

U. PORTO

FMUP FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2017/2018

Tiago Paulino Fonseca Torres

Doença de Stargardt e perspectivas terapêuticas.

Therapeutic perspectives of Stargardt disease.

março, 2018

FMUP

Tiago Paulino Fonseca Torres

Doença de Stargardt e perspectivas terapêuticas.

Therapeutic perspectives of Stargardt disease.

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Oftalmologia

Tipologia: Monografia

Trabalho efetuado sob a Orientação de:

Doutor Sérgio Paulo Estrela Silva

Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:

Revista da Sociedade Portuguesa de Oftalmologia (SPO)

março, 2018

Eu, **Tiago Paulino Fonseca Torres**, abaixo assinado, nº mecanográfico **201204452**, estudante do 6º ano do Ciclo de Estudos Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que **NÃO** incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20/03/2018

Assinatura conforme cartão de identificação:

Tiago Paulino Fonseca Torres

NOME

Tiago Paulino Fonseca Torres

NÚMERO DE ESTUDANTE

E-MAIL

201204452

tiagoptorres@gmail.com

DESIGNAÇÃO DA ÁREA DO PROJECTO

Medicina Clínica - Oftalmologia

TÍTULO MONOGRAFIA

Doença de Stargardt e perspectivas terapêuticas.

ORIENTADOR

Sérgio Paulo Estrela Silva

ASSINALE APENAS UMA DAS OPÇÕES:

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA MONOGRAFIA APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.	☒
É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA MONOGRAFIA (INDICAR, CASO TAL SEJA NECESSÁRIO, Nº MÁXIMO DE PÁGINAS, ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS, ETC.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.	☐
DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (INDICAR, CASO TAL SEJA NECESSÁRIO, Nº MÁXIMO DE PÁGINAS, ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS, ETC.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA MONOGRAFIA.	☐

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20/03/2018

Assinatura conforme cartão de identificação:

Tiago Paulino Fonseca Torres

Dedicatória

O autor agradece:

Em particular ao Dr. Sérgio Paulo Estrela Silva pela orientação e disponibilidade durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas, pela amizade que não será esquecida.

A toda a minha família, em especial aos meus pais, a quem tudo devo.
A viagem é feliz quando nada nos falta.

Resumo do Projeto:

A doença de Stargardt (STGD1) é a causa de distrofia macular hereditária mais comum, com uma maior incidência na população jovem. STGD1 é causada por uma mutação no gene ABCA4, que codifica uma proteína transportadora localizada nas células fotorreceptoras, responsável pela reciclagem de 11-*cis*-retinal e pela remoção de subprodutos tóxicos do ciclo visual. O defeito desta proteína transportadora leva à acumulação de metabolitos, principalmente sob a forma de lipofuscina, provocando as alterações morfológicas e funcionais na retina observadas no fenótipo característico da doença de Stargardt: em geral, há nas crianças e nos jovens adultos uma diminuição da acuidade visual central, bilateral e progressiva, causada pela perda de células fotorreceptoras especialmente na mácula. Não existe ainda um tratamento dirigido à doença de Stargardt, mas inúmeros avanços têm sido feitos no estudo de abordagens terapêuticas farmacológicas, genéticas e celulares. Este trabalho tem como objectivo apresentar e discutir as actuais perspectivas terapêuticas da doença de Stargardt, tal como a restrição de exposição à luz, restrição suplementar e inibição do transporte de vitamina A (com fenretinide e A1120), ALK-001, modulação do ciclo visual (emixustat e fomepizole), remofuscina, transferência génica por vectores virais e não virais, e terapêutica derivada de células estaminais.

Abstract:

Stargardt disease (STGD1) is the most common inherited macular dystrophy, found amongst children and young adults. It is caused by a mutation in the ABCA4 gene, which encodes a transporter protein that can be found on photoreceptor cells, that recycles 11-*cis*-retinal and removes toxic products of the visual cycle. A defect in this protein leads to the accumulation of lipofuscin and the characteristic morphological and functional retinal changes. Patients with STGD1 present with progressive decreased central visual acuity, usually bilaterally, caused by loss of (especially macular) photoreceptor cells. There is still no specific treatment for Stargardt disease, but innumerable advances have been made with pharmacological, genetic and cellular approaches. The purpose of this review is to present and discuss the current therapeutic perspectives of Stargardt disease, such as light-exposure restriction, vitamin A supplement restriction and transport inhibition (with fenretinide and A1120), ALK-001, visual cycle modulation (with emixustat and fomepizole), remofuscin, viral and non-viral gene transfer and stem-cell derived therapies.

Palavras-chave: doença de Stargardt; STGD1; distrofia macular; terapia gênica; terapia farmacológica; fenretinide; A1120; ALK-001; emixustat; fomepizole; remofuscina; células estaminais.

Introdução

A doença de Stargardt (STGD1, degeneração macular juvenil, *fundus flavimaculatus* ou distrofia macular com manchas (*flecks*) tipo 1) é a causa de distrofia macular hereditária mais comum, com uma prevalência entre 1:8000 e 1:10000 e uma incidência maior em crianças e adultos jovens.^{1, 2} Apesar de existir uma enorme heterogeneidade fenotípica, em geral os pacientes sofrem uma diminuição da acuidade visual central, bilateral e progressiva, causada pela perda de células fotorreceptoras na mácula.² Na verdade, a patologia tem início na mácula, com o envolvimento das regiões foveais e para-foveais, progredindo exteriormente para zonas mais periféricas da retina. Com o tempo, há degeneração dos fotorreceptores e do epitélio pigmentar da retina (EPR) que acompanha a diminuição da visão.³ Além da perda da visão central e presença de escotomas centrais, alguns pacientes também sofrem de menor acuidade visual noturna e discromatópsias, e os sintomas surgem tipicamente na infância ou em adultos jovens, piorando ao longo do tempo.³

Na maioria dos casos, a doença de Stargardt é causada por mutações no gene ABCA4 (ATP-binding cassette, subfamília A, membro 4), que se encontra no braço curto do cromossoma 1 (1p22.1), transmitido de modo autossômico recessivo, que leva à acumulação acelerada de lipofuscina no epitélio pigmentar da retina.⁴ Em muito menor frequência, a doença de Stargardt pode ser causada por mutações noutros genes: STGD3 é causada por uma mutação no gene ELOVL4, no cromossoma 6q14. A proteína ELOVL4 (expressa na retina, na pele e no cérebro) tem um papel na síntese de ácidos gordos de cadeia muito longa. A mutação neste gene leva à acumulação de agregados proteicos que podem interferir com as funções da retina e eventualmente levar à morte celular.⁵ STGD4 é causada por uma mutação no gene PROM1 no cromossoma 4. Ambas as doenças STGD3 e STGD4 são transmitidas de modo autossômico dominante.⁶ No entanto, neste trabalho o foco será discutir as características clínicas, imagiológicas e mais recentes intervenções na forma mais comum da doença de Stargardt, STGD1, e as possíveis abordagens terapêuticas que o estado da arte pode oferecer.

O gene ABCA4 codifica uma proteína transportadora localizada especificamente nos segmentos exteriores dos fotorreceptores (cones e bastonetes) da retina, que intervém na reciclagem do cromóforo 11-*cis*-retinal (para permitir a continuação da fototransdução) e na remoção de subprodutos do ciclo visual - a fototransdução leva à formação de substâncias potencialmente tóxicas que podem danificar as células

fotorreceptoras.⁴ No ciclo visual, o composto 11-*cis*-retinal combina com opsinas nos fotorreceptores, formando pigmentos visuais como a rodopsina. A activação da rodopsina através de fotões inicia os processos de transdução visual e liberta all-*trans*-retinal. A enzima desidrogenase RDH8 é responsável pela redução do all-*trans*-retinal em all-*trans*-retinol, que normalmente é transportado de volta ao RPE para reciclagem, gerando novamente 11-*cis*-retinal pronto a repetir o processo.⁷ No entanto, como o all-*trans*-retinal é lançado para um ambiente rico em fosfatidiletanolamina (PE), está sujeito reações com a amina primária de PE, formando adutos retinal-PE.⁸ O substrato mais provável do transportador ABCA4 é o composto *N*-retinilideno-PE, produto da reacção de all-*trans*-retinal com PE.⁷ Actuando como um *importer*, o ABCA4 hidroliza ATP com o seu domínio ATPase citoplasmático, para levar a molécula de *N*-retinilideno-PE do espaço intradiscal (nos segmentos externos dos fotorreceptores) para o citoplasma, permitindo que este conjugado seja hidrolizado e o all-*trans*-retinal possa ser reduzido.⁹

Assim, se não for removido das membranas dos fotorreceptores, *N*-retinilideno-PE pode ainda reagir com uma segunda molécula de all-*trans*-retinal para formar compostos que são capazes de danificar as estruturas retinianas, dos quais o mais estudado é o A2E.⁷ Os adutos bisretinoides altamente tóxicos como A2E formam pigmentos que compõem a lipofuscina, podendo acumular-se no RPE e levando à sua morte celular e concomitante degeneração dos fotorreceptores.³

Na doença de Stargardt, pensa-se que o defeito deste transportador ABCA4 e consequente acumulação de metabolitos tóxicos como A2E levam às alterações morfológicas e funcionais da retina, especialmente na mácula, responsáveis pelo fenótipo característico da patologia.⁴

As características genéticas da doença, a acumulação de produtos residuais do ciclo visual tóxicos para as estruturas da retina e a consequente existência de defeitos celulares abriram as portas ao estudo de diversas abordagens terapêuticas farmacológicas, genéticas e celulares discutidas neste trabalho, numa tentativa de finalmente encontrar uma cura para a doença de Stargardt.

