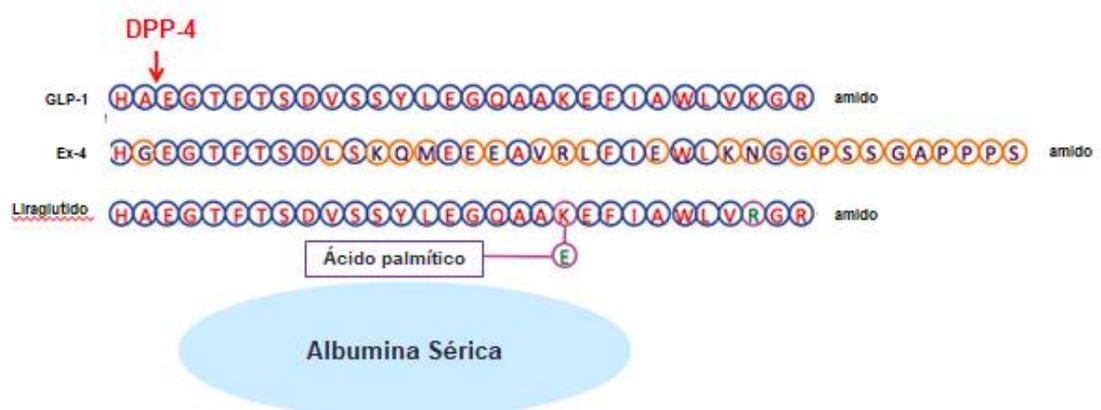


Figura 1.9 Representação esquemática da estrutura do GLP-1, da Ex-4 e do liraglutido (Adaptado de Salcedo *et al.*, 2012).

A Ex-4 é um composto que foi isolado a partir da saliva de um lagarto, o monstro-de-gila ou *Gila H suspectum* (Raufman *et al.*, 1992). Este agente agonista apresenta uma alta afinidade para o GLP-1R (Raufman *et al.*, 2003). A Ex-4 apresenta,

na sua estrutura, um aminoácido de glicina na posição 2, em substituição da alanina, que existe na estrutura do GLP-1 endógeno (Fig. 1.9). Este facto torna-a menos suscetível à clivagem e consequente inativação, mediada pela DPP-4, conferindo-lhe um maior tempo de semi-vida, comparativamente com o GLP-1 endógeno (Kolterman *et al.*, 2003).

O liraglutido, apresenta uma longa duração na sua ação, pois encontra-se conjugado a um ácido gordo (ácido palmítico), o que permite a sua associação à albumina sérica, e consequente proteção da ação proteolítica da DPP-4 (Fig. 1.9).

2 .Objetivos

A RD, principal complicação microvascular associada à DM, é considerada uma das principais causas de perda de visão em indivíduos diabéticos, em idade adulta (Gardete-Correia *et al.*, 2010). Atualmente, os tratamentos existentes são direcionados para fases mais avançadas da doença (Simó and Hernández, 2017). Nestas fases, a doença é irreversível, pelo que a adoção destes tratamentos, para além dos efeitos secundários adversos, não têm a capacidade de curar ou prevenir, mas sim, meramente de atrasar a progressão da doença.

Vários estudos mostraram que as terapêuticas baseadas nas incretinas, além de terem interesse no contexto da DMT2, têm efeitos protetores nas complicações relacionadas com a diabetes e também nas doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (Campbell and Drucker, 2013; Gallwitz, 2014; Mulvihill and Drucker, 2014). De entre a classe de agentes anti-hiperglicémicos destacam-se duas principais: os inibidores da enzima DPP-4 e os agonistas do GLP-1R. Ambas as classes visam o aumento do tempo de meia-vida do GLP-1 (importante composto para a manutenção da regulação da homeostase da glicose) em circulação, quer pela inibição da enzima capaz de o clivar, a DPP-4 (inibidores da DPP-4), quer pela administração de compostos miméticos do GLP-1 (agonistas do GLP-1R), que apesar de apresentarem uma homologia significativa com o GLP-1, são mais resistentes à ação da enzima DPP-4 (Baggio and Drucker, 2007).

O nosso grupo mostrou anteriormente que os fármacos baseados nas incretinas têm efeitos protetores na retina de animais com DMT2 e DMT1 (Gonçalves *et al.*, 2012, 2014). Curiosamente, os efeitos benéficos que foram observados na integridade da BHR, na prevenção da inflamação e da morte das células da retina num modelo DMT1 (onde a secreção de insulina é residual devido à destruição das células β pancreáticas) permitiram concluir que a sitagliptina atuou por um mecanismo independente da secreção de insulina e de melhoria do controlo glicémico (Gonçalves *et al.*, 2014).

Um estudo mais recente do nosso grupo mostrou ainda que num modelo de lesão retiniana por isquémia-reperfusão, o qual mimetiza várias características de patologias retinianas, incluindo a RD, sem apresentar alterações metabólicas, a Ex-4 (um agonista do GLP-1R) foi capaz de prevenir a rutura da BHR e a inflamação na retina através da inibição da produção de citocinas inflamatórias pelas células da microglia.

Tendo em conta o descrito anteriormente, este estudo teve como objetivos principais:

- Avaliar os potenciais efeitos benéficos de dois agonistas do GLP-1, o liraglutido e a Ex-4, na retina diabética por um mecanismo independente do aumento da secreção de insulina e melhoria do controlo glicémico.

- Avaliar o efeito protetor do liraglutido e da Ex-4 na rutura da BHR.

Uma vez que a inflamação crónica e as células da microglia têm um papel importante na rutura da BHR e no desenvolvimento da RD, pretendeu-se ainda:

- Avaliar de que forma o Liraglutido e a Ex-4 modulam a reatividade das células da microglia na diabetes, em termos da sua capacidade migratória nas camadas da retina.
- Avaliar as potenciais alterações na morfologia das células da microglia da retina dos animais diabéticos tratados com Ex-4.

3. Materiais e Métodos

3.1 Modelo Animal de Diabetes

Foi utilizado um modelo animal de DMT1 para se estudar os efeitos protetores dos fármacos, liraglutido e Ex-4, na retina. Para isso, a diabetes foi induzida em ratos Wistar Han machos (Laboratórios de Charles-River, Barcelona), com 8 ou 12 semanas de idade, através de uma injeção intraperitoneal única de streptozotocina (STZ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (65mg/Kg, em solução tampão citrato 10 mM, pH 4,5). O estado de hiperglicemia (níveis de glucose sanguínea acima de 250 mg/dL) foi confirmado dois dias após a injeção de STZ, utilizando o sistema Accu-Chek Aviva (Roche, Portugal). Além disso, foram também quantificados os níveis de hemoglobina glicosilada (HbA1c), utilizando o analisador DCA 2000+ (Bayer, Diagnostic, Alemanha). O peso corporal foi determinado no fim do estudo utilizando uma balança analítica (KERN CB K1, Alemanha).

Durante o período experimental os animais tiveram livre acesso a água e ração (SAFE A04 Augy, França), em condições de ciclos de luz (12h diurno/noturno), de temperatura (aproximadamente $23 \pm 1^\circ\text{C}$) e de humidade (60%) controladas.

Os animais foram utilizados em dois estudos distintos: um conjunto destinado a tratamento com liraglutido e um segundo conjunto de animais tratados com a Ex-4, conforme a seguir descrito (subsecções 3.1.1 e 3.1.2).

Todos os procedimentos envolvendo animais, foram realizados de acordo com as normas de investigação em oftalmologia e visão (*ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*) e os estudos aprovados pela comissão institucional de ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (*Approval ID: 015-CE-2011*).

3.1.1 Tratamento com liraglutido

No grupo experimental desenhado para avaliar os efeitos do liraglutido, a indução de diabetes foi realizada às 12 semanas de idade, como acima descrito. Após duas semanas da indução de diabetes, os animais foram divididos em quatro grupos ($n \geq 5$ animais por grupo): (1) grupo controlo (administrado com veículo); (2) grupo controlo tratado com o liraglutido; (3) grupo diabético (administrado com veículo); (4) grupo diabético tratado com o liraglutido. O tratamento com liraglutido (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) foi administrado por via subcutânea, duas vezes ao dia, durante duas semanas. Os outros animais foram administrados com soro fisiológico (NaCl 0.9%), veículo, durante o mesmo período de tempo. No fim do estudo, os animais foram sacrificados por decapitação, tendo sido previamente anestesiados com uma injeção i.p. com cetamina (75 mg/Kg de peso corporal; Pfizer Inc., Nova Iorque, E.U.A.) e clorpromazina (3 mg/Kg de peso corporal; Laboratórios Vitória, Amadora, Portugal). Para análise por *Western Blotting*, os olhos foram rapidamente enucleados e as retinas isoladas por microdissecção, sendo posteriormente congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C até à sua utilização. Para estudos de

imunohistoquímica, os globos oculares foram congelados em meio de inclusão O.C.T. (*Optimal Cutting Temperature*; Thermo Scientific, Waltham, MA, E.U.A.) a -50°C e posteriormente armazenados a -80°C .



Figura 3.1 Esquema do protocolo de administração do fármaco liraglutido.

3.1.2 Tratamento com exendina-4 (Ex-4)

No grupo experimental desenhado para avaliar os efeitos da exendina-4 a indução de diabetes foi realizada às 8 semanas de idade, segundo o protocolo anteriormente descrito. Neste protocolo, os animais foram divididos em três grupos experimentais ($n=4$ por grupo): (1) grupo controlo (administrado com veículo); (2) grupo diabético (administrado com veículo); (3) grupo diabético tratado com a Ex-4. Uma semana após indução e progressão de diabetes, iniciou-se o tratamento com Ex-4, administrado por via subcutânea, numa dose de $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$, duas vezes por dia, durante 3 semanas de tratamento (Fig. 3.2). Após esse período os animais foram sacrificados e os globos oculares enucleados, como descrito na subsecção anterior (em 3.1).

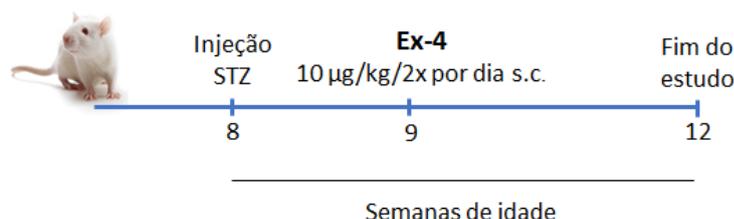


Figura 3.2 Esquema do protocolo de administração do fármaco Ex-4.

3.2 Preparação de extratos totais de retina.

As retinas armazenadas previamente a -80°C foram homogeneizadas mecanicamente com a ajuda de um *Potter-Elvehjem* (Uni Form, Jencons, Inglaterra), em solução tampão RIPA (150 mM de NaCl, 50 mM de Tris (pH=7,5), 5 mM de etilenoglicol-bis (β -aminoetiléter) -N, N, N', N'-ácido tetracético (EGTA), 1%(v/v) de Triton X-100, 0,5% (m/v) de dimetoxi-4-cloroanfetamina (DOC), 0,1% de *Sodium dodecyl sulfate* (SDS) suplementado com 2 mM de fenilmetano sulfonil fluoridro

(PMSF), 1mM de DL-ditiotreitol (DL-DTT), 2 mM de Na_3VO_4 e com uma mistura de inibidores de proteases (kit completo, mini – Roche Applied Science, Indianapolis, IN, E.U.A.) na concentração recomendada pelo fabricante. As amostras foram seguidamente centrifugadas a 16000 g, por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante recolhido, no qual a concentração de proteína foi determinada.

A concentração de proteína foi determinada através do ácido bicinonínico (Pierce, Rockford, IL, E.U.A.), de acordo com as indicações do fabricante, tendo-se feito a leitura das absorvâncias das amostras a 570 nm. A seguir, procedeu-se à desnaturação das amostras com tampão de Laemmli 4x concentrado (0.5 M de Tris, 30% de glicerol, 10% de SDS, 0.6 M de ditiotreitol (DTT), 0.012% de azul de bromofenol), durante 1 hora, a 37°C.