Características clínicas e imagiológicas

Pacientes com doença de Stargardt costumam apresentar-se com perda de visão central bilateral e progressiva, principalmente com picos de incidência na infância, e no jovem adulto.² A característica clínica mais proeminente da doença de Stargardt é perda da acuidade visual central, com retinografia a revelar atrofia da mácula com manchas brancas-amareladas de lipofusina ao nível do EPR¹, apresentando também discromatopsia e escotomas centrais.

Há uma perda lenta e progressiva da função e estrutura da retina ao longo do tempo, variável entre e intra-famílias, sugerindo o papel de outros factores que influenciam o fenótipo da doença. Além disso, as marcadas variações clínicas de STGD1 parecem dever-se ao grande número (>1000) de variações de sequenciação do gene ABCA4.² O início da doença é mais frequente na infância, havendo também um segundo pico de incidência no jovem adulto e até um terceiro pico numa fase adulta mais tardia (com melhor prognóstico)². Há também cada vez mais evidência de que a idade de aparecimento da doença se correlaciona com a severidade da variante do ABCA4¹⁰:

- incidência na infância está associada a variações mais deletérias (*nonsense*)
- incidência no jovem adulto e incidência mais tardia, com fóvea poupada (*missense*)

Inicialmente, a oftalmoscopia pode mostrar apenas um fundo ocular normal ou anomalias retinianas moderadas (perda do 'reflexo foveal') ou distúrbios moderados do epitélio pigmentar da retina, com ou sem perda de visão. Assim, o diagnóstico pode ser atrasado se não se recorrer a outras técnicas imagiológicas: autofluorescência do fundo (FAF), tomografia de coerência óptica (OCT) e avaliação electrofisiológica (electro-retinografia (ERG) padrão, campo total ou multifocal).² Lois et al.¹¹ descreve uma classificação electrofisiológica dividida em três grupos:

- Grupo 1: ERG campo total normal, anormalidade no ERG padrão (disfunção macular);
- Grupo 2: há uma adicional perda generalizada de função dos cones;
- Grupo 3: há uma adicional perda generalizada de função de cones e bastonetes.

Estes grupos parecem ter implicações prognósticas², verificando-se que todos os pacientes com envolvimento inicial dos cones demonstraram deterioração eletrofisiológica clinicamente significativa; e apenas 20% dos pacientes com ERG de campo total normais demonstraram progressão clínica da disfunção.¹²

- Autofluorescência do fundo

Ao explorar as propriedades autofluorescentes da lipofuscina e metabolitos relacionados, FAF possibilita a avaliação da distribuição de lipofuscina no EPR *in vivo*. A imagiologia obtida com FAF consegue identificar mudanças no fundo ocular (manchas associadas à acumulação de lipofuscina e atrofia precoce) antes destas serem clinicamente evidentes na oftalmoscopia¹³, algo de enorme importância no contexto da doença de Stargardt, visto que há níveis anormais de lipofuscina. A técnica FAF consegue identificar prontamente na doença de Stargardt áreas de atrofia com diminuição do sinal de autofluorescência, associadas à morte de células do EPR, tal como consegue identificar áreas de acumulação excessiva de lipofuscina, com aumento do sinal de autofluorescência.¹⁴ Há o aspecto característico de maculopatia em olho-de-boi, com uma redução central de autofluorescência rodeada de um aumento de sinal, na FAF.²

É geralmente aceite que os padrões de autofluorescência de lipofuscina são importantes marcadores de doença.¹⁴

Recorrendo à técnica de autofluorescência *ultra wide-field* do fundo (UWF-FAF), um estudo retrospectivo (em Los Angeles, Instituto Oftalmológico Stein, na Universidade da Califórnia) examinou, de 2012 a 2016, pacientes com doença de Stargardt e implementou uma classificação consoante os padrões de autofluorescência:¹⁵

- tipo 1 consiste em lesões confinadas à mácula, sem achados periféricos.
- tipo 2 consiste em atrofia macular com alterações FAF (manchas periféricas).
- tipo 3 consiste em atrofia macular e periférica.

Estudou-se também a associação de FAF com a progressão da atrofia, e concluiu-se que o padrão de autofluorescência influencia a taxa de progressão das áreas atróficas ao longo do tempo.¹⁴

Além desta correlação, também se verificou que há associação entre os padrões de fluorescência e características genéticas: variantes de sequências mais leves (incluindo *missense*) encontradas com mais frequência no padrão tipo 1 de UWF-FAF e variantes mais deletórias (*nonsense*) no tipo 3.¹⁴

Correlacionaram-se ainda os achados na FAF com os resultados da ERG: dados sugerem que padrões UWF-FAF mais extensos (tipo 3) definidos anteriormente associam-se a disfunção mais severa descrita (até panretiniana) na ERG.¹⁴

Além disso, em futuros ensaios de células estaminais ou terapia génica na doença de Stargardt, particularmente com administração subretiniana, FAF pode ser uma modalidade de imagem importante que pode ajudar a seleccionar a localização óptima

para administração dos agentes terapêuticos, baseado na presença ou ausência de anormalidades de autofluorescência.

- Tomografia de coerência óptica

A tomografia de coerência óptica (OCT), nomeadamente a recente técnica SD-OCT (*spectral domain*) fornece imagens transversais de alta resolução da retina e consegue revelar precocemente as características *hallmark* da doença de Stargardt com início na infância e na idade adulta - isto é, a perda de camadas externas da retina, na fóvea: revela perda da arquitectura normal, começando na mácula central com alguma preservação macular periférica numa primeira instância. É de realçar que a alteração mais precoce detectada anteriormente ao desenvolvimento de atrofia é espessamento da membrana limitante externa, até em crianças com 5 anos de idade.^{2, 16}

É possível associar ao OCT um estudo das características angiográficas.¹⁷ Há também uma atrofia coriocalilar talvez como consequência da atrofia do EPR, sugerindo um papel do EPR na modulação da estrutura e função coriocalilar. Um estudo com 12 pacientes com doença de Stargardt avançada demonstrou que existe uma redução da densidade vascular do plexo capilar superficial, plexo capilar profundo e vasos coriocalilares, relacionado também com uma redução da espessura total da mácula e, especificamente, redução da espessura da membrana limitante interna.¹⁷ Foi possível estabelecer uma correlação significativa entre a densidade dos vasos e a (diminuída) densidade da mácula; embora não tenha sido possível estabelecer uma correlação entre a diminuição da função e os parâmetros anatómicos.¹⁷ Ainda não é claro se a redução da densidade vascular observada em doentes com doença de Stargardt é um factor causal da doença, ou se é secundária à atrofia da retina (a diminuição da densidade vascular pode estar relacionada com a modificação das concentrações de VEGF existentes, devido à degeneração do EPR). Ainda assim, a atrofia coriocalilar e a perda de EPR estão claramente relacionadas, e esta condição explica os baixos níveis detectados de hipocianescência na angiografia nas zonas de atrofia macular (apelidado de "atrofia escura"), características angiográficas que são detectadas em 92% dos doentes com doença de Stargardt e somente 12% dos doentes com atrofia macular ligada a idade (*age-related macular degeneration: AMD*).¹⁸

Terapêutica farmacológica

Na Doença de Stargardt, mutações no gene ABCA4 levam a uma ineficaz remoção de *N*-retinilideno-PE dos segmentos externos do fotorreceptor. Isto leva à acumulação de compostos bis-retinóides nos discos dos segmentos externos e, consequentemente, a níveis tóxicos de bis-retinoide A2PE, composto este que é hidrolisado a A2E, considerado um componente importante da lipofuscina. Esta acumulação resulta em disfunção e morte do EPR, com subsequente disfunção e perda das células fotorreceptoras. Assim, muitas terapias sob investigação têm como objectivo restringir a produção de A2E,³ das quais se pode incluir:

- Restrição de exposição à luz

Um início precoce de doença de Stargardt pode ser despoletada pela acumulação de aductos bis-retinóides do *all-trans*-retinal no segmento exterior da célula fotorreceptora, no EPR ou em ambos.¹⁹⁻²³

Os bis-retinóides podem danificar a retina porque são fotorreactivos e da sua degradação, na presença de luz e oxigénio, resultam aldeídos reactivos mais pequenos e carbonilos.²⁴

Como os carbonilos resultantes desta fotodegradação são capazes de fazer *cross-link* (reticulação) com proteínas, a foto-degradação dos bis-retinóides pode estar relacionada com as alterações associadas à idade na membrana de Bruch, sendo também evidente que proteínas modificadas por estes carbonilos são também detectadas nas drusas.²⁵

Este processo foto-oxidativo pode explicar, então, correlações com a exposição à luz em ambas as doenças STGD1 e AMD.²⁶⁻²⁸

Foi também demonstrado que a degeneração da retina em ratos ABCA4 KO foi acelerada com a exposição a luz UV,^{21, 29} daí ser recomendado aos pacientes STGD1 evitarem exposição excessiva a luz solar e usarem protecção ocular com bloqueio UVA/UVB. Um estudo demonstrou que o uso de lente de contacto protectora de cor preta durante 12 meses, num só olho enquanto acordados, em pacientes com STGD1 atrasa a progressão da doença em termos imagiológicos (FAF) quando comparado com o olho sem protecção.²⁸

No entanto, a dificuldade de aplicação prática desta medida preventiva é uma das suas limitações.