3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida e análise dos níveis de proteína por Western Blotting

Para a análise de *Western Blot*, foram carregadas 20 a 40 µg de proteína total por cada poço, num gel de poliacrilamida (7,5, 10 ou 12% de acrilamida) e separadas por eletroforese em solução tampão 250 mM de Tris-HCl (pH 8,0-8,5), contendo 192 mM de glicina e 0,1% (m/v) de SDS, a uma voltagem compreendida entre os 80 e os 120 V. Seguiu-se a eletrotransferência das proteínas para membranas de difluoreto de polivinildieno (PVDF; Boehringer Mannheim, Alemanha), em solução tampão 250 mM de Tris-HCl (pH 8,0-8,5), contendo glicina 192 mM, 0,005% (m/v) de SDS e 20% (v/v) de metanol, durante 2 horas a 300 mA, a 4°C.

Após a transferência, foi feito o bloqueio por incubação das membranas com solução de leite magro a 5% (m/v) em tampão TBS-T (contendo 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6, e 0,1% (v/v) de Tween-20, durante 1 h, sob agitação, à temperatura ambiente. De seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (Tabela 3.1), diluídos em solução de TBS-T suplementado com leite magro a 5% (m/v), durante 1 h, à temperatura ambiente. Após incubação com anticorpo primário, as membranas foram então lavadas 5 vezes por 5 minutos em solução TBS-T. Seguidamente foram incubadas com anticorpos secundários acoplados a peroxidase de rábano (*Horseradish peroxidase*, HRP), durante 1 hora, sob agitação, à temperatura ambiente. Após 5 lavagens com TBS-T, procedeu-se à revelação das membranas com o reagente de quimioluminescência ECL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia), num detetor LAS 500 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Umeå, Sweden). A quantificação dos níveis de proteína foi determinada por análise densitométrica das bandas, recorrendo ao software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

Tabela 3.1. Lista de anticorpos primários utilizados no *Western Blotting*.

Anticorpo	Diluição	Referência	Empresa
Anticorpo policlonal contra claudina-5	1:250	35-2500	Invitrogen (Carlsbad, Califórnia, EUA)
Anticorpo policlonal contra GLP-1R	1:500	ab39072	Abcam (Cambridge, UK)
Anticorpo policlonal contra ocludina	1:500	33-1500	Zymed Laboratories Inc. (South San Francisco, CA, EUA)
Anticorpo monoclonal contra actina	1:20000	ab1730	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA)

3.4 Imunohistoquímica em secções de retina

A partir dos blocos de OCT que se encontravam armazenados a - 80°C, foram preparadas através de seccionamento por crióstato (Leica CM3050S, Nussloch, Germany) secções de retina com 18 µm de espessura, as quais foram colocadas em lâminas de vidro Superfrost Plus (VWR). Estas secções de retina foram fixadas em acetona fria, durante 10 minutos. Após 3 lavagens com tampão salino de fosfato (PBS: 137 mM NaCl, 27 mM KCl, 81 mM Na₂HPO₄·(2H₂O), 15 mM KH₂PO₄, a pH 7,4), as secções foram permeabilizadas com 0,25% (v/v) de Triton X-100 em PBS, durante 30 minutos e bloqueadas com soro normal de cabra a 10% (v/v) ou BSA a 5%, durante 40 minutos. Após bloqueio, incubaram-se as secções com anticorpo primário (Tabela 3.2.) diluído em solução de PBS/BSA com 0,25% de Triton X-100, durante a noite, a 4°C. Seguiram-se 3 lavagens de 5 minutos com PBS e posteriormente incubaram-se a secções, no escuro, durante 1 hora, com os anticorpos secundários produzidos em cabra e coelho, contra imunoglobulinas (IgG), associados aos fluorocromos AlexaFluor 488, 568 ou 633 (Molecular Probes Inc., OR, E.U.A.), diluídos (1:200 ou 1:500) em solução de PBS/BSA, e o núcleo marcados com 4´6-diamidino-2-fenilindole dihidroclorido (DAPI). Após três lavagens em PBS, as lâminas foram montadas utilizando o meio de montagem *Glycergel* (Dako, Carpinteria, CA, EUA). Foi realizado um controlo negativo da imunomarcação, no qual foi omitido o anticorpo primário, de forma a validar a especificidade da marcação detetada.

Por fim procedeu-se à aquisição de imagens, utilizando um microscópio de fluorescência Zeiss Observer.Z1 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemanha) ou um microscópio confocal de fluorescência (LSM 710, Zeiss).

Tabela 3.2. Anticorpos primários utilizados na Imunohistoquímica.

Anticorpo	Diluição	Referência	Empresa
Anticorpo policlonal contra GLP-1R	1:100	ab39072	Abcam (Cambridge, UK)
Anticorpo policlonal contra ocludina	1:500	33-1500	Zymed Laboratories Inc. (South San Francisco, CA, EUA)
Anticorpo policlonal contra Albumina	1:200	A90-134	Bethyl Laboratories, Inc.
Anticorpo policlonal contra Iba-1	1:1000	019-19741	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japão)

3.5 Avaliação da rutura da BHR

Neste trabalho, a rutura da BHR foi avaliada pelo extravasamento da albumina sérica. A albumina sérica é uma proteína de elevado peso molecular (66 kDa), que se encontra confinada no interior dos vasos sanguíneos. Numa situação de diabetes, há uma disfunção das células constituintes da BHR, o que faz aumentar a permeabilidade da mesma e, conseqüentemente, verifica-se um extravasamento da proteína dos capilares e vasos para o tecido.

Nesse sentido avaliou-se o conteúdo desta proteína, por imunohistoquímica (segundo protocolo descrito anteriormente), em secções transversais de retina, nos diferentes grupos de animais. Por fim procedeu-se à aquisição de imagens, utilizando um microscópio de fluorescência Zeiss Observer.Z1 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemanha).

3.6 Marcação em *Whole mount* (ou retinas intactas)

As retinas intactas dos animais dos grupos descritos foram isoladas por microdissecção do globo ocular e imersas, por duas vezes, em 2% de paraformaldeído durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Após duas lavagens de 5 minutos em PBS com 0,3% de TX-100, as retinas foram bloqueadas em soro normal de cabra 5% em PBS-T, durante 1 hora e posteriormente incubadas durante três dias, a 4°C, com o anticorpo policlonal contra *Ionized calcium binding adaptor molecule* (Iba-1) (1:000), que consiste numa proteína de ligação ao cálcio específica para a microglia (Ohsawa K *et al.*, 2004). Depois da incubação, as retinas foram lavadas com PBS-T durante 24 h e incubadas com anticorpo secundário produzido em cabra anti IgG de coelho, conjugado ao fluorocromo Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Paisley, UK), diluído em PBS, com 0,3% de TX-100. Após a incubação, as retinas foram novamente lavadas durante 24h e, de seguida, foram montadas, com o lado do vítreo para cima.

As preparações foram visualizadas num microscópio confocal LSM 710 META (Zeiss Microscopy, Germany). Utilizou-se o software ZEN (Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com uma ampliação de 630x para a aquisição de imagens das células da

microglia. Por cada condição, foram adquiridas 10-15 imagens em *Z-stack* das células da microglia de forma aleatória na região da camada das células ganglionares.

3.7 Análise morfométrica das células da microglia

A análise das imagens em *Z-stack* foi realizada recorrendo ao software NeuroLucida (MBF Bio-science, Williston, VT, EUA). As células foram manualmente desenhadas, utilizando as imagens adquiridas nos vários planos, obtendo no final uma imagem tridimensional para cada célula. As células da microglia foram reconstruídas, desenhando o corpo celular e os processos correspondentes.

Os dados resultantes da análise morfométrica foram extraídos utilizando o software NeuroExplorer (MBF Biosciences), uma extensão do software NeuroLucida. Os parâmetros analisados incluíram o número de árvores, comprimento total dos processos por árvore, número de nódulos e de terminações, número e comprimento dos processos por ordem, circularidade e área do corpo celular.

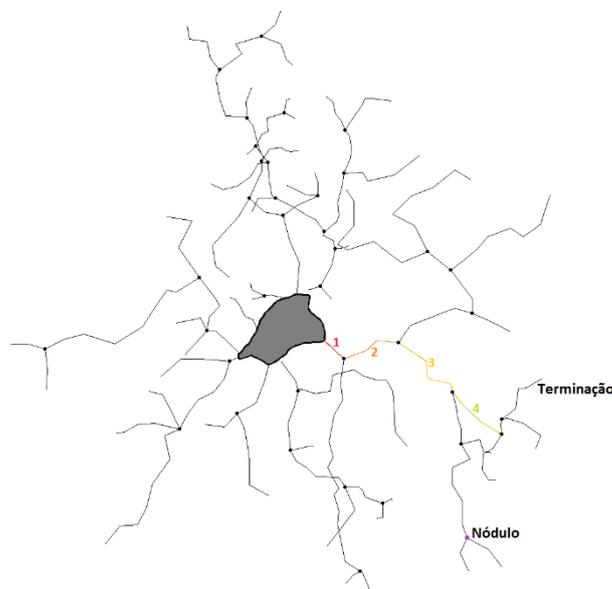


Figura 3.3: Esquema representativo de uma reconstrução tridimensional de células da microglia. As ordens de ramificação emergentes do corpo da célula estão representadas por números (1 a 4).

3.8 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada recorrendo ao software GraphPad Prism, versão 6. Os resultados foram apresentados sob a forma de valor médio \pm erro padrão da média do número de experiências (n) indicado. A partir da análise de variância (ANOVA) foi feita a comparação entre diferentes grupos, seguido do teste *Post-hoc Bonferroni*. Consideraram-se estatisticamente significativos os valores cujo $p < 0.05$.

4. Resultados

Neste estudo utilizou-se um modelo animal de diabetes tipo 1, de forma a avaliar os potenciais efeitos terapêuticos de dois agonistas do GLP-1R, o liraglutido e a Ex-4, na reversão e/ou atenuação das complicações associadas à retinopatia diabética, através de um mecanismo independente do aumento da secreção de insulina.

O modelo animal de diabetes utilizado foi o rato Wistar Han, com diabetes induzida por uma injeção de STZ. Após a administração de STZ há destruição das células β do pâncreas, promovendo uma severa redução na produção e secreção de insulina, levando a uma situação de hiperglicemia crónica. Desta forma este modelo animal mimetiza as características de uma diabetes do tipo 1, observada num adulto humano, com uma hiperglicemia severa, resultante da insuficiência de insulina.

4.1 Estudo dos potenciais efeitos protetores do liraglutido na retina diabética

Numa primeira fase deste estudo, avaliou-se o potencial efeito benéfico do liraglutido na proteção da rutura da BHR e na migração das células da microglia nas camadas da retina dos animais diabéticos.

4.1.1 Estudo dos efeitos do liraglutido no peso corporal e parâmetros bioquímicos no modelo animal de DMT1

Os valores referentes à média do peso corporal e à média dos níveis de glicémia, para o grupo de animais em estudo, encontram-se descritos na Tabela 4.1. Ao fim das 4 semanas de diabetes, verificou-se uma diminuição significativa no peso corporal dos animais diabéticos ($303,8 \pm 8,7$ g; $p < 0,001$), relativamente ao dos animais controlo ($401,9 \pm 9,3$ g). Com a administração do fármaco não se verificaram diferenças com relevância estatística no grupo diabético (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Peso corporal, níveis de glicose e hemoglobina glicosilada no plasma nos ratos Wistar controlo e diabéticos, tratados com 200 μ g/kg de liraglutido, duas vezes por dia ou veículo (soro fisiológico), ao longo de 2 semanas.

Parâmetros	Controlo	Liraglutido	Diabético	Diabético+Liraglutido
Peso (g)	401,9 \pm 9,3	348,7 \pm 7,6***	303,8 \pm 8,7***	275,1 \pm 4,8***
Glicémia (mg/dL)	104,0 \pm 3,5	103,9 \pm 3,2	523,9 \pm 29,5***	487,3 \pm 13,8***
HbA1c (%)	3,60 \pm 0,4	3,94 \pm 0,2	8,04 \pm 0,3***	7,90 \pm 0,1***

Os resultados expressam a média \pm SEM ($n \geq 8$ por grupo), *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ significativamente diferentes do grupo controlo com a mesma idade. ANOVA seguida do teste *post hoc* Bonferroni.

A média de valores registados para as concentrações de glicose no sangue foi significativamente superior no grupo diabético não tratado ($523,9 \pm 29,5$ mg/dL; $p < 0,001$), comparativamente com o grupo controlo com a mesma idade ($104,0 \pm 3,5$ mg/dL). Os animais diabéticos tratados com o liraglutido durante 2 semanas não apresentaram alterações significativas nos níveis de glicémia ($487,3 \pm 13,8$ mg/dL) relativamente ao grupo diabético ($523,9 \pm 29,5$ mg/dL) (Tabela 4.1).

Os níveis séricos de HbA1c para os ratos diabéticos foram significativamente mais elevados ($p < 0,001$) relativamente ao grupo controlo. O tratamento com o liraglutido não afetou os níveis de HbA1c nos animais com DMT1 (Tabela 4.1).

4.1.2 O liraglutido previne o aumento da permeabilidade da BHR induzido pela diabetes

De forma a avaliar o aumento de permeabilidade dos vasos sanguíneos retinianos induzido pela diabetes, foi analisado o extravasamento da albumina dos vasos sanguíneos para a retina por imunomarcação para a albumina. A marcação para a albumina sérica permitiu identificar locais de extravasamento da proteína nos animais diabéticos, por comparação com os animais controlo, em que as moléculas de albumina se mantêm confinadas no interior dos vasos da retina. Assim, o extravasamento da albumina revelou uma rutura da BHR (Fig. 4.1). A administração do liraglutido pareceu prevenir esse efeito (Fig. 4.1).

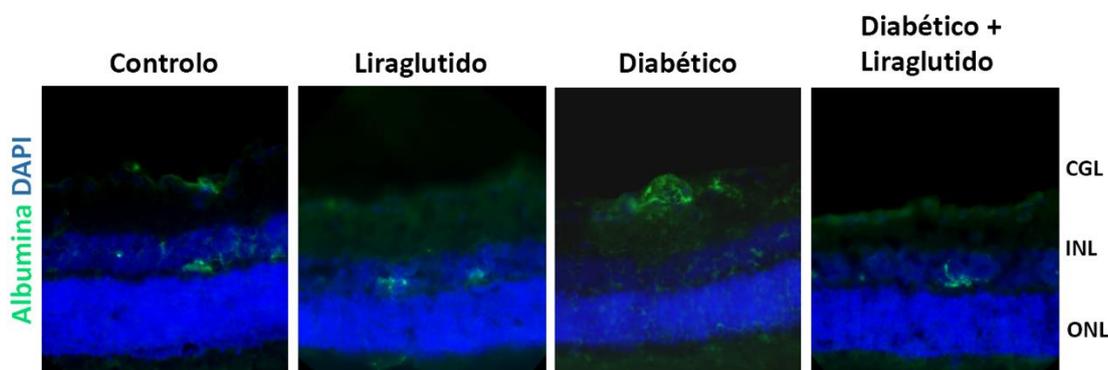


Figura 4.1 Efeito do liraglutido na permeabilidade dos vasos da retina de ratos controlo e ratos diabéticos. A rutura da barreira foi avaliada por imunohistoquímica, através do extravasamento da proteína albumina sérica dos vasos sanguíneos para a retina. Imagens representativas da fluorescência da albumina sérica (verde), permitindo detetar os locais de extravasamento na retina (n=2 animais/ grupo). Ampliação original: 400x. Legenda: camada das células ganglionares (GCL), camada nuclear interna (INL) e camada nuclear externa (ONL).

4.1.3 O liraglutido previne as alterações nos níveis das proteínas das JO induzidas pela diabetes

Com o intuito de estabelecer uma correlação entre os efeitos observados na permeabilidade da BHR e organização das JO, os níveis proteicos de duas das suas

proteínas constituintes, claudina-5 e ocludina, foram determinados nas retinas de ratos controlo e diabéticos tratados com o liraglutido ou o veículo, por *Western Blotting*. Os níveis de claudina-5 aumentaram significativamente no grupo de ratos diabéticos, quando comparado com o grupo de ratos controlo (Fig. 4.2). Nos ratos diabéticos tratados com liraglutido há uma reversão dos níveis desta proteína, relativamente aos animais diabéticos (Figura 4.2).

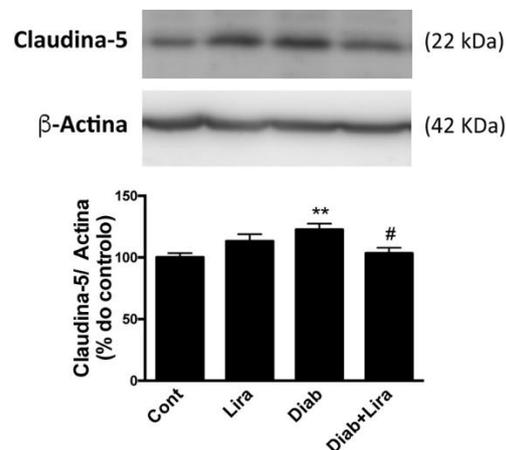


Figura 4.2 Efeito do liraglutido nos níveis proteicos da claudina-5 em retinas de ratos controlo e ratos diabéticos. Os níveis de proteína foram determinados por *Western Blotting* em extratos totais de retinas. O Western Blot apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo \pm SE ($n \geq 5$ animais/grupo). ** $p < 0,01$ comparativamente ao controlo, # $p < 0,05$ comparativamente ao diabético administrado com o veículo; ANOVA seguida do teste *post hoc* Bonferroni.

Quanto aos níveis da proteína ocludina, observou-se um aumento tendencial, não sendo, no entanto, significativo quando comparado com o grupo controlo (Fig. 4.3). Curiosamente, o tratamento com o liraglutido diminuiu significativamente o conteúdo desta proteína, relativamente aos animais diabéticos (Fig. 4.3).

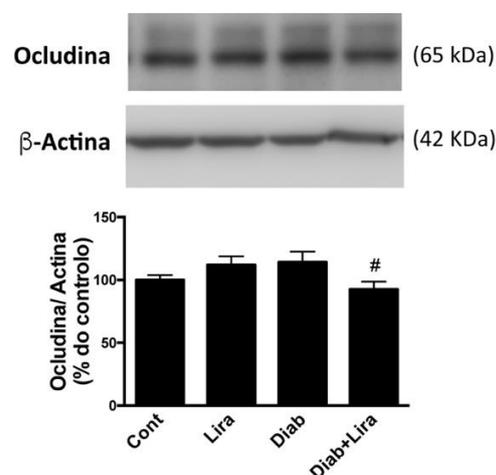


Figura 4.3 Efeitos do liraglutido nos níveis de ocludina. Os níveis de proteína foram determinados por *Western Blotting* em extratos totais de retinas. O Western Blot

apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo \pm SE ($n \geq 5$ animais/grupo). $\#p < 0,05$ comparativamente ao diabético não tratado; ANOVA seguida do teste *post hoc* Bonferroni.

4.1.4 A diabetes aumenta tendencialmente os níveis de GLP-1R na retina

Os miméticos do GLP-1 têm a capacidade de ativar o recetor acoplado a uma proteína G, o GLP-1R, levando à ativação da adenil ciclase, resultando na produção de AMPc. Curiosamente, os níveis de GLP-1R nos extratos de retina aumentaram tendencialmente nos animais diabéticos, quando comparados com o grupo controlo (Fig. 4.4). A administração de liraglutido aos animais diabéticos não alterou significativamente estes níveis (Fig. 4.4).

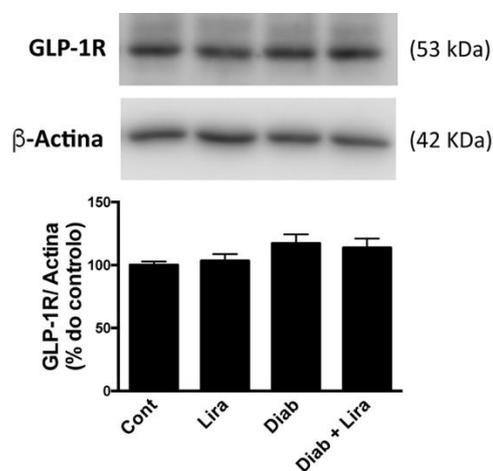


Figura 4.4 Efeito do liraglutido nos níveis de GLP-1R. Os níveis de proteína foram determinados por *Western Blotting* em extratos totais de retinas. O Western Blot apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo \pm SE ($n \geq 5$ animais/ grupo).

4.1.5 A diabetes e o liraglutido modulam a capacidade migratória das células da microglia na retina

Tal como referido anteriormente, há evidências de que a inflamação está associada à RD e, sendo as células da microglia as células imuno-residentes da retina, é de esperar que a ativação destas células tenha um papel importante na neuroinflamação.

Desta forma marcaram-se cortes de retina para o Iba-1 e analisou-se a distribuição das células da microglia por imunohistoquímica nas diferentes camadas da retina quatro grupos de animais em estudo.

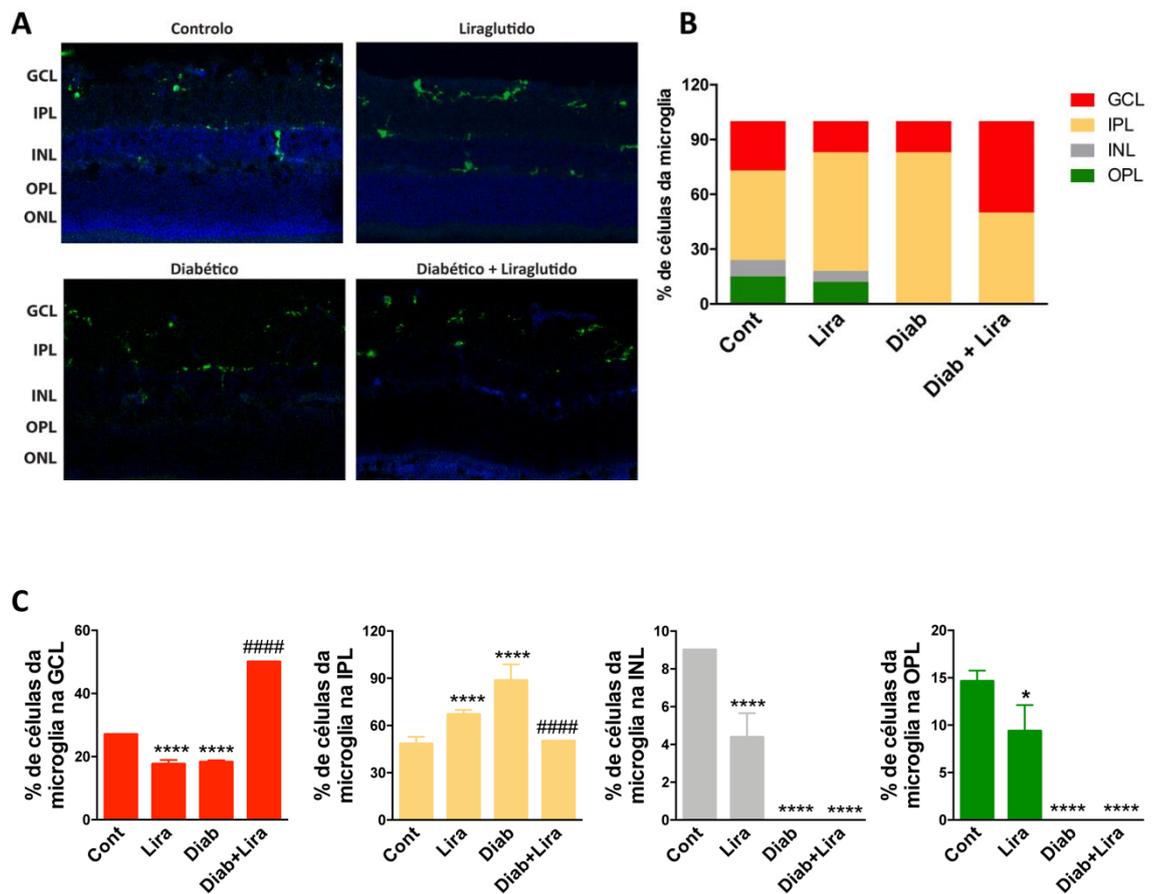


Figura 4.5 Efeito do liraglutido na capacidade migratória das células da microglia na retina diabética. (A) Imagens representativas da imunofluorescência para o Iba-1 (verde) e marcação nuclear com DAPI (azul), em secções transversais de retina de cada um dos grupos de animais (entre 8 a 14 imagens por grupo foram consideradas). Ampliação original 200x. Os resultados são expressos em percentagem da média do controlo \pm SE ($n \geq 2$ animais/grupo). * $p < 0,05$ comparativamente com o controlo, **** $p < 0,0001$ comparativamente com o controlo, ##### $p < 0,0001$ comparativamente com o grupo diabético administrado com o veículo; ANOVA seguida do teste *post hoc* Bonferroni. Legenda: camada das células ganglionares (GCL), camada plexiforme interna (IPL), camada nuclear interna (INL) e camada plexiforme externa (OPL).