- Diminuição de Vitamina A no olho

Foi estudado que também uma ingestão de altas doses de vitamina A está associada a degeneração da retina em ratos ABCA4 KO,^{30, 31} pelo que a suplementação com vitamina A deve ser evitada em pacientes com mutações no gene ABCA4 ou outras distrofias retinianas ou maculares associadas com acumulação de lipofuscina no EPR.³¹ Assim, a intervenção terapêutica pode passar por reduzir o consumo de suplementação de vitamina A.

A restrição do consumo deve ser, no entanto, algo controlada pois a vitamina A é um composto envolvido na função imune, visual e reprodutiva, participando também em processos de comunicação celular.³²

A influência da vitamina A na função visual está relacionada com a sua importância como componente essencial para a funcionalidade da rodopsina e porque contribui para a normal diferenciação e funcionamento das membranas conjuntivas e da córnea.³²

A vitamina A está disponível na dieta humana principalmente sob duas formas: vitamina A pré-formada (retinol e retinil éster) - encontrada em laticínios, peixe e carne, especialmente fígado - e também sob a forma de carotenoides pró-vitamina A, dos quais o mais importante é o beta-caroteno.³³

Demonstrou-se então que uma suplementação exagerada de vitamina A e altas concentrações de vitamina A no olho estão associadas à degeneração da retina e progressão degenerativa em doentes com mutações no gene ABCA4, mas o mesmo não se verificou com doses altas de carotenoides. Estudos demonstraram que a suplementação com carotenoides inibiu quase por completo a formação e oxidação de A2E em modelos animais de codorniz-japonesa.³⁴

Em humanos, verificou-se que a concentração de A2E periférica no EPR e na coróide está inversamente correlacionada com a concentração de carotenoides na retina periférica. Estes pigmentos orgânicos, produzidos por plantas, algas, algumas bactérias e até fungos, são capazes de reduzir os níveis de A2E e lipofuscina, o que apoiaria a recomendação de consumo dietético de carotenoides em indivíduos em risco de degeneração macular.^{34, 35} No entanto, apesar de aparentemente a suplementação com nutrientes ricos em beta-caroteno, luteína e zeaxantina ser benéfica na protecção de tecidos retinianos, pelas suas propriedades antioxidantes,³⁶ não estão estabelecidas doses diárias recomendadas.

A utilização de inibidores que previnam o transporte da vitamina A para o olho também é uma opção terapêutica promissora. Entre os fármacos a serem estudados,

destacam-se o Fenretinide (*N*-(4-hydroxifenil)retinamida), antagonista da RBP4 (*retinol binding protein 4, plasma* - uma proteína transportadora específica para o transporte de retinol no sangue) derivado dos retinoides e o A1120 (2-(4-(2-(trifluorometil)fenil)piperidina-1-carboxamido)ácido benzóico), um antagonista da RBP4 não derivado de retinoides.⁴

- Fenretinide

O Fenretinide é um derivado sintético da vitamina A que compete com a vitamina A (retinol) no olho para se ligar à proteína transportadora RBP4. Esta ligação leva à formação de um complexo RBP-Fenretinide, que é eliminado por via renal e leva à redução dos níveis de RBP circulante e, conseqüentemente, a uma diminuição da concentração de vitamina A intraocular. A diminuição da presença de vitamina A no olho leva à desaceleração da biossíntese de A2E.³⁷⁻³⁹

Um estudo realizado em ratos com o modelo da doença de Stargardt (*knockout Abca4/-*) demonstrou que administração de fenretinide durante 28 dias reduziu os níveis circulantes de RBP-retinol de maneira dose-dependente, diminuindo também significativamente a produção de A2E intraocular.⁴⁰ De facto, a percentagem de redução de retinol sérico para cada dose total administrada de fenretinide era comparável à percentagem de redução de A2E obtida para aquela dose.⁴⁰ Este composto, fenretinide, tem vindo a ser usado nos últimos 20 anos como um agente quimiopreventivo em vários estudos clínicos de fase II/III de cancro, conduzidos em investigações multicêntricas com milhares de pacientes (entre os 35 e 70 anos) durante períodos de até 5 anos.^{41, 42}

Clinicamente, os investigadores encontraram nestes doentes níveis reduzidos de retinol sérico, RBP e adaptação lentificada ao escuro.^{41, 42} De facto, investigações subsequentes demonstraram que existe uma correlação significativa entre as reduções séricas de RBP-retinol e as manifestações de adaptação lentificada ao escuro.^{43, 44} Em ratos, fenretinide levou a uma marcada redução (aproximadamente 50%) dos retinoides do ciclo visual, redução essa que era equivalente à redução do retinol sérico para essa dose administrada de fenretinide.⁴⁰ Neste estudo, após submeter os ratos à adaptação ao escuro durante a noite, foram monitorizadas as taxa de regeneração de 11-*cis*-retinal e mobilização do cromóforo estimulado por fotões (*bleached*), all-*trans*-retinal. Os níveis de 11-*cis*-retinal *steady-state* foram 33% menores nos ratos tratados com fenretinide; no entanto não houve diferenças estatisticamente significativas na cinética de regeneração da rodopsina adaptada ao

escuro, após um *bleaching* de cerca de 50% desta rodopsina existente.⁴⁰ Esta lentificação do retorno da fotorresponsividade dos bastonetes é a única manifestação fisiológica encontrada em ratos tratados com fenretinide, sendo consistente com os achados bioquímicos que revelam níveis diminuídos de retinoides e cromóforos visuais nestes ratos.⁴⁰ Além disso, as análises electrofisiológicas e histológicas não demonstraram efeitos deletérios na retina do tratamento crónico com fenretinide.⁴⁰ Um outro estudo clínico em fase II, que avalia a eficácia do fenretinide no tratamento da atrofia geográfica em pacientes com AMD não exsudativa, demonstrou que o fenretinide reduziu significativamente o aumento das lesões de atrofia geográfica, tal como também reduziu significativamente a incidência de neovascularização coróideia neste grupo de doentes.³⁹

No entanto, é de realçar as preocupações existentes quanto ao perfil de segurança do fenretinide a longo prazo, visto que estudos demonstraram que este composto pode ser um potente indutor de apoptose no EPR,⁴⁵ estimulou a formação de hemangiossarcomas em ratos⁴⁶ e tem provavelmente propriedades teratogénicas.⁴⁷ Além disso, o efeito deste composto em áreas sem degeneração retiniana funcionalmente relevante continua a ser não elucidativo, podendo haver efeitos laterais importantes. Assim, o conhecimento científico actual aponta para a necessidade de investigação do potencial terapêutico e do perfil de segurança do fenretinide para a doença de Stargardt.⁴

- A1120

O outro inibidor promissor é o A1120, um composto não derivado de retinoides, antagonista de RBP4, a ser estudado para potencial tratamento da doença de Stargardt e AMD não exsudativa.⁴

Um estudo pré clínico em modelo de rato confirmou o mecanismo análogo ao fenretinide deste novo composto, sendo eficaz na redução dos níveis séricos de RBP4.⁴⁸ A administração de A1120 levou à redução em 75% de RBP4 sérica, que se correlacionou com a diminuição de retinoides do ciclo visual e níveis oculares de lipofuscina.⁴⁸ É sugerido que a administração de A1120 não induz alterações na cinética de adaptação ao escuro, visto que neste estudo não se observaram alterações estatisticamente significativas na cinética da recuperação da onde b (componente do electroretinograma mais comumente usado na análise clínica e experimental da função da retina humana) depois de *photobleaching* em ratos tratados com A1120.⁴⁸

Assim, o facto de a administração de A1120 ter inibido com sucesso a acumulação de A2E e outros bisretinoides, levando à diminuição de lipofuscinogénese, sem supressão apreciável da recuperação funcional dos bastonetes após exposição à luz (e sem os respectivos efeitos laterais: nictalopia e adaptação lentificada ao escuro) faz deste composto um promissor candidato à terapia da doença de Stargardt.⁴

- Vitamina A deuterada

Outro tipo de tratamento passa por administrar uma forma deuterada de vitamina A, que diminui a taxa de dimerização do *all-trans*-retinal, a formação de A2E e a génese de lipofuscina.³ ALK-001 é um exemplo deste tipo de molécula, sendo uma forma modificada da vitamina A em que três hidrogénios foram substituídos por átomos de deutério (hidrogénio pesado). Esta substituição faz com que ALK-001 consiga prevenir a dimerização da vitamina A (que se pensa que leva a degeneração da retina) em até cinco vezes, dentro de 4 semanas com dosagem diária.^{49, 50}

Esta molécula é única no sentido em que funciona como um substituto da vitamina A, mitigando a formação de bisretinoides sem privar os fotorreceptores retinianos da necessária vitamina A,³ não sendo assim considerado um composto modulador do ciclo visual.

Em estudos pré-clínicos,^{51, 52} ALK-001 reduziu as alterações caracteristicamente associadas à degeneração retiniana, tais como acumulação de lipofuscina, diminuição de amplitudes na electrorretinografia, adaptação lentificada ao escuro e patologia do EPR.

Há um ensaio clínico em fase 2 (Tolerability and Effects of ALK-001 on Stargardt Disease, TEASE) iniciado em 2015, que avalia a performance desta nova molécula, nomeadamente quanto à sua segurança a longo prazo e tolerabilidade. O estudo é duplo-cego, multicêntrico, contando com pacientes com doença de Stargardt entre os 12 e os 60 anos. Destes, foram seleccionados aleatoriamente 30 doentes para tomar ALK-001 e 20 para receber placebo diariamente durante um ano. Depois de um ano de tratamento, metade dos participantes que estão a receber placebo são aleatoriamente transferidos para o grupo que recebe ALK-001 durante os 12 meses seguintes, enquanto os restantes 10 continuam apenas com placebo. Os pacientes inicialmente tratados com ALK-001 continuam com este tratamento durante os 12 meses seguintes. O estudo está ainda a ser finalizado, mas não foram ainda descritos quaisquer relatos de efeitos laterais tais como nictalopia ou adaptação lentificada ao escuro.³

Espera-se que o perfil de segurança seja semelhante ao da vitamina A não deuterada,

portanto o ALK-001 poderá ser administrado com segurança a idosos e crianças, com o objectivo de atenuar a formação de bisretinoides o mais precocemente possível e até prevenir a degeneração retiniana e perda de visão na doença de Stargardt.³

- Inibidores directos do ciclo visual (moduladores)

A redução da biossíntese de cromóforo visual, 11-*cis*-retinal, pode ser um método eficaz para preservar a integridade da retina, na medida em que a acumulação excessiva de produtos tóxicos retinoides coloca um enorme stress nos tecidos retinianos. Têm vindo a ser desenvolvidos compostos que têm como alvo proteínas alvo do ciclo visual, e portanto são chamados de moduladores do ciclo visual.⁸

Emixustat

O primeiro exemplo de modulador do ciclo visual é o emixustat hidrocloreto (ACU-4429), uma molécula desenhada para inibir o ciclo visual e reduzir a acumulação de componentes tóxicos baseados em vitamina A, como os A2E. O emixustat exerce um bloqueio dose dependente e reversível da isomerase do ciclo visual (RPE65). Esta enzima RPE65 é responsável pela mobilização das *pools* de armazenamento de vitamina A (ésteres de all-*trans*-retinil), a partir dos quais produz o precursor do cromóforo visual, 11-*cis*-retinol (através de uma reacção de hidrólise e isomerização).⁸

A oxidação de 11-*cis*-retinol origina 11-*cis*-retinal, que é transferido do RPE para os segmentos exteriores dos cones e bastonetes, onde se combina com as opsinas apropriadas para originar pigmentos visuais sensíveis à luz. A activação por luz destes pigmentos liberta apo-opsina e all-*trans*-retinal. Em condições fisiológicas normais, all-*trans*-retinal é reduzido a all-*trans*-retinol e este composto é reciclado de volta ao EPR. No entanto, certas condições (defeitos genéticos, exposição intensa à luz) levam à acumulação transitória de all-*trans*-retinal nos fotorreceptores e a retina torna-se extremamente susceptível ao dano oxidativo.⁸

Pelas suas propriedades tóxicas,⁵³ pensa-se que o all-*trans*-retinal tem um papel importante no dano da retina causado pela luz. Estudos que mostraram que a depleção do 11-*cis*-retinal (por meios farmacológicos ou genéticos) está associada a protecção da retina contra dano mediado pela luz são consistentes com esta hipótese.^{54, 55}

De facto, foi demonstrado que o emixustat inibiu de forma potente a isomerase RPE65 in vitro e reduziu a produção de 11-*cis*-retinal em ratos após uma única dose oral,⁸

estando associado à eficaz prevenção da morte de fotorreceptores causada por exposição à luz intensa verificada neste estudo.

Em modelos de rato *Abca4*^{-/-} (modelo animal para lipofuscina excessiva e acumulação de A2E), o tratamento durante 3 meses com emixustat reduziu marcadamente os níveis de lipofuscina (verificado por auto-fluorescência) e os níveis de A2E em 60%.⁸ Para além deste método de acção, o emixustat distingue-se por ser um composto não retinoide (e portanto, não pode ser metabolizado em compostos retinoides e aparentemente não tem acção em receptores de ácidos retinoicos) e por demonstrar uma afinidade bastante selectiva para a isomerase RPE65.⁸

Além disso, tem biodisponibilidade oral e não foram detectados nenhuns efeitos adversos sistémicos,⁵⁶ para além dos esperados efeitos laterais oculares (supressão da sensibilidade dos bastonantes e adaptação lentificada ao escuro; efeitos laterais que derivam da redução do cromóforo visual), que foram dose-dependente e reversíveis geralmente passados 14 dias.⁵⁶

Já um estudo anterior⁵⁷ (com doentes saudáveis dos 55 aos 80 anos sujeitos aleatoriamente a doses progressivas de emixustat ou placebo) tinha mostrado o efeito dependente de dose do emixustat no ciclo visual e a sua capacidade de intervir na génese de A2E.

O tempo de semi-vida da molécula rondou as 4 e as 6 horas; mas o efeito registado em electroretinografia foi mais duradoura, daí que se sugira a posologia de uma dose diária deste fármaco, a ser administrado.⁵⁷

É referido ainda que as alterações à adaptação ao escuro encontradas (aquando administração de altas doses) eram esperadas, dado o mecanismo de acção desta molécula. No entanto, alguma discromatopsia foi também encontrada, quando os doentes foram sujeitos a altas doses do fármaco. Este fenómeno, segundo os autores, pode indicar a presença de alguns "efeitos colaterais" nos cones, visto que neste estudo a acção do emixustat foi limitada aos bastonetes (em electrorretinografias).⁵⁷

Estes achados encorajam a investigação desta molécula como promissora candidata à prevenção de stress dos fotorreceptores e preservação da retina, especialmente em doentes com doença de Stargardt.

Fomepizole

O fomepizole (4-metilpirazole) é um antídoto intravenoso para intoxicações por metanol e etileno glicol, capaz de inibir várias desidrogenases alcoólicas⁵⁸ e de inibir o ciclo visual em roedores.^{59, 60}

Esta inibição do ciclo visual ocorre pela inibição da RDH5, desidrogenase responsável pela oxidação do 11-*cis*-retinol para 11-*cis*-retinal no RPE,⁶¹ sem afectar a redução do

all-*trans*-retinal para all-*trans*-retinol no segmentos externos dos bastonetes (pela qual a enzima RDH8 é responsável).

Foi desenvolvido um estudo em que 9 voluntários se submeteram a doses semanais de fomepizole ou placebo durante 6 semanas.⁶² Os resultados foram desapontantes, e o fomepizole não parece ser um inibidor do ciclo visual suficientemente potente para ser considerado para tratamento clínico da doença de Stargardt. No entanto, estas conclusões baseiam-se apenas no facto de não ter sido encontrada a esperada resposta de atraso de adaptação ao escuro, tal como se verificou com outros inibidores do ciclo visual.⁶² É de considerar a hipótese de escalar a dose de fomepizole neste estudo, mas segundo os autores, alguns dos voluntários já estariam a experienciar possíveis efeitos laterais da medicação, ainda que moderados (enjoos e sabor metálico na boca).⁶²

Apesar destes resultados desencorajadores, são necessários mais estudos para explorar as possibilidades deste composto e avaliar mais *outcomes*, tal como um estudo de eficácia com o objectivo de medir os níveis de produção de A2E em modelos animais da doença de Stargardt após administração de fomepizole.

- Remoção de lipofuscina

Vários estudos descreveram moléculas que interferem com o mecanismo de formação de lipofuscina, sendo estes componentes válidos candidatos à investigação para tratamento e cura da Doença de Stargardt.

No entanto, até agora há apenas uma molécula descrita capaz de remover eficientemente a lipofuscina existente: a Remofuscina[®], um composto pertencente à classe dos tetrahidropirido-éteres.

Esta eficácia de remoção da lipofuscina das células do RPE já havia sido demonstrado num estudo em macacos após um ano de tratamento oral (24mg/kg/dia),⁶³ mas recentes estudos pré-clínicos já demonstraram a eficácia da Remofuscina em modelos de rato. Em ratos knockout ABCA4 -/- , verificou-se duas vezes mais redução de grânulos de lipofuscina após injeção intravítrea de Remofuscina, medido por microscopia de transmissão de electrões (TEM).⁶⁴ Nos ratos duplo-knockout ABCA4/- e RDH -/- , o tratamento com Remofuscina associou-se com um aumento da sobrevivência de fotorreceptores, após quatro semanas de uma injeção intravítrea única.⁶⁴

Assim, verificou-se que esta molécula é capaz de remover lipofuscina do EPR sem

induzir sinais de toxicidade (pelo menos, medida por ERG), conseguindo também resgatar células fotorreceptoras em ratos modelo de doença de Stargardt. Além disso, detectou-se que a acumulação da Remofuscina dá-se apenas e especificamente nos pigmentos do EPR,⁶⁴ tratando-se assim de um fármaco promissor para o tratamento da doença de Stargardt.

Terapia génica

A natureza monogénica de várias doenças oftalmológicas degenerativas, nas quais se inclui STGD1, torna-as candidatas ao tratamento com terapia génica. O objectivo deste tipo de tratamento para os pacientes com doença de Stargardt é a introdução de um gene ABCA4 funcional na retina que resulte em níveis sustentados e normais da proteína transportadora nos fotorreceptores, prevenindo assim a progressão da doença.

A terapia génica tem como alvo fotorreceptores viáveis, de modo a prevenir ou atrasar a degeneração retiniana.