As células da microglia encontram-se distribuídas principalmente por quatro camadas, GCL, IPL, INL e OPL (Figs. 4.5 A, B e C) nas retinas do grupo controlo, sendo que se encontram maioritariamente na IPL (49%) e na GCL (27%) (Fig. 4.5B). Após quatro semanas de diabetes, observou-se que as células da microglia sofrem uma redistribuição, localizando-se essencialmente em duas camadas mais internas da retina, a GCL e a IPL, com 17% e 83%, respetivamente (Figs. 4.5A, B e C). Apesar de não se ter observado uma alteração na localização das células da microglia na retina quando se administrou o liraglutido ao grupo diabético, verificou-se uma reversão na população percentual de células presentes na IPL, relativamente ao grupo diabético. Curiosamente, verificou-se que o fármaco aumenta significativamente a percentagem de células da microglia presentes na GCL (Figs. 4.5B e C).

4.2 Estudo dos potenciais efeitos protetores da Ex-4 na retina diabética

Como foi referido atrás, o nosso grupo mostrou que o mimético do GLP-1, a Ex-4, teve um efeito protetor na rutura da BHR e inflamação num modelo animal de lesão retiniana por isquémia-reperfusão através de supressão da ativação das células da microglia (Gonçalves *et al.*, 2016). Desta forma, uma segunda abordagem deste estudo consistiu em avaliar os efeitos benéficos da Ex-4 no contexto de diabetes e clarificar de que forma este fármaco tem a capacidade de regular a resposta inflamatória e a reatividade das células da microglia, prevenindo a rutura da BHR induzida pela diabetes.

4.2.1 A Ex-4 protege contra o aumento da permeabilidade da BHR induzida pela diabetes

Neste segundo estudo, observou-se que ao fim de quatro semanas de diabetes, a média dos níveis de insulina foi significativamente inferior comparativamente com os animais controlo (Fig. 4.6). Como esperado, dado tratar-se de uma DMT1 em que há falência das células β pancreáticas, este parâmetro não foi alterado com a administração de Ex-4, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre o grupo diabético tratado com a Ex-4 e o grupo diabético (Fig. 4.6).

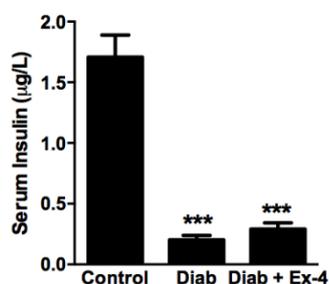


Figura 4.6 Efeito da Ex-4 nos níveis de insulina em ratos Wistar diabéticos. Os níveis de insulina foram determinados por ELISA. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo \pm SE (n=8 animais/ grupo). *** $p < 0,001$ quando comparado com o controlo da mesma idade; ANOVA seguida do teste *post hoc* Bonferroni.

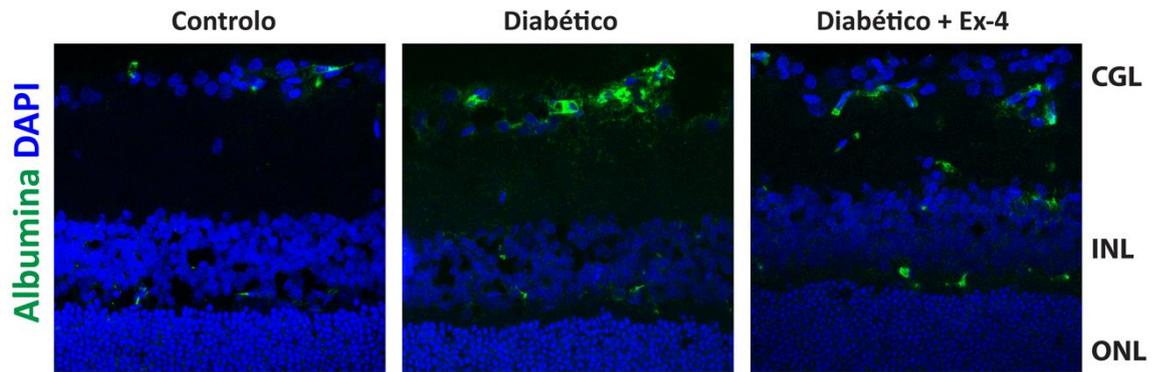


Figura 4.7 Efeito da Ex-4 no aumento da permeabilidade da BHR induzido pela diabetes. A rutura da barreira foi avaliada por imunohistoquímica, através do extravasamento da proteína albumina sérica dos vasos retinianos para o tecido. Imagens representativas da fluorescência da albumina sérica (verde), permitindo detetar os locais de extravasamento na retina (n=4 animais/ grupo). Ampliação original: 400x. Legenda: camada das células ganglionares (GCL), camada nuclear interna (INL) e camada nuclear externa (ONL).

À semelhança do observado no grupo de animais do primeiro estudo realizado, observou-se que a marcação da albumina se mantinha confinada no interior dos vasos da retina no grupo controlo (Fig.4.7). Após quatro semanas de diabetes, foi claro o extravasamento de albumina dos vasos sanguíneos retinianos para a retina, evidenciando um aumento da rutura da BHR (Fig. 4.7). A administração de Ex-4 preveniu esse efeito de forma bastante significativa (Fig. 4.7).

4.2.2 A diabetes aumenta tendencialmente os níveis proteicos de GLP-1R na retina

Os níveis de proteína GLP-1R foram avaliados nas retinas dos ratos Wistar controlo e diabéticos por *Western Blotting*. Os animais com um mês de diabetes apresentaram um aumento tendencial quando comparados com o grupo dos animais controlo (Fig. 4.8), sendo que a administração da Ex-4 reverteu tendencialmente os níveis de GLP-1R para valores semelhantes à média do grupo controlo (Fig. 4.8).

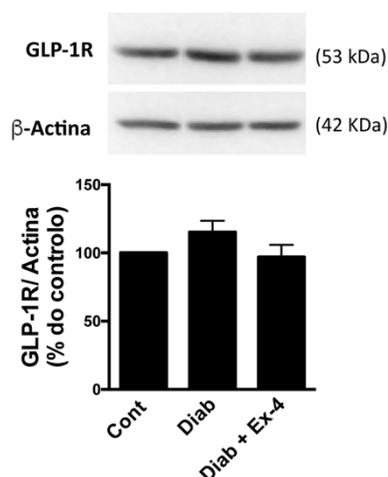


Figura 4.8 Efeito da Ex-4 nos níveis de GLP-1R. Os níveis de proteína foram determinados por *Western Blotting* em extratos totais de retinas. O Western Blot apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo \pm SE (n>3 animais/ grupo)

4.2.3 A Ex-4 tem um efeito anti-inflamatório nas retinas dos ratos diabéticos

A inflamação é um componente importante na patogénese da RD (Antonetti *et al.*, 2006; Avelaira *et al.*, 2010). À medida que os processos inflamatórios se desenvolvem na retina diabética, o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias conduz à adesão de leucócitos aos vasos retinianos. Neste trabalho, os níveis de proteína ICAM-1 foram avaliados nas retinas de ratos controlo e ratos diabéticos por *Western Blotting*. Tal como esperado, observou-se um aumento significativo nos níveis de ICAM-1 no grupo de animais diabéticos, quando comparados com os animais controlo (Fig. 4.9), sendo que o tratamento com Ex-4 preveniu o aumento desta molécula de adesão induzida pela diabetes (Fig. 4.9).

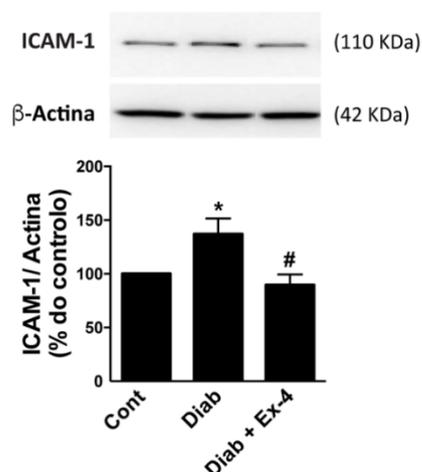


Figura 4.8 Efeito da Ex-4 nos níveis proteicos de ICAM-1 Os níveis de proteína foram determinados por *Western Blotting* em extratos totais de retinas. O Western Blot apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em

percentagem média do controlo \pm SE (n>3 animais/ grupo). * p<0,05 quando comparado com o controlo da mesma idade; # p<0,05 quando comparado com o grupo diabético. ANOVA seguida do teste *post hoc* Bonferroni.

4.2.4 A Ex-4 previne a alteração da distribuição das células da microglia nas diferentes camadas da retina, induzida pela diabetes

Tal como o estudo desenvolvido com o liraglutido, analisou-se o efeito da Ex-4 na distribuição das células da microglia na retina, de forma a clarificar o efeito deste fármaco na capacidade migratória das células da microglia. À semelhança do verificado no estudo anterior, numa situação controlo, as células da microglia encontram-se distribuídas essencialmente por quatro camadas (GCL, IPL, INL e OPL) (Figs. 4.9 A, B e C), sendo que a maior percentagem de células se encontra na IPL (67%) (Figs. 4.10 B). Numa situação de diabetes as células sofrem uma redistribuição estando presentes em três camadas da retina, a GCL, a OPL e a IPL (10%, 10% e 80%, respetivamente) (Figs. 4.9 A, B e C). A administração de Ex-4 induziu uma reversão na percentagem de células da microglia presentes na GCL, IPL e INL (Figs. 4.9 A, B e C).

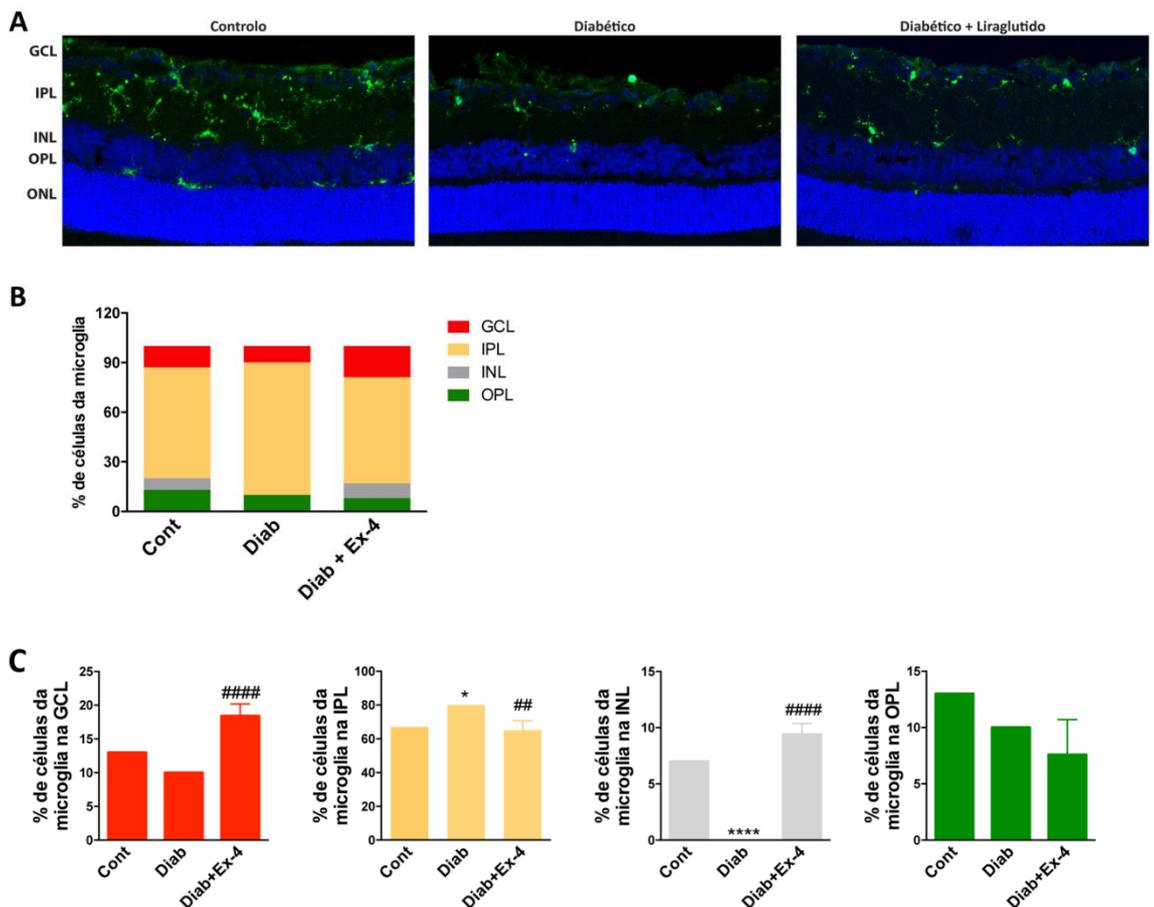


Figura 4.9 Efeito da Ex-4 na migração das células da microglia na retina. (A) Imagens representativas da imunofluorescência para o Iba-1 (verde) e marcação nuclear com DAPI (azul), em secções transversais da retina de cada grupo de animais (10 a 11 imagens consideradas por grupo de animais). Ampliação original 200x. Os resultados são expressos

em percentagem da média do controlo \pm SE ($n > 2$ animais/ grupo). * $p < 0,05$ comparativamente com o controlo, **** $p < 0,0001$ comparativamente com o controlo, ## $p < 0,01$ e ##### $p < 0,0001$ comparativamente com o diabético não tratado; ANOVA seguida do teste *post hoc* Bonferroni. Legenda: camada das células ganglionares (GCL), camada plexiforme interna (IPL), camada nuclear interna (INL) e camada plexiforme externa (OPL).

Analisando as diferentes camadas, verifica-se que, na GCL, o número de células se encontra tendencialmente diminuído numa situação de diabetes (10%) e que a administração do fármaco reverte esta situação, aumentando significativamente o número de células presente nesta camada (19%) (Fig. 4.9C). Na IPL verifica-se que no grupo diabético, o número de células da microglia se encontra significativamente aumentado (80%), comparativamente com o grupo controlo (67%) e que a administração do fármaco leva a uma diminuição significativa do número de células da microglia presentes nesta camada (65%) (Fig. 4.9C). No grupo de animais diabéticos não se observou qualquer marcação de Iba-1 na INL. Contudo, após a administração do fármaco esta situação foi revertida, com a presença de cerca de 9% de células da microglia nesta camada. Ao nível da OPL não se verificaram alterações significativas na distribuição das células dos diferentes grupos de animais em estudo (Fig. 4.9C).

4.2.5 A Ex-4 previne as alterações morfológicas nas células da microglia induzidas pela diabetes

De forma a correlacionar o aumento da permeabilidade da BHR induzida pela diabetes com a reatividade das células da microglia perivasculares, a imunorreatividade para o Iba-1 (marcador das células da microglia) foi avaliada em retinas intactas, na região das células ganglionares, tendo sido feita uma análise das alterações morfológicas das células da microglia (Fig.4.10).

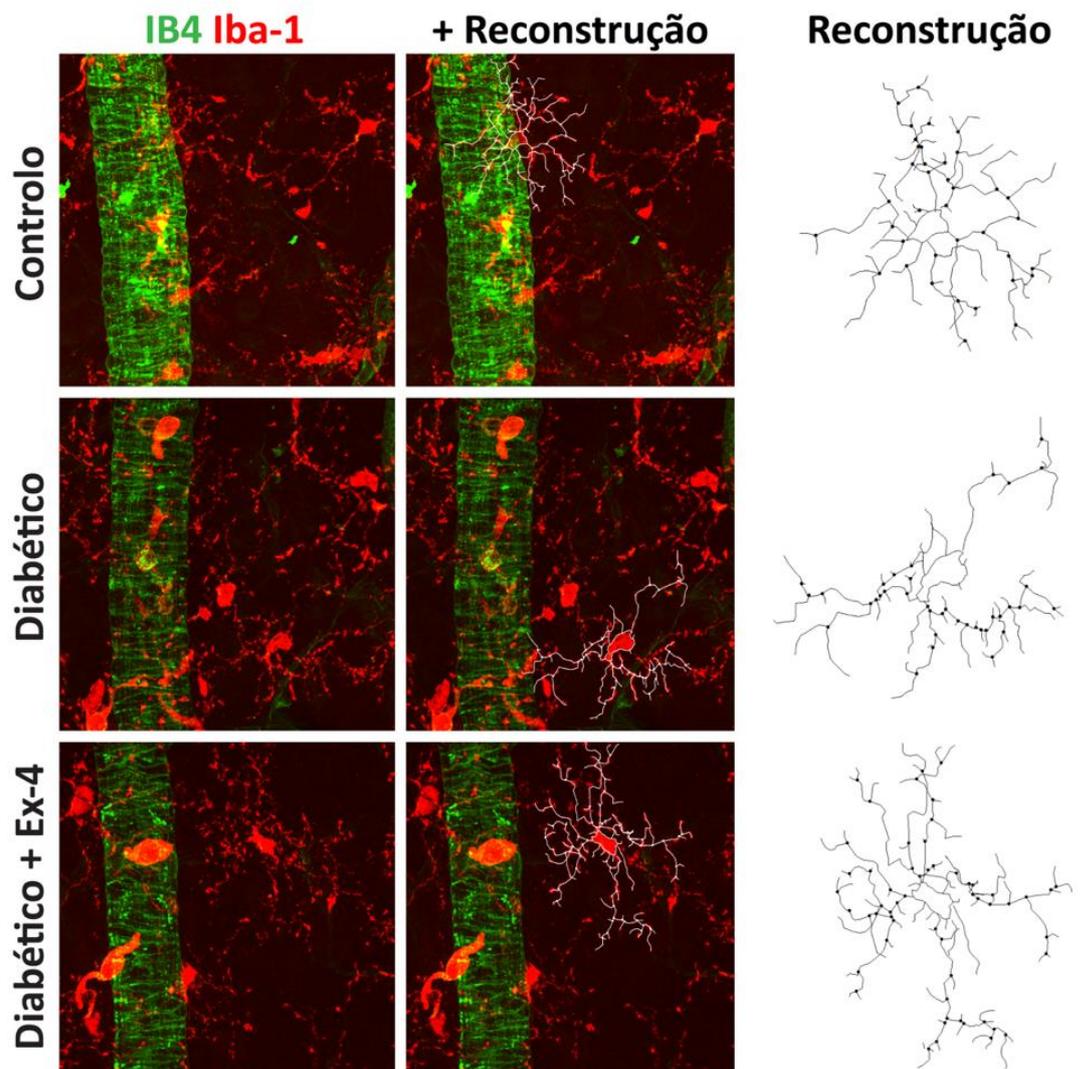


Figura 4.10 Efeito da Ex-4 nas alterações morfológicas nas células da microglia da retina, induzidas pela diabetes. Imagens representativas da imunofluorescência para o Iba-1 (vermelho), para os vasos sanguíneos com o IB4 (verde) e marcação nuclear com DAPI (azul), em *whole.mounts* de retina (n=4 animais /grupo; ≥ 23 células por grupo de animais). Ampliação original 630x.

Os dados morfométricos foram analisados considerando o número de árvores, comprimento total dos processos por árvore, número de nódulos e de terminações, número e comprimento dos processos por ordem, circularidade e área do corpo celular (Figs. 4.11A e B).

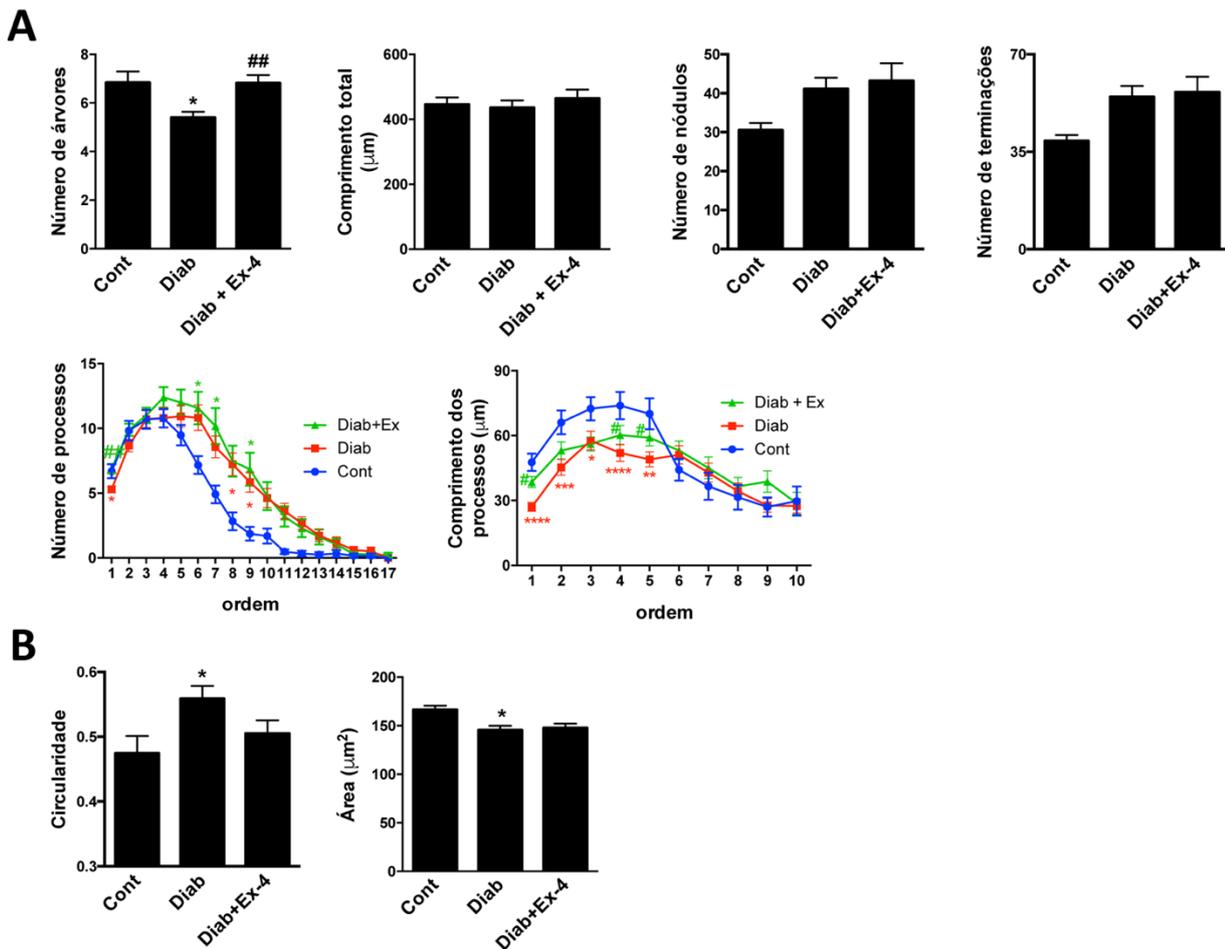


Figura 4.11 Efeito da Ex-4 na morfologia das células da microglia. As células da microglia foram marcadas para o Iba-1 e fez-se a sua reconstrução tridimensional manualmente, recorrendo ao software Neurolucida. Os dados morfométricos foram adquiridos no Neurolucida Explorer, quanto ao número de árvores, comprimento total dos processos por árvore, número de nódulos e de terminações, número e comprimento dos processos por ordem, circularidade e área do corpo celular. Os resultados são expressos em número médio do controlo \pm SE (n=4 animais /grupo; \geq 23 células por grupo de animais). * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ quando comparado com o controlo da mesma idade; # $p < 0,05$ e ## $p < 0.01$ quando comparado com o grupo diabético. ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* Bonferroni.