Têm sido investigadas várias opções de vectores, nomeadamente novos tipos de vectores AAV, vectores lentivirus e vias não virais como nanopartículas DNA compactadas, DNA "naked" e lipossomas que encapsulam DNA.³ As vias de administração passam pela injeção intravítrea, na qual há entrega do vector para a cavidade vítrea, na proximidade das células ganglionares da retina; ou pela injeção subretiniana, em que o vector é entregue entre a camada fotorreceptora e o EPR. Quanto a esta última via de administração, ensaios clínicos têm demonstrado que a injeção subretiniana pode danificar a retina, especialmente os cones da mácula, e que obter distribuição de expressão génica suficiente para haver melhorias clínicas consegue ser desafiante.⁶⁵ No entanto, este modo de administração continua a ser utilizado e investigado, estando inclusive incluído nos ensaios clínicos com vectores de lentivirus.⁶⁶

- Transferência génica mediada por AAV e vectores duplos AAV

Entre todos os vectores disponíveis para terapia génica de doenças hereditárias da retina, aqueles baseados em vírus adeno-associados (AAV) são os mais promissores, dada a sua eficácia demonstrada em vários modelos animais e o seu excelente perfil de segurança em humanos.⁶⁷

Além disso, o AAV é particularmente adequado para a terapia génica, por ser não-patogénico, não imunogénico e episomal.

Tem havido sucesso na administração intra ocular de genes com a utilização de vectores AAV, nomeadamente em estudos com outros genes alvo de outras doenças oftalmológicas, como a Amaurose Congénita de Leber.^{68, 69}

Apesar da terapia por substituição génica ser uma estratégia lógica para o tratamento da doença de Stargardt, uma grande limitação passa pelo tamanho do cDNA ABCA4 (6.8kb).⁷⁰ Este tamanho é demasiado grande para os vectores AAV (adeno-associated virus) cuja capacidade máxima é aproximadamente 4.7 kb.⁶⁵ Assim, e apesar das existentes limitações, têm sido desenvolvidas tentativas de administração do gene ABCA4 através de vectores AAV, nomeadamente usando um vector AAV modificado do serótipo 5.⁶⁷

Os autores demonstraram que vectores de AAV5 incorporaram até 8.9 kb de genoma mais eficazmente do que outros 6 serotipos testados. A administração destes vectores codificando ABCA4 resultou na subsequente localização da proteína transportadora nos segmentos exteriores dos bastonetes, e também uma melhoria morfológica e funcional na retina de ratos *Abca4* -/-.⁶⁷

No entanto, este estudo foi algo controverso e os seus resultados não foram replicados, não se tendo conseguindo voltar a atingir a melhoria fenotípica observada neste estudo.

Houve estudos subsequentes, por grupos independentes, que concluíram que o estudo original teria na verdade administrado vectores AAV em que não havia expressão do ABCA4 intacto.⁷¹

Vários esforços têm sido realizados para contornar estes obstáculos e tirar partido das características dos vectores AAV para administrar genes, e assim foram desenvolvidos vectores duplos AAV (dual AAV vectors).⁷²

Esta abordagem consiste no uso de dois vectores AAV separados, cada um transportando a informação de metade de um gene. Após co-infecção da célula alvo por parte de ambos os vectores, as duas metades acabam por ser reconstituídas pela capacidade de concatemerização dos genomas de AAV.⁷²

Foi testada a capacidade destes vectores administrarem o gene ABCA4 e demonstrou-se que a entrega foi eficaz em fotorreceptores de ratos e porcos. O facto de, após administração do vector, se verificarem alterações fenotípicas benéficas em ratos *Abca4* -/- (reduzindo acumulação de lipofuscina) indica o potencial deste tipo de administração para a terapia génica na doença de Stargardt.⁷²

- Vector Lentivirus

Lentivírus são membros da família dos retrovirus, capazes de infectar células que se dividem e que não se estão a dividir, que têm a vantagem de uma maior capacidade de informação genómica (8 a 10 kb) quando comparados com os vectores AAV.⁷³

Em modelos animais, demonstrou-se que a administração sub-retiniana destes vectores contendo o gene ABCA4 reduziu a acumulação de A2E.⁷⁴ Também a toxicidade das células RPE e consequente degeneração retiniana foram diminuídas, levando a uma melhoria morfológica e funcional da retina após este tratamento em ratos *Abca4*^{-/-}.⁷⁴

Com base nestes achados, iniciou-se o primeiro ensaio clínico (ClinicalTrials.gov NCT01367444) baseado em terapia génica para o tratamento da doença de Stargardt. Recorreu-se ao uso de um fármaco baseado em lentivirus que transporta o gene ABCA4, sendo estes esforços o resultado de uma colaboração entre o Casey Eye Institute, Oregon Health and Science University e o National Eye Hospital of Quinze-Vingts (em Paris).⁶⁶

Este ensaio clínico conta com a injeção sub-retiniana directa, com dose única, de SAR422459 (previamente conhecido como StarGenTM, usando a tecnologia Oxford BioMedica's LentiVector®) e encontra-se em fase II, tendo como objectivo avaliar a segurança e tolerância deste fármaco, e como objectivo secundário avaliar a actividade biológica. O estudo conta com pacientes com doença de Stargardt durante um período de 52 semanas de seguimento por cada doente. No final do período do estudo, os pacientes são convidados a integrar um estudo de segurança open-label e em visitas follow-up (incluindo exames oftalmológicos e registo de efeitos adversos) durante até 15 anos. Até à data, não foram detectados quaisquer efeitos adversos sérios.⁶⁶

Um inconveniente da administração de genes utilizando lentivirus é a integração bastante diversa destes no genoma. Para além desta pequena aleatoriedade, o facto de os vectores de lentivirus integrarem o genoma das células apresenta a possibilidade de mutagénese.

De modo a contornar estes problemas, estão a ser investigadas a utilização de vectores de lentivirus não-integrantes⁷⁵ e também terapias de "*gene editing*" em vez da clássica terapia génica actual.⁷⁶

- Métodos de transferência génica não-viral

Recentemente, têm sido utilizadas nanopartículas compactadas de DNA (nanopartículas CK30PEG) para administração ocular de genes.⁷⁷ Estas nanopartículas têm a capacidade de compactar DNA (com tamanho até 20kb) em partículas de 8 nanómetros de diâmetro,⁷⁸ e não são tóxicas para o olho, mesmo após injeções repetidas, podendo levar à expressão génica em níveis comparáveis à administração com vectores AAV.⁷⁷

Para tirar partido desta tecnologia para o tratamento da doença de Stargardt, foram construídos vectores plasmídeos contendo o cDNA do gene ABCA4 e posteriormente, compactou-se em nanopartículas. Após administração subretiniana em ratos *Abca4*^{-/-} com estas nanopartículas, verificou-se expressão transgénica persistente durante 8 meses pós-injecção.⁷⁷

De facto, observou-se também uma significativa correcção funcional e estrutural dos fenótipos nos ratos tratados.⁷⁷

Um estudo comparativo foi realizado, comparando a utilização de vectores AAV com a utilização de nanopartículas.⁷⁷ Nesse estudo, demonstrou-se que as nanopartículas, para além de ter níveis de indução de expressão comparáveis às do AAV, não abandonam a estrutura ocular após injeção subretiniana.⁷⁷

Assim, tudo sugere que estas nanopartículas possam ser a solução para tratar várias doenças, particularmente aquelas associadas com grandes genes. No entanto, são ainda necessários estudos para maximizar a distribuição de expressão génica após administração das nanopartículas, tal como também é necessário investigar potenciais respostas imunes sistémicas às injeções subretinianas, embora actualmente tudo indica que a toxicidade sistémica destas nanopartículas seja mínima.⁶⁵

- "Gene editing"

O advento das técnicas de "*gene editing*" tornou possível a alteração dos genomas das células, permitindo a correcção de mutações genéticas em pacientes com doenças monogénicas. Esta abordagem utiliza nucleases e domínios de ligação ao DNA, tendo como alvo regiões específicas de DNA. Várias estratégias são possíveis, utilizando nucleases *zinc-finger* (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs) (ambas usando endonucleases para clivar o DNA) e tecnologia CRISPR, em que se utiliza um domínio de RNA e uma endonuclease Cas9.⁷⁶ "*Gene editing*" oferece várias vantagens em relação à clássica terapia génica, pois o

gene corrigido é inserido no locus do gene endógeno, permitindo controlo endógeno da transcrição também. Além disso, esta técnica causa modificação permanente do genoma, levando à expressão estável da proteína alvo desejada.⁷⁶ A tecnologia "*gene editing*" já foi utilizada com segurança no olho em modelos de rato e está a ser desenvolvido um ensaio clínico para "*gene editing*" do gene CEP290, envolvido na Amaurose Congénita de Leber (tipo 10),⁷⁹ e pode vir a ser utilizada na investigação e tratamento da doença de Stargardt, futuramente.

Além do seu papel *in vivo*, "*gene editing*" está intimamente ligado à utilização de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs) na medicina personalizada. Esta interação permite gerar "controles" de modelos de doenças e até reparação *ex vivo* de mutações génicas - na medicina regenerativa, isto possibilita a criação de transplantes autólogos livres de doença, a partir de iPSCs derivadas do paciente. "*Gene editing*" tem assim um papel importante no estudo de doenças oftalmológicas e desenvolvimento de novas terapias.⁷⁶

- Considerações cirúrgicas sobre administração de vectores

As actuais técnicas existentes de administração de vectores virais são a via intravítrea e subretiniana. Actualmente, ainda não foi possível utilizar vectores pela via intravítrea e obter com sucesso uma transdução celular fotorreceptora, em nenhum ensaio clínico para doenças hereditárias da retina.