As células da microglia da retina do grupo de animais diabéticos evidenciaram ser constituídas por um menor número de árvores, comparativamente com os animais controlo da mesma idade (Fig. 4.11 A). A administração de Ex-4 reverteu esta situação, aumentando significativamente o número de árvores, em cada célula, comparativamente com o grupo de ratos diabéticos (Fig. 4.11A).

Para além do número de árvores constituintes de cada célula da microglia, foram analisadas também as alterações no comprimento total dos processos de cada árvore, bem como o número e comprimento dos processos por ordem (Fig. 4.11A). Da primeira análise não se verificaram quaisquer alterações, entre os diferentes grupos em estudo (controlo, diabético não tratado e diabético tratado). Já no número

dos processos verificou-se que na condição do grupo diabético há um menor número de processos, comparativamente com o controlo para as ordens mais baixas, isto é para os processos mais proximais do corpo celular. No entanto, após a administração do fármaco essa situação é revertida. Esta situação prolonga-se de forma tendencial até aos processos de terceira ordem. Nos processos mais distais do corpo celular verifica-se que tanto os animais diabéticos tratados com o fármaco como os animais diabéticos estão tendencialmente aumentados, comparativamente com o grupo controlo (Fig. 4.11A).

No que se refere ao comprimento dos processos, verificou-se uma diminuição significativa do mesmo nas primeiras cinco ordens, comparativamente com o grupo dos ratos controlo. No entanto, o tratamento com Ex-4 reverteu este efeito para as ordens mais baixas. Estes resultados não se aplicam no caso do comprimento dos processos mais distais. Nos três grupos de animais não se verificam diferenças significativas no comprimento dos processos mais distais (Fig. 4.11A).

Da análise do número de nódulos e terminações não se verificaram quaisquer alterações com relevância estatística entre os grupos de animais em estudo (Fig. 4.11A).

A partir da análise morfológica das células da microglia verificou-se, ainda, que existem alterações ao nível da circularidade do corpo celular das células dos diferentes grupos. As células da microglia de ratos diabéticos apresentaram um aumento na circularidade do corpo celular comparativamente com o grupo controlo. A administração da Ex-4 diminuiu tendencialmente o valor deste parâmetro, não sendo, no entanto, essa alteração significativa (Fig. 4.11B).

Quanto à área do corpo celular das células da microglia observou-se uma diminuição significativa no grupo dos ratos diabéticos comparativamente com o grupo de animais controlo. A administração do fármaco não evidenciou qualquer efeito (Fig. 4.11B).

5. Discussão

O aumento da incidência da DM (International Diabetes Federation, 2017), assim como das complicações associadas (Calcutt *et al.*, 2009), faz com que haja um grande interesse na identificação dos mecanismos associados ao seu desenvolvimento e à identificação de novos alvos terapêuticos. Neste sentido, a RD, sendo uma das principais complicações microvasculares associadas à diabetes, e uma das principais causas de perda de visão e cegueira (Donald S., Fong Lloyd P., Aiello Frederick L., 2004; Santiago *et al.*, 2018), tornou-se um importante alvo de estudo, no sentido de se conhecerem melhor os mecanismos moleculares e celulares subjacentes à patogênese da doença, para que possam ser identificados novos alvos terapêuticos.

Atualmente existem duas classes principais de agentes terapêuticos baseados nas incretinas aprovadas para o tratamento da DMT2: os inibidores da enzima DPP-4 e os agonistas do recetor do GLP-1. Ambas as classes visam o aumento do tempo de meia vida do GLP-1 em circulação, seja por inibição da enzima responsável pela sua clivagem, a DPP-4 (inibidores da DPP-4), seja pela administração de compostos miméticos do GLP-1, mais resistentes à ação da enzima DPP-4 (agonistas do GLP-1R). O GLP-1, por sua vez, contribui para a regulação da homeostasia da glicose, através da estimulação da produção e secreção de insulina (Baggio and Drucker, 2007). Observou-se ainda que o GLP-1 tem efeitos pleiotrópicos, com várias funções a nível do sistema nervoso central, nomeadamente efeitos neuroprotetores (Hernández *et al.*, 2016). Neste grupo dos agonistas do GLP-1R, encontram-se o liraglutido e a Ex-4, atualmente utilizados já em modelos animais, mas cujos efeitos mecânicos não estão totalmente identificados. Assim neste estudo, fomos explorar os efeitos destes dois fármacos, nomeadamente ao nível da BHR e da resposta inflamatória associada à diabetes.

Estudos anteriores do nosso grupo e de outros, realizados em modelos animais de diabetes e utilizando um inibidor da enzima DPP-4, a sitagliptina (administrado na clínica a doentes com DMT2), mostraram que esta tem a capacidade de preservar a integridade da BHR, prevenindo ainda a inflamação e a morte das células da retina por apoptose. Sendo este um composto anti-hiperglicémico, capaz de reduzir os níveis de glicose em circulação, é assim sugerido que a sua ação possa ser benéfica na prevenção de complicações microvasculares, como a RD (Badyal and Kaur, 2008; Gonçalves *et al.*, 2012).

Uma vez que estão ainda por esclarecer quais os efeitos benéficos diretos dos compostos com ação anti-hiperglicémica, na retina diabética, desenvolveram-se alguns estudos no sentido de esclarecer os efeitos benéficos diretos da sitagliptina, num modelo animal de DMT1. Estes estudos revelaram que a sitagliptina tem a capacidade de inibir o aumento da permeabilidade da BHR, protegendo assim a função de barreira, por um mecanismo independente da secreção de insulina (Gonçalves *et al.*, 2014).

Paralelamente ao que havia sido feito anteriormente com a sitagliptina, neste trabalho fomos estudar os efeitos dos agonistas do GLP-1R, o liraglutido e a Ex-4, num modelo animal de DMT1, nas alterações da permeabilidade da BHR. É de considerar que o liraglutido não afetou os níveis de glucose, HbA1c (%) e o peso comparativamente com os dos animais do grupo diabético. De referir que estas medições não foram realizadas nos animais do estudo da Ex-4, contudo foram analisados os níveis de insulina no soro, que ao não estarem alterados, sugerem também que a Ex-4 não atua de forma dependente da insulina.

Tal como o que havia sido observado nos estudos com a sitagliptina (Gonçalves *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2014), também o Liraglutido e a Ex-4 parecem ter um efeito benéfico sobre as alterações na BHR induzidas pela diabetes, uma vez que os animais tratados apresentam um menor extravasamento de albumina, quando comparados com os animais diabéticos, não tratados.

É conhecido ainda que as alterações que se verificam ao nível da permeabilidade da BHR, estão diretamente associadas com as alterações que ocorrem tanto nos níveis como na distribuição das proteínas das JO. Estudos anteriores do nosso grupo mostraram também que a sitagliptina impediu a redistribuição subcelular das proteínas constituintes das JO claudina-5, Ocludina e ZO-1.

Com o objetivo de clarificar os efeitos do liraglutido ao nível da BHR, à semelhança de projetos anteriores, fomos aqui verificar qual o efeito do liraglutido nos níveis de duas importantes proteínas constituintes das junções oclusivas: a claudina-5 e a ocludina. Curiosamente, ao contrário do que foi anteriormente observado (Gonçalves *et al.*, 2012), neste estudo, os animais diabéticos apresentaram uma tendência para o aumento (no caso da ocludina) ou mesmo um aumento significativo (no caso da claudina-5) dos níveis destas proteínas. Contudo, animais diabéticos tratados com o liraglutido apresentaram valores semelhantes ao controlo. Uma vez que, como descrito acima, se observou também uma redução dos níveis de albumina nas retinas de animais diabéticos tratados com liraglutido, estes resultados sugerem que este fármaco pode, de alguma forma, reverter alterações induzidas pela diabetes ao nível da BHR. De referir que, apesar de trabalhos anteriores mostrarem que a diabetes conduz a uma diminuição dos níveis das proteínas das JO (Gonçalves *et al.*, 2012), o facto de haver uma tendência, nos nossos resultados para que estas estejam aumentadas, por si só, não é necessariamente contraditório, apesar dos níveis estarem aumentados, as proteínas podem ter sofrido uma redistribuição subcelular, induzida pelos elevados níveis de glucose no sangue, podendo comprometer a formação da JO e a integridade da BHR. Nesse sentido seria importante, num futuro próximo, fazer um estudo mais completo da avaliação das alterações destas proteínas, quantificando os seus níveis e a sua distribuição nas células endoteliais, com o intuito de perceber as alterações verificadas na permeabilidade da BHR, numa situação de diabetes.

Segundo o que já foi descrito anteriormente, numa situação de diabetes o GLP-1 é libertado na corrente sanguínea, sofrendo rápida ação da enzima DPP-4. Esta enzima, que se encontra no plasma, na sua forma livre, tem a capacidade de clivar e inativar o GLP-1 (Gorrell, Gysbers and McCaughan, 2001). Numa situação de diabetes, os níveis proteicos desta enzima e a sua atividade encontram-se aumentados, o que leva a que os níveis de GLP-1 em circulação sejam francamente menores. O GLP-1 atua através do GLP-1R, ativando várias vias metabólicas, o que resulta num aumento dos níveis de cAMP. Nesse sentido, estudos desenvolvidos por outros grupos de investigação mostraram que há um aumento significativo de cAMP nas retinas de murganhos diabéticos, tratados com agonistas do GLP-1R, pelo que se conclui que haja uma ativação do GLP-1R numa situação de diabetes (Gonçalves *et al.*, 2016; Hernández *et al.*, 2016).

Sabendo que os fármacos utilizados neste estudo atuam como agonistas do GLP-1R, era fundamental perceber se existiam alterações ao nível deste recetor, para os diferentes grupos de animais utilizados. De facto, o animais diabéticos não tratados apresentam uma tendência para um aumento nos níveis proteicos de GLP-1R. Esta tendência pode ser justificada como um mecanismo compensatório de ativação do recetor pelos níveis diminuídos de GLP-1 existentes em circulação, numa situação de diabetes. É de salientar, que o tratamento com os agonistas do GLP-1R, parece reverter este aumento tendencial encontrado na diabetes (pelo menos para o caso do tratamento com Ex-4), possivelmente porque sendo estes compostos agonistas do recetor, têm a capacidade de estabilizar os níveis de expressão do GLP-1R.

Apesar de ser maioritariamente classificada como uma doença microcirculatória da retina (Hernández *et al.*, 2016), evidências da última década sugerem uma componente neurodegenerativa associada à RD (Simó and Hernández, 2017), acompanhada por uma sobreexpressão de mediadores pró-inflamatórios (Miyamoto *et al.*, 1999). Também a este nível, o inibidor da enzima que degrada o GLP-1, a sitagliptina se mostrou eficaz, apresentando um efeito anti-inflamatório, uma vez que previne o aumento de IL-1 β e ICAM-1 nas retinas de ratos diabéticos, o que poderá contribuir para a prevenção da degradação da BHR (A. Gonçalves *et al.*, 2012; A. Gonçalves *et al.*, 2014). A sitagliptina mostrou ainda ter efeitos preventivos em relação à morte de células neuronais da retina induzida pela diabetes, sugerindo, desta forma que a inibição da enzima DPP-4 terá efeitos neuroprotetores nas retinas diabéticas.