Com a via subretiniana, os investigadores levantam a questão do trauma mecânico induzido pelo descolamento foveal após injeção, e quais as consequências para os fotorreceptores. De facto, foi relatado num ensaio clínico fase I/II de Amaurose Congénita de Leber (neste caso, LCA 2, associada a mutação RPE65) que, após injeções subfoveais, alguns pacientes perderam alguma acuidade visual e ocorreu até diminuição da retina, potencialmente devido ao trauma por descolamento foveal.⁸⁰ As zonas específicas da retina a serem tratadas, tal como a dosagem de vector viral utilizado e o modo de administração, têm um papel importante na restauração a longo prazo da função.

Terapia celular

A retina é um local bastante propício para a utilização de terapias baseadas em células, por várias razões.

Primeiro, porque as células transplantadas podem ser visualizadas directamente usando várias técnicas, avaliando a estrutura e função sem necessidade de biópsia. Segundo, o facto do espaço sub-retiniano num olho saudável ser um "santuário imunológico", com respostas imunes celulares e humorais bastante diminuídas,⁸¹

o que pode limitar a rejeição de células transplantadas, desde que a barreira hemato-retiniana se mantenha intacta.⁸²

Além disso, o tamanho e a arquitectura da retina permite que apenas um pequeno número de células seja transplantado para uma localização específica. É de realçar que o efeito terapêutico destas intervenções consegue ser medido através de várias modalidades não invasivas, como acuidade visual, teste de campos visuais, microperimetria, visão colorida, sensibilidade ao contraste, adaptação ao escuro e imagiologia autofluorescente.

- Transplante de células hESC-RPE

Uma vantagem adicional da retina comparativamente a outras localizações nervosas é a presença de uma camada não-sináptica na sua estrutura, nomeadamente o RPE, tornando esta camada um alvo menos desafiante para estudos iniciais de segurança e eficácia.⁸³

O epitélio pigmentar da retina consiste numa mono-camada de células epiteliais, polarizadas, não sinápticas, dispostas hexagonalmente e aderentes à membrana de Bruch.⁸⁴ A sua função passa por absorver luz dispersada, transporte dos nutrientes para os fotorreceptores (a partir dos coriocapilares), bem como eliminação de metabolitos da retina para os coriocapilares. Serve ainda de tampão iónico, é capaz de realizar fagocitose dos segmentos exteriores dos fotorreceptores, secreta factores de crescimento e citocinas e é responsável ainda pela regeneração do 11-*cis*-retinal.⁸⁴

Na doença de Stargardt, a disfunção nos fotorreceptores (consequente da mutação ABCA4) é seguida de morte celular dos próprios fotorreceptores e do EPR. Assim, substituição do RPE foi proposta como mais uma abordagem terapêutica. Há evidência de que a implantação de células do RPE consegue preservar fotorreceptores e prevenir o agravamento da visão, testado em modelos pré-clínicos de doenças oftalmológicas (degeneração macular, síndrome papilo-renal / síndrome renal coloboma, retinite pigmentosa).⁸⁵⁻⁸⁷

Para obter estas células de EPR, podemos recorrer a diferentes tipos de técnicas e linhagens celulares, nomeadamente células estaminais embrionárias humanas (hESC). Linhagens de hESC, pluripotentes, podem ser obtidas a partir de uma só célula a partir de embriões criados por fertilização *in vitro*, sem sacrificar o embrião.⁸⁸ Estas células EPR derivadas de hESC foram utilizadas pela primeira vez com sucesso, em transplantes derivados de células estaminais para doenças retinianas, num estudo publicado na *Lancet*.⁸⁹

Na verdade, trata-se de dois ensaios open-label em fase I/II em pacientes com doença de Stargardt e AMD seca, com o objectivo de testar a segurança e tolerância do transplante de células hESC-ERP e, secundariamente, a eficácia destas células transplantadas.⁸³ 9 pacientes foram admitidos para o ensaio clínico da doença de AMD e 9 pacientes (5 mulheres, 4 homens; idade média de 50 anos, desde os 20 aos 71 anos) no ensaio da doença de Stargardt. A localização exacta do transplante foi cuidadosamente escolhida à discrição do investigador, de modo a atingir áreas com EPR comprometido, mas ainda viável, e com fotorreceptores (confirmado por OCT e autofluorescência).⁸³ Foram seleccionadas 3 coortes para cada doença, sendo que cada uma destas coortes englobava 3 pacientes com doença de Stargardt (e outros 3 com AMD): a coorte 1 recebeu 50,000 células, a coorte 2 recebeu 100,000 células e a coorte 3 recebeu 150,000 células.

Recorreu-se ainda a imunossupressão sistémica uma semana antes do procedimento cirúrgico e continuou-se 3 meses após cirurgia. O período médio de follow-up foi de 22 meses.⁸³

Quanto ao objectivo primário de segurança, verificou-se que nenhum dos olhos observados demonstrou qualquer sinal de rejeição aguda de transplante (infiltração linfocítica, uveíte, edema macular cistóide...). Não se verificou sinais de hiperproliferação, formação de teratoma ou aparente desdiferenciação celular.⁸³ Os efeitos secundários, por outro lado, limitaram-se ao procedimento cirúrgico e à extensa imunossupressão sistémica. Houve um caso único de endoftalmite aguda pós operatória num doente com Stargardt, resolvido com antibioterapia. Outro paciente desenvolveu inflamação do vítreo, resolvendo espontaneamente e sem sequelas. Efeitos laterais mais graves, provavelmente devido à imunossupressão, foram infecções urinárias (num paciente), sintomas gastrointestinais (em vários) e dois doentes que desenvolveram carcinomas da pele, não-melanomas.⁸³ Quanto aos outcomes visuais, observaram-se potenciais indicadores de melhoria funcional em alguns doentes: aos 12 meses de follow-up, 3 doentes com Stargardt melhoraram na acuidade visual por pelo menos 15 letras, 3 permaneceram estáveis e 1 doente piorou na acuidade por mais de 10 letras.

Tentou-se também correlacionar a melhoria de função com alterações estruturais: 72% dos doentes desenvolveram um aumento de pigmentação subretiniana na periferia das zonas atroficas. Algumas destas áreas corresponderam a reconstituição ou aumento da espessura da camada de EPR no OCT, possivelmente sugestivo de um enxerto celular com sucesso.⁸³

No entanto, não podemos atribuir directamente estas alterações anatómicas ao efeito das células transplantadas, sem termos resultados de técnicas de imagem com maior resolução, microperimetria ou qualquer marcação específica das células transplantadas, sendo esta uma das limitações deste estudo. Ainda assim, os resultados de segurança e até melhoria da acuidade visual neste tipo de transplante parecem promissores, e futuros estudos clínicos podem passar por microperimetrias juntamente com OCT e autofluorescência para obtermos uma relação estrutura-função mais rigorosa.⁸³

Futuramente, a redução das doses de imunossupressão podem também ser alvo de estudo, sendo fulcral também recorrer a grupos controlo com 'falsas-cirurgias' para controlar o efeito placebo e o viés de examinador nos outcomes subjectivos da acuidade visual, por exemplo. Apesar destas lacunas, este primeiro transplante de tecido retiniano derivado de células estaminais humanas realizado com segurança abriu as portas ao estudo de eventuais tratamentos promissores na medicina regenerativa oftalmológica.

- Transplante monocamada EPR com membrana de Bruch artificial

Alternativamente ao transplante de células hESC-EPR, temos a opção de transferir uma monocamada de EPR cultivado numa membrana de Bruch artificial, em substrato de poliéster, de modo a determinar a necessidade (ou não) de amplificação biológica da membrana de Bruch aquando transplante de EPR.⁹⁰

Esta abordagem está a ser testada num ensaio clínico a decorrer (ClinicalTrials.gov: NCT01691261) em 10 pacientes com AMD exsudativa e com perda de visão rapidamente progressiva, com o objectivo de avaliar a incidência e severidade dos efeitos adversos e também a melhoria da acuidade visual. Para já, nenhuma intervenção ou ensaio clínico está a ser realizado para pacientes com doença de Stargardt.

Esta abordagem pode ter algumas vantagens, como uma maior garantia da polaridade das células e administração de EPR mais maduras; no entanto, o procedimento

cirúrgico pode ser mais desafiante pela necessidade de uma maior retinotomia, e há ainda as questões de segurança sobre o material sintético usado.⁹⁰

- iPSC

iPSC são células estaminais pluripotentes induzidas; são semelhantes a células estaminais embrionárias, mas resultam da desdiferenciação de células adultas somáticas (totalmente diferenciadas). Este processo permite a regressão novamente ao estado de célula estaminal e depois diferenciá-las nas linhagens celulares pretendidas.⁹¹

Teoricamente, este processo traz a vantagem ética de não ser necessário um dador humano de células estaminais embrionárias.

No entanto, este processo de transformação não é isento de riscos, visto que a biologia deste processo não é totalmente compreendida e que os factores de transcrição usados podem induzir características malignas nas células.⁹² Ainda não há registo de ensaios clínicos com sucesso nesta área, para doença de Stargardt ou outras, embora haja potencial terapêutico nesta abordagem.