Está descrito na literatura que numa situação de RD o número de leucócitos se encontra aumentado (Miyamoto *et al.*, 1999). Nesse sentido, é de esperar que o peptídeo ICAM-1, responsável por mediar a adesão de leucócitos, também se encontre aumentado numa situação de diabetes. Neste estudo, procedeu-se, então, à análise do conteúdo do ICAM-1 e verificou-se, à semelhança do que foi previamente

descrito na literatura (Miyamoto *et al.*, 1999), que os níveis desta proteína se encontram aumentados na diabetes. Por sua vez, a administração da Ex-4 ao grupo de animais diabéticos reverteu esta situação, evidenciando, assim, o potencial efeito terapêutico deste composto.

É de notar, no entanto, que os efeitos neuroprotetores em retinas diabéticas podem ser mediados pelo aumento dos níveis de GLP-1 em circulação, na retina. Numa tentativa de perceber se os efeitos da sitagliptina na retina seriam ou não independentes dos níveis de GLP-1, estudos prévios do nosso grupo avaliaram os efeitos diretos da ativação do GLP-1R na rutura da BHR, num modelo de IR. Daqui concluíram que a Ex-4 previne o aumento da permeabilidade vascular no modelo animal. Contudo verificaram que, em estudos *in vitro*, a Ex-4 não preveniu as alterações de permeabilidade, o que sugeriu que os efeitos protetores da Ex-4 não foram devidos a uma ação direta do fármaco nas células endoteliais, mas sim por inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias por células da microglia ativadas. Adicionalmente, *in vitro*, evidenciaram que a Ex-4 reduziu a reatividade das células da microglia, induzida por estímulo lipopolissacarídeo (LPS), e teve a capacidade de prevenir o aumento da permeabilidade das células, reduzindo a expressão de marcadores inflamatórios (A. Gonçalves *et al.*, 2016).

De forma a compreender melhor o efeito dos agonistas do GLP-1R na reatividade das células da microglia numa situação de diabetes, procedeu-se ao estudo da distribuição e morfologia das células da microglia. Estudos recentes mostraram que as células da microglia têm a capacidade de se redistribuir, migrando para os locais de lesão e libertando citocinas pró-inflamatórias, que podem estar envolvidas na rutura da BHR (Madeira *et al.*, 2015). Estudos do grupo mostraram ainda que a Ex-4 tem efeitos anti-inflamatórios nas células da microglia, modulando a sua ativação (Gonçalves *et al.*, 2016).

Desta forma avaliámos a distribuição das células da microglia nos grupos controlo, diabético e diabético tratado (com liraglutido e Ex-4). Segundo estudos prévios (Grigsby *et al.*, 2014), numa condição normal e de repouso, as células da microglia encontram-se essencialmente distribuídas no IPL e na OPL, estando ausentes na ONL. Contudo, numa situação de RD, as células da microglia foram descritas como estando presentes essencialmente nas camadas GCL, IPL, INL e RNFL (Grigsby *et al.*, 2014).

À semelhança destes estudos, também nós verificámos que as células da microglia se encontravam maioritariamente distribuídas pelas camadas mais internas, sendo a sua presença maioritária na GCL e na INL. A administração dos fármacos previne as alterações de distribuição destas células, contudo, só nos estudos com a Ex-4 é que se verificou a presença das células nas camadas iniciais, da situação controlo. Nos estudos com o liraglutido, no diabético tratado, verificou-se apenas uma redistribuição equitativa das células pelas mesmas camadas que o diabético não tratado. Sabe-se que as células da microglia respondem a estímulos

inflamatórios, libertando citocinas pró-inflamatórias e removendo as células apoptóticas por fagocitose (Elward and Gasque, 2003; Krady *et al.*, 2005). Nesse sentido é possível que as células estejam a migrar para a zona da lesão, no sentido de a remover, de modo a manter a homeostasia do organismo.

Nestas células, a sua estrutura está fortemente ligada à sua função, já que uma alteração da sua morfologia pode comprometer a sua função. Paralelamente, estudos neste sentido mostram que as células da microglia, quando ativadas em resposta a um determinado estímulo, para além de migrarem para o local da lesão, também alteram a sua morfologia, passando de um estado de altamente ramificado para uma forma amebóide. Nesse sentido, também neste trabalho fomos avaliar a morfologia das células da microglia, nas diferentes condições (controlo, diabético e diabético tratado). Tal como descrito por outros autores, numa situação de repouso, as células da microglia encontram-se fortemente ramificadas, com um elevado número de árvores e de processos. Porém, sabemos que na presença de elevados níveis de glucose elas ficam ativadas, o que está de acordo com os resultados apresentados neste trabalho, que revelam que nos animais diabéticos as células da microglia possuem um menor número de ramificações. A administração da Ex-4 reverte esta situação, apresentando as células do grupo diabético tratado uma morfologia mais ramificada, semelhante à condição do controlo.

Outros autores referem ainda que numa situação de repouso as células da microglia apresentam um corpo celular com uma forma mais circular, e longas ramificações (Dalmau *et al.*, 1997). À semelhança destes estudos, também o nosso trabalho vem confirmar este dado, uma vez que verificámos que numa situação de diabetes, tanto os processos mais proximais (ordens mais baixas), como o número e o comprimento dos mesmos se encontra diminuído, comparativamente com as células do controlo. A administração da Ex-4 reverteu esta situação, aproximando a morfologia das células, daquela que é característica do controlo. Verificámos ainda, à semelhança de outros estudos, que na diabetes a circularidade do corpo celular é significativamente menor no grupo diabético, bem como a sua área de superfície, e que a administração do fármaco tende a reverter essa situação. Desta forma, concluímos que a Ex-4 tem a capacidade de prevenir as alterações morfológicas nas células da microglia, potenciando assim a diminuição da inflamação associada à diabetes. É de salientar uma ativação prolongada das células da microglia pode, por si só, levar a danos na retina, aumentando assim a inflamação associada (Fetler and Amigorena, 2005; Karlstetter *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015).

Em conclusão, neste trabalho mostrámos que ambos os agonistas do GLP-1R em estudo, o liraglutido e a Ex-4, conferem efeitos protetores na rutura da BHR e de modulação da reatividade das células da microglia. Nesse sentido, acreditamos que as terapias baseadas em incretinas podem vir a ser uma opção terapêutica potencial para o tratamento de doenças da retina, que se caracterizem por um aumento de permeabilidade vascular e neuroinflamação, como a RD.

6. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem a elaboração das seguintes conclusões principais:

- A administração do liraglutido previne a ruptura da BHR e as alterações nos níveis das proteínas das JO, claudina-5 e ocludina, induzida pela diabetes.
- O liraglutido parece ter um efeito nos níveis de GLP-1R, revertendo os níveis desta proteína tendencialmente aumentados nos animais diabéticos.
- O tratamento com o liraglutido mostrou ainda que este tem um potencial efeito benéfico na migração das células da microglia na retina, induzida pela diabetes.
- A administração da Ex-4 previne a ruptura da BHR, induzida pela diabetes.
- A administração da Ex-4 diminui os níveis da molécula de adesão ICAM-1 na retina de ratos diabéticos.
- O tratamento com a Ex-4 reverte as alterações de migração e de morfologia das células da microglia induzidas pela diabetes.

Em sumário, estes resultados sugerem que os agonistas do GLP-1R em estudo, o liraglutido e a Ex-4, têm efeitos protetores ao nível da ruptura da BHR e modulam a reatividade das células da microglia. Estas conclusões levam-nos a crer que as terapias baseadas em incretinas podem vir a ser uma opção terapêutica para a RD.

7. Referências

- Ahlqvist, E. *et al.* (2018) 'Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables', *The Lancet Diabetes and Endocrinology*.
- Aiello, L. P. *et al.* (1997) 'Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective β -isoform-selective inhibitor', *Diabetes*.
- Alberti, K. G. M. M. and Zimmet, P. Z. (1998) 'Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation.', *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 15(7), pp. 539–553.
- Antonetti, D. A. *et al.* (1998) 'Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occludin content: vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells. Penn State Retina Research Group.', *Diabetes*.
- Antonetti, D. A. *et al.* (2006) 'Diabetic retinopathy: Seeing beyond glucose-induced microvascular disease', *Diabetes*.
- Aveleira, A. *et al.* (2010) 'TNF- α Signals Through PKC δ / NF- κ B to Alter the Tight', 59(November).
- Badyal, D. K. and Kaur, J. (2008) 'Sitagliptin: A new class of oral drug for type 2 diabetes', *JK Science*, 10(2), pp. 2–4.
- Baggio, L. L. and Drucker, D. J. (2007) 'Biology of Incretins: GLP-1 and GIP', *Gastroenterology*.
- Barber, a J., Antonetti, D. a and Gardner, T. W. (2000) 'Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group.', *Investigative ophthalmology & visual science*.
- Barthelmes, D. *et al.* (2015) 'Outcomes of persistently active neovascular age-related macular degeneration treated with VEGF inhibitors: Observational study data', *British Journal of Ophthalmology*.
- Blaschke, F., Caglayan, E. and Hsueh, W. A. (2006) 'Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonists: Their Role as Vasoprotective Agents in Diabetes', *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*.
- Butler, A. E. *et al.* (2003) 'Beta-cell deficit and increased beta-Cell apoptosis in humans with type 2 diabetes', *Diabetes*.
- Calcutt, N. A. *et al.* (2009) 'Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials', *Nat Rev Drug Discov*.
- Campbell, J. E. and Drucker, D. J. (2013) 'Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action', *Cell Metabolism*.

- Chyan, Y. (2007) 'Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitors: An evolving treatment for type 2 diabetes from the incretin concept', *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*.
- Cnop, M. *et al.* (2005) 'Mechanisms of Pancreatic β -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes: Many Differences, Few Similarities', *Diabetes*.
- Cnop, M. *et al.* (2005) 'Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities', *Diabetes*, 54 Suppl 2(6), pp. S97-107.
- Cogan (1961) 'Retinal Patterns', *Public Health*.
- Cunha-Vaz, J. *et al.* (1975) 'Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes', *British Journal of Ophthalmology*.
- Cunha-Vaz, J. G. (2006) 'Clínica de la retinopatía diabética', *Retinopatía Diabética*, pp. 49–62.
- Cunha-Vaz, J. G., Shakib, M. and Ashton, N. (1966) 'Studies on the permeability of the blood-retinal barrier I. on the existence, development, and site of a blood-retinal barrier', *British Journal of Ophthalmology*, 50(8), pp. 441–453.
- Dalmou, I. *et al.* (1997) 'Development of microglia in the prenatal rat hippocampus', *Journal of Comparative Neurology*, 377(1), pp. 70–84.
- Davidson, J. A. (2013) 'Incretin-based therapies: Focus on effects beyond glycemic control alone', *Diabetes Therapy*.
- Ding, L., Gysemans, C. and Mathieu, C. (2013) ' β -Cell differentiation and regeneration in type 1 diabetes', *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 15(S3), pp. 98–104.
- Donald S., Fong Lloyd P., Aiello Frederick L., F. R. K. (2004) 'Diabetic Retinopathy', *DIABETES CARE*, 27.
- Du, L. *et al.* (2017) 'Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target', *Molecular Neurobiology*.
- Elward, K. and Gasque, P. (2003) "'Eat me" and "don't eat me" signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: Emphasis on the critical role of the complement system', in *Molecular Immunology*.
- Fanning, a S., Mitic, L. L. and Anderson, J. M. (1999) 'Transmembrane proteins in the tight junction barrier.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*.
- Fetler, L. and Amigorena, S. (2005) 'Brain under surveillance: The microglia patrol', *Science*.
- Fortin, J.-P. *et al.* (2010) 'Pharmacological Characterization of Human Incretin Receptor Missense Variants', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.
- Fowler, M. J. (2011) 'Microvascular and macrovascular complications of diabetes', *Clinical Diabetes*.