- Transplante de fotorreceptores

Na doença de Stargardt, o defeito genético envolve uma disfunção da célula fotorreceptora, pelo que seria lógico o estudo de uma possível substituição deste tipo de células como uma abordagem terapêutica. O conceito de transplante de células fotorreceptoras pode ser intimidante, mas as barreiras biológicas que são necessárias ultrapassar são bastante menores quando comparamos com o transplante de qualquer outro tipo de neurónio. Isto porque, de facto, o fotorreceptor faz apenas uma conexão sináptica: o seu posicionamento na retina coloca-o em conexão com a célula horizontal ou bipolar apropriada que normalmente receberia e transmitiria o seu estímulo; logo, não há necessidade de grandes caminhos axonais a serem percorridos para fazer a conexão sináptica correcta.⁹⁰

Já há alguns estudos a examinar esta abordagem terapêutica, nomeadamente em ratos *rd*, que servem de modelo de degeneração retiniana semelhante à doença de Retinite Pigmentosa humana.⁹³

Inclusive, já foi testado o transplante de fotorreceptores para regenerar funcionalmente a retina de ratos modelo de Retinite Pigmentosa, que estava previamente sem camada nuclear externa pré-existente.⁹⁴

No entanto, até à data, ainda não se conclui nenhum transplante de fotorreceptores em humanos e nenhum estudo está a ser realizado no âmbito da doença de Stargardt, pelo que pode ser mais uma avenida terapêutica a ser explorada num futuro próximo.

Conclusão

A doença de Stargardt é uma distrofia macular com repercussões desde muito cedo na vida do paciente, levando principalmente à perda de acuidade visual central, mas também escotomas centrais, lentificação da adaptação ao escuro e até discromatopsia. As mutações no gene ABCA4 traduzem-se numa ineficaz remoção de resíduos do ciclo visual, nomeadamente *N*-retinilideno-PE, levando à acumulação de lipofuscina principalmente no epitélio pigmentar da retina, com consequente degeneração deste epitélio e morte celular dos fotorreceptores, especialmente na mácula.

Na fundoscopia de um paciente com STDG1, é possível detectar manchas amareladas correspondentes a aglomerados de lipofuscina, observando-se alterações pigmentares na mácula e peri-maculares. Com a progressão da doença, observa-se o característico padrão em "olho-de-boi". Recorrendo à técnica de autofluorescência de fundo, esta acumulação de lipofuscina e mesmo zonas de atrofia conseguem ser detectadas, por vezes antes de serem evidentes na oftalmoscopia. A perda de arquitectura celular normal consegue ser melhor visualizada recorrendo a técnicas de tomografia de coerência óptica. Podemos ainda medir as respostas eléctricas dos cones e dos bastonetes à luz, através da electrorretinografia.

Ainda não há nenhum tratamento específico para a doença de Stargardt, mas inúmeros avanços têm sido feitos no estudo de abordagens terapêuticas farmacológicas, genéticas e celulares.

A restrição à exposição de luz diminui o dano causado pelos compostos bis-retinoides acumulados, daí ser aconselhado o uso de óculos escuros para este efeito. Foi também demonstrado que altas doses suplementares de vitamina A podem levar a uma maior acumulação de lipofuscina e perda de visão, recomendando-se assim evitar suplementos de vitamina A. Com o mesmo propósito de diminuição de quantidades de vitamina A ocular, desenvolveram-se também inibidores como o

fenretinide e A1120. A utilização de vitamina A deuterada, como ALK-001, leva à mitigação da formação de lipofuscina - está em curso um ensaio clínico em fase II para estudar a tolerabilidade deste composto promissor, ainda sem quaisquer efeitos laterais major relatados.

Outra abordagem terapêutica é a modulação do ciclo visual através do bloqueio selectivo de certas enzimas envolvidas no processo, com compostos como emixustat (com resultados promissores) e fomepizole (com resultados iniciais pouco robustos, sendo necessária mais investigação).

A remoção de lipofuscina é também um alvo terapêutico lógico e actualmente a ser estudado, com utilização de compostos promissores como a Remofuscina.

A terapêutica genética tem como objectivo a transferência de genes ABCA4 funcionais para as células da retina do paciente, e conta com a utilização de vectores duplos de vírus adeno-associados e vectores lentivírus. Está em curso um ensaio clínico em fase II que conta com a injeção sub-retiniana directa, com dose única, de SAR422459 (previamente conhecido como StarGen), utilizando a tecnologia de vectores lentivírus, com resultados iniciais promissores e sem evidência de efeitos laterais major. A utilização de vectores não-virais como nanopartículas de DNA estão em desenvolvimento, podendo trazer vantagens em relação aos outros tipos de vectores. Apesar de ainda não aplicado a pacientes com doença de Stargardt, a edição de genes (*gene editing*) tem um papel cada vez mais importante na medicina regenerativa e personalizada, com aplicações importantes na utilização combinada com células estaminais pluripotentes induzidas.

A terapia com células estaminais tem como objectivo regenerar o epitélio pigmentar da retina dos pacientes, apostando-se no transplante de células do EPR derivadas de células estaminais embrionárias humanas (hESC-EPR). Está em curso um ensaio clínico de fase I/II para transplante subretiniano de células hESC-EPR, com resultados promissores e melhoria da visão em alguns dos pacientes. Os efeitos laterais verificados são largamente atribuíveis à imunossupressão e ao procedimento cirúrgico, havendo necessidade de um aperfeiçoamento destes factores, de ensaios randomizados numa escala maior e de uma melhor correlação entre a melhoria de função verificada e as alterações estruturais da retina pós-terapia. Apesar de ainda não aplicadas à doença de Stargardt, o transplante de uma monocamada de EPR com membrana de Bruch artificial, o transplante de células estaminais pluripotentes induzidas e o transplante de fotorreceptores são também

possíveis abordagens, com necessidade de serem investigadas. O desenvolvimento destas perspectivas terapêuticas e aperfeiçoamento das abordagens farmacológicas, genéticas e celulares podem finalmente tornar real o cenário de cura da doença de Stargardt e trazer uma maior qualidade de vida aos milhares de crianças e jovens adultos diagnosticados todos os anos com esta patologia intratável.

Bibliografia

1. Fujinami K, Zernant J, Chana RK, Wright GA, Tsunoda K, Ozawa Y, et al. Clinical and molecular characteristics of childhood-onset Stargardt disease. *Ophthalmology*. 2015;122(2):326-34.
2. Tanna P, Strauss RW, Fujinami K, Michaelides M. Stargardt disease: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. *The British journal of ophthalmology*. 2017;101(1):25-30.
3. Sears AE, Bernstein PS, Cideciyan AV, Hoyng C, Charbel Issa P, Palczewski K, et al. Towards Treatment of Stargardt Disease: Workshop Organized and Sponsored by the Foundation Fighting Blindness. *Translational vision science & technology*. 2017;6(5):6.
4. Lu LJ, Liu J, Adelman RA. Novel therapeutics for Stargardt disease. *Graefes's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2017;255(6):1057-62.
5. Agbaga MP, Brush RS, Mandal MN, Henry K, Elliott MH, Anderson RE. Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(35):12843-8.
6. Kim JM, Lee C, Lee GI, Kim NKD, Ki CS, Park WY, et al. Identification of the PROM1 Mutation p.R373C in a Korean Patient With Autosomal Dominant Stargardt-like Macular Dystrophy. *Annals of laboratory medicine*. 2017;37(6):536-9.
7. Tsybovsky Y, Molday RS, Palczewski K. The ATP-binding cassette transporter ABCA4: structural and functional properties and role in retinal disease. *Advances in experimental medicine and biology*. 2010;703:105-25.
8. Bavik C, Henry SH, Zhang Y, Mitts K, McGinn T, Budzynski E, et al. Visual Cycle Modulation as an Approach toward Preservation of Retinal Integrity. *PloS one*. 2015;10(5):e0124940.
9. Quazi F, Lenevich S, Molday RS. ABCA4 is an N-retinylidene-phosphatidylethanolamine and phosphatidylethanolamine importer. *Nature communications*. 2012;3:925.
10. Lambertus S, van Huet RA, Bax NM, Hoefsloot LH, Cremers FP, Boon CJ, et al. Early-onset stargardt disease: phenotypic and genotypic characteristics. *Ophthalmology*. 2015;122(2):335-44.
11. Lois N, Holder GE, Bunce C, Fitzke FW, Bird AC. Phenotypic subtypes of Stargardt macular dystrophy-fundus flavimaculatus. *Archives of ophthalmology*. 2001;119(3):359-69.
12. Fujinami K, Lois N, Davidson AE, Mackay DS, Hogg CR, Stone EM, et al. A longitudinal study of stargardt disease: clinical and electrophysiologic assessment, progression, and genotype correlations. *American journal of ophthalmology*. 2013;155(6):1075-88 e13.
13. Smith RT, Gomes NL, Barile G, Busuioc M, Lee N, Laine A. Lipofuscin and autofluorescence metrics in progressive STGD. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50(8):3907-14.