- Gallwitz, B. (2014) 'Extra-pancreatic effects of incretin-based therapies', *Endocrine*.
- Gardete-Correia, L. *et al.* (2010) 'First diabetes prevalence study in Portugal: PREVADIAB study', *Diabetic Medicine*.
- Gardner, T. W. *et al.* (1997) 'Astrocytes increase barrier properties and ZO-1 expression in retinal vascular endothelial cells', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.
- Gardner, T. W. *et al.* (2002) 'Diabetic retinopathy: More than meets the eye', *Survey of Ophthalmology*.
- Gardner, T. W. *et al.* (2011) 'An integrated approach to diabetic retinopathy research', *Archives of Ophthalmology*.
- Giacco, F. and Brownlee, M. (2010) 'Oxidative stress and diabetic complications', *Circulation Research*.
- Gonçalves, A. *et al.* (2012) 'Protective effects of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin in the blood-retinal barrier in a type 2 diabetes animal model', *Diabetes, Obesity and Metabolism*.
- Gonçalves, A. *et al.* (2014) 'Dipeptidyl peptidase-IV inhibition prevents blood-retinal barrier breakdown, inflammation and neuronal cell death in the retina of type 1 diabetic rats', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*.
- Gonçalves, A. *et al.* (2016) 'Protective effect of a GLP-1 analog on ischemia-reperfusion induced blood-retinal barrier breakdown and inflammation', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57(6), pp. 2584–2592.
- Gorrell, M. D., Gysbers, V. and McCaughan, G. W. (2001) 'CD26: A multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes', *Scandinavian Journal of Immunology*.
- Grigsby, J. G. *et al.* (2014) 'The Role of Microglia in Diabetic Retinopathy', *Journal of Ophthalmology*.
- H., A. and Huang, W. (2012) 'Retinal Vein Occlusion Induced by a MEK Inhibitor - Impact of Oxidative Stress on the Blood-Retinal Barrier', *Oxidative Stress and Diseases*, (October).
- Hendrick, A. M., Gibson, M. V. and Kulshreshtha, A. (2015) 'Diabetic Retinopathy', *Primary Care - Clinics in Office Practice*, 42(3), pp. 451–464.
- Hernández, C. *et al.* (2016) 'Topical administration of GLP-1 receptor agonists prevents retinal neurodegeneration in experimental diabetes', *Diabetes*, 65(1), pp. 172–187.
- Hildebrand, G. D. and Fielder, A. R. (2011) 'Anatomy and physiology of the retina', in *Pediatric Retina*.
- Hossain, P., Kavar, B. and El Nahas, M. (2007) 'Obesity and Diabetes in the Developing World — A Growing Challenge', *New England Journal of Medicine*.

- Ichinose, K., Kawasaki, E. and Eguchi, K. (2007) 'Recent advancement of understanding pathogenesis of type 1 diabetes and potential relevance to diabetic nephropathy', *American Journal of Nephrology*.
- International Diabetes Federation (2017) *Eighth edition 2017*.
- International Diabetes Federation (IDF) (2013) *Sixth edition 2013*. 6th Edition.
- Johnson, D. R. *et al.* (2005) 'Inhibition of vagally mediated immune-to-brain signaling by vanadyl sulfate speeds recovery from sickness', *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Joussen, A. M. *et al.* (2002) 'Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression', *FASEB J*.
- Joussen, A. M. *et al.* (2004) 'A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy.', *FASEB J*.
- Joussen, A. M. *et al.* (2009) 'TNF-alpha mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long-term histopathological alterations.', *Molecular vision*. doi: 151 [pii].
- Kale, G. *et al.* (2003) 'Tyrosine phosphorylation of occludin attenuates its interactions with ZO-1, ZO-2, and ZO-3', *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Karlstetter, M. *et al.* (2014) 'Translocator protein (18 kDa) (TSPO) is expressed in reactive retinal microglia and modulates microglial inflammation and phagocytosis', *Journal of Neuroinflammation*.
- Kendall, D. M., Kim, D. and Maggs, D. (2006) 'Incretin mimetics and dipeptidyl peptidase-IV inhibitors: a review of emerging therapies for type 2 diabetes.', *Diabetes technology & therapeutics*, 8(3), pp. 385–396.
- Kieffer, T. J., McIntosh, C. H. and Pederson, R. A. (1995) 'Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV.', *Endocrinology*.
- Klein, R. *et al.* (1995) 'The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy XV: The Long-term Incidence of Macular Edema', *Ophthalmology*.
- Kolterman, O. G. *et al.* (2003) 'Synthetic exendin-4 (exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.
- Kowluru, R. A. and Chan, P.-S. (2007) 'Oxidative Stress and Diabetic Retinopathy', *Experimental Diabetes Research*, 2007, pp. 1–12.
- Krady, J. K. *et al.* (2005) 'Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy', *Diabetes*.
- Leal, E. C. *et al.* (2007) 'Inducible nitric oxide synthase isoform is a key mediator of leukostasis and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy.',

Investigative ophthalmology & visual science.

- Leal, E. C. *et al.* (2010) 'Calcium dobesilate inhibits the alterations in tight junction proteins and leukocyte adhesion to retinal endothelial cells induced by diabetes', *Diabetes*.
- Lee, W. *et al.* (2014) 'Exendin-4 Inhibits HMGB1-Induced Inflammatory Responses in HUVECs and in Murine Polymicrobial Sepsis', *Inflammation*.
- Lenski, M. *et al.* (2011) 'Effects of DPP-4 inhibition on cardiac metabolism and function in mice', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*.
- Levin, L. (2003) 'Optic Nerve', *Adler's Physiology of the Eye*, 10th Edn, pp. 603–638.
- Li, A. Q. *et al.* (2015) 'Exendin-4 promotes endothelial barrier enhancement via PKA- and Epac1-dependent Rac1 activation', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*.
- Lieth, E. *et al.* (2001) 'Nitrogen shuttling between neurons and glial cells during glutamate synthesis', *Journal of Neurochemistry*.
- Lovshin, J. A. and Drucker, D. J. (2009) 'Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus', *Nature Reviews Endocrinology*.
- Ludwig, A. *et al.* (2002) 'Dipeptidyl peptidase IV (CD26) on T cells cleaves the CXC chemokine CXCL11 (I-TAC) and abolishes the stimulating but not the desensitizing potential of the chemokine.', *Journal of leukocyte biology*.
- Madeira, M. H. *et al.* (2015) 'Contribution of microglia-mediated neuroinflammation to retinal degenerative diseases', *Mediators of Inflammation*.
- Marques, C. *et al.* (2014) 'Sitagliptin prevents inflammation and apoptotic cell death in the kidney of type 2 diabetic animals', *Mediators of Inflammation*. doi: 10.1155/2014/538737.
- Mitic, L. L. and Anderson, J. M. (1998) 'Molecular Architecture of Tight Junctions', *Annual review of Physiology*.
- Miyamoto, K. *et al.* (1999) 'Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Mulvihill, E. E. and Drucker, D. J. (2014) 'Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors', *Endocrine Reviews*.
- Newman, D. K. (2010) 'Surgical management of the late complications of proliferative diabetic retinopathy', in *Eye*.
- Newman, E. A. (2003) 'New roles for astrocytes: Regulation of synaptic transmission', *Trends in Neurosciences*.
- Owu, D. U. *et al.* (2013) 'Comparative Effect of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus

- on Vascular Responses of Rat Thoracic Aorta to Potassium Ion Channel Openers', *British Journal of Medicine and Medical Research*, 3(3), pp. 748–759.
- Pala, L. *et al.* (2005) 'Vascular endothelial growth factor receptor-2 and low affinity VEGF binding sites on human glomerular endothelial cells: Biological effects and advanced glycosylation end products modulation', *Microvascular Research*.
- Provis, J. M. (2001) 'Development of the primate retinal vasculature', *Progress in Retinal and Eye Research*.
- Raufman, J. P. *et al.* (1992) 'Truncated glucagon-like peptide-1 interacts with exendin receptors on dispersed acini from Guinea pig pancreas: Identification of a mammalian analogue of the reptilian peptide exendin-4', *Journal of Biological Chemistry*.
- Reichenbach, A. *et al.* (2007) 'Müller cells as players in retinal degeneration and edema', *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*.
- Reimann, M. *et al.* (2009) 'An update on preventive and regenerative therapies in diabetes mellitus', *Pharmacology and Therapeutics*.
- Robertson GL (1995) 'Diabetes insipidus.', *Endocrinol Metab Clin North Am.*, pp. 549–72.
- Roep, B. O. (2003) 'The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: From cause to cure', *Diabetologia*.
- Romero-Aroca, P. *et al.* (2017) 'Differences in incidence of diabetic retinopathy between type 1 and 2 diabetes mellitus: A nine-year follow-up study', *British Journal of Ophthalmology*.
- Rungger-Brändle, E., Dosso, A. A. and Leuenberger, P. M. (2000) 'Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.
- Saishin, Y. *et al.* (2003) 'Inhibition of Protein Kinase C Decreases Prostaglandin-Induced Breakdown of the Blood-Retinal Barrier', *Journal of Cellular Physiology*.
- Salcedo, I. *et al.* (2012) 'Neuroprotective and neurotrophic actions of glucagon-like peptide-1: An emerging opportunity to treat neurodegenerative and cerebrovascular disorders', *British Journal of Pharmacology*.
- Santiago, A. R. *et al.* (2018) 'Sweet Stress: Coping With Vascular Dysfunction in Diabetic Retinopathy', *Frontiers in Physiology*, 9. doi: 10.3389/fphys.2018.00820.
- Sharma, R. K. *et al.* (2003) 'Development of the outer retina in the mouse', *Developmental Brain Research*.
- Simó, R. and Hernández, C. (2015) 'Novel approaches for treating diabetic retinopathy based on recent pathogenic evidence', *Progress in Retinal and Eye Research*.
- Simó, R. and Hernández, C. (2017) 'GLP-1R as a target for the treatment of diabetic

- retinopathy: Friend or foe?', *Diabetes*, 66(6), pp. 1453–1460.
- Sociedade Portuguesa de Diabetologia (2015) *Diabetes - Factos e Números - O ano de 2014. Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes - Edição de 2015, Observatório da Diabetes*.
- Stitt, A. W. *et al.* (2013) 'Advances in our understanding of diabetic retinopathy', *Clin Sci (Lond)*.
- Stitt, A. W. *et al.* (2016) 'The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy', *Progress in Retinal and Eye Research*.
- Ting, D. S. W., Cheung, G. C. M. and Wong, T. Y. (2015) 'Diabetic retinopathy: global prevalence, major risk factors, screening practices and public health challenges: a review', *Clinical & Experimental Ophthalmology*.
- Turner, R. (1998) 'Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34)', *Lancet*.
- Turner, R. *et al.* (1998) 'Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38', *Bmj*.
- Ussher, J. R. and Drucker, D. J. (2012) 'Cardiovascular biology of the incretin system', *Endocrine Reviews*.
- Vecino, E. *et al.* (2016) 'Glia-neuron interactions in the mammalian retina', *Progress in Retinal and Eye Research*.
- Virally, M. *et al.* (2007) 'Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives', *Diabetes & Metabolism*.
- Wang, M. *et al.* (2014) 'Macroglia-Microglia Interactions via TSPO Signaling Regulates Microglial Activation in the Mouse Retina', *Journal of Neuroscience*. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3153-13.2014.
- Weale, R. a. (1974) *The Vertebrate Retina. Principles of Structure and Function, The British journal of ophthalmology*.
- Wittchen, E. S., Haskins, J. and Stevenson, B. R. (1999) 'Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3', *Journal of Biological Chemistry*.
- World Health Organization (1999) *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, Geneva, WHO*.
- Zhang, X. *et al.* (2009) 'Vascular endothelial growth factor-A: A multifunctional molecular player in diabetic retinopathy', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*.
- Zhang, X. *et al.* (2013) 'Triamcinolone acetonide inhibits p38MAPK activation and neuronal apoptosis in early diabetic retinopathy', *Curr Mol Med*.