14. Kumar V. Insights into autofluorescence patterns in Stargardt macular dystrophy using ultra-wide-field imaging. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2017;255(10):1917-22.
15. Klufas MA, Tsui I, Sadda SR, Hosseini H, Schwartz SD. Ultrawidefield Autofluorescence in Abca4 Stargardt Disease. *Retina*. 2018;38(2):403-15.
16. Fujinami K, Singh R, Carroll J, Zernant J, Allikmets R, Michaelides M, et al. Fine central macular dots associated with childhood-onset Stargardt Disease. *Acta ophthalmologica*. 2014;92(2):e157-9.
17. Mastropasqua R, Toto L, Borrelli E, Di Antonio L, Mattei PA, Senatore A, et al. Optical Coherence Tomography Angiography Findings in Stargardt Disease. *PloS one*. 2017;12(2):e0170343.
18. Giani A, Pellegrini M, Carini E, Peroglio Deiro A, Bottoni F, Staurenghi G. The dark atrophy with indocyanine green angiography in Stargardt disease. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012;53(7):3999-4004.
19. Reinboth JJ, Gautschi K, Munz K, Eldred GE, Reme CE. Lipofuscin in the retina: quantitative assay for an unprecedented autofluorescent compound (pyridinium bis-retinoid, A2-E) of ocular age pigment. *Experimental eye research*. 1997;65(5):639-43.
20. Cideciyan AV, Aleman TS, Swider M, Schwartz SB, Steinberg JD, Brucker AJ, et al. Mutations in ABCA4 result in accumulation of lipofuscin before slowing of the retinoid cycle: a reappraisal of the human disease sequence. *Human molecular genetics*. 2004;13(5):525-34.
21. Chen Y, Okano K, Maeda T, Chauhan V, Golczak M, Maeda A, et al. Mechanism of all-trans-retinal toxicity with implications for stargardt disease and age-related macular degeneration. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(7):5059-69.
22. Boyer NP, Higbee D, Currin MB, Blakeley LR, Chen C, Ablonczy Z, et al. Lipofuscin and N-retinylidene-N-retinylethanolamine (A2E) accumulate in retinal pigment epithelium in absence of light exposure: their origin is 11-cis-retinal. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(26):22276-86.
23. Zhang N, Tsybovsky Y, Kolesnikov AV, Rozanowska M, Swider M, Schwartz SB, et al. Protein misfolding and the pathogenesis of ABCA4-associated retinal degenerations. *Human molecular genetics*. 2015;24(11):3220-37.
24. Ueda K, Zhao J, Kim HJ, Sparrow JR. Photodegradation of retinal bisretinoids in mouse models and implications for macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(25):6904-9.
25. Duncker T, Marsiglia M, Lee W, Zernant J, Tsang SH, Allikmets R, et al. Correlations among near-infrared and short-wavelength autofluorescence and spectral-domain optical coherence tomography in recessive Stargardt disease. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2014;55(12):8134-43.
26. West SK, Rosenthal FS, Bressler NM, Bressler SB, Munoz B, Fine SL, et al. Exposure to sunlight and other risk factors for age-related macular degeneration. *Archives of ophthalmology*. 1989;107(6):875-9.
27. Sui GY, Liu GC, Liu GY, Gao YY, Deng Y, Wang WY, et al. Is sunlight exposure a risk factor for age-related macular degeneration? A systematic review and meta-analysis. *The British journal of ophthalmology*. 2013;97(4):389-94.
28. Teussink MM, Lee MD, Smith RT, van Huet RA, Klaver CC, Klevering BJ, et al. The effect of light deprivation in patients with Stargardt disease. *American journal of ophthalmology*. 2015;159(5):964-72 e2.
29. Radu RA, Mata NL, Bagla A, Travis GH. Light exposure stimulates formation of A2E oxiranes in a mouse model of Stargardt's macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(16):5928-33.

30. Sparrow JR, Gregory-Roberts E, Yamamoto K, Blonska A, Ghosh SK, Ueda K, et al. The bisretinoids of retinal pigment epithelium. *Progress in retinal and eye research*. 2012;31(2):121-35.
31. Radu RA, Yuan Q, Hu J, Peng JH, Lloyd M, Nusinowitz S, et al. Accelerated accumulation of lipofuscin pigments in the RPE of a mouse model for ABCA4-mediated retinal dystrophies following Vitamin A supplementation. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008;49(9):3821-9.
32. Mayo-Wilson E, Imdad A, Herzer K, Yakoob MY, Bhutta ZA. Vitamin A supplements for preventing mortality, illness, and blindness in children aged under 5: systematic review and meta-analysis. *Bmj*. 2011;343:d5094.
33. Tanumihardjo SA. Vitamin A: biomarkers of nutrition for development. *The American journal of clinical nutrition*. 2011;94(2):658S-65S.
34. Bhosale P, Serban B, Bernstein PS. Retinal carotenoids can attenuate formation of A2E in the retinal pigment epithelium. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2009;483(2):175-81.
35. Wu Y, Fishkin NE, Pande A, Pande J, Sparrow JR. Novel lipofuscin bisretinoids prominent in human retina and in a model of recessive Stargardt disease. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(30):20155-66.
36. Mozaffarieh M, Sacu S, Wedrich A. The role of the carotenoids, lutein and zeaxanthin, in protecting against age-related macular degeneration: a review based on controversial evidence. *Nutrition journal*. 2003;2:20.
37. Berni R, Formelli F. In vitro interaction of fenretinide with plasma retinol-binding protein and its functional consequences. *FEBS letters*. 1992;308(1):43-5.
38. Malpeli G, Folli C, Berni R. Retinoid binding to retinol-binding protein and the interference with the interaction with transthyretin. *Biochimica et biophysica acta*. 1996;1294(1):48-54.
39. Mata NL, Lichter JB, Vogel R, Han Y, Bui TV, Singerman LJ. Investigation of oral fenretinide for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Retina*. 2013;33(3):498-507.
40. Radu RA, Han Y, Bui TV, Nusinowitz S, Bok D, Lichter J, et al. Reductions in serum vitamin A arrest accumulation of toxic retinal fluorophores: a potential therapy for treatment of lipofuscin-based retinal diseases. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2005;46(12):4393-401.
41. Formelli F, Carsana R, Costa A, Buranelli F, Campa T, Dossena G, et al. Plasma retinol level reduction by the synthetic retinoid fenretinide: a one year follow-up study of breast cancer patients. *Cancer research*. 1989;49(21):6149-52.
42. Formelli F, Clerici M, Campa T, Di Mauro MG, Magni A, Mascotti G, et al. Five-year administration of fenretinide: pharmacokinetics and effects on plasma retinol concentrations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1993;11(10):2036-42.
43. Caruso RC, Zujewski J, Iwata F, Podgor MJ, Conley BA, Ayres LM, et al. Effects of fenretinide (4-HPR) on dark adaptation. *Archives of ophthalmology*. 1998;116(6):759-63.
44. Mariani L, Formelli F, De Palo G, Manzari A, Camerini T, Campa T, et al. Chemoprevention of breast cancer with fenretinide (4-HPR): study of long-term visual and ophthalmologic tolerability. *Tumori*. 1996;82(5):444-9.
45. Samuel W, Kutty RK, Nagineni S, Vijayasarathy C, Chandraratna RA, Wiggert B. N-(4-hydroxyphenyl)retinamide induces apoptosis in human retinal pigment epithelial cells: retinoic acid receptors regulate apoptosis, reactive oxygen species generation, and the expression of heme oxygenase-1 and Gadd153. *Journal of cellular physiology*. 2006;209(3):854-65.
46. Cohen SM, Storer RD, Criswell KA, Doerrer NG, Dellarco VL, Pegg DG, et al. Hemangiosarcoma in rodents: mode-of-action evaluation and human relevance. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2009;111(1):4-18.

47. Decensi A, Zanardi S, Argusti A, Bonanni B, Costa A, Veronesi U. Fenretinide and risk reduction of second breast cancer. *Nature clinical practice Oncology*. 2007;4(2):64-5.
48. Dobri N, Qin Q, Kong J, Yamamoto K, Liu Z, Moiseyev G, et al. A1120, a nonretinoid RBP4 antagonist, inhibits formation of cytotoxic bisretinoids in the animal model of enhanced retinal lipofuscinogenesis. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013;54(1):85-95.
49. Kaufman Y, Ma L, Washington I. Deuterium enrichment of vitamin A at the C20 position slows the formation of detrimental vitamin A dimers in wild-type rodents. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(10):7958-65.
50. Mihai DM, Jiang H, Blaner WS, Romanov A, Washington I. The retina rapidly incorporates ingested C20-D(3)-vitamin A in a swine model. *Molecular vision*. 2013;19:1677-83.
51. Charbel Issa P, Barnard AR, Herrmann P, Washington I, MacLaren RE. Rescue of the Stargardt phenotype in Abca4 knockout mice through inhibition of vitamin A dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(27):8415-20.
52. Ma L, Kaufman Y, Zhang J, Washington I. C20-D3-vitamin A slows lipofuscin accumulation and electrophysiological retinal degeneration in a mouse model of Stargardt disease. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(10):7966-74.
53. Rozanowska M, Sarna T. Light-induced damage to the retina: role of rhodopsin chromophore revisited. *Photochemistry and photobiology*. 2005;81(6):1305-30.
54. Maeda A, Maeda T, Golczak M, Imanishi Y, Leahy P, Kubota R, et al. Effects of potent inhibitors of the retinoid cycle on visual function and photoreceptor protection from light damage in mice. *Molecular pharmacology*. 2006;70(4):1220-9.
55. Organisciak DT, Vaughan DK. Retinal light damage: mechanisms and protection. *Progress in retinal and eye research*. 2010;29(2):113-34.
56. Dugel PU, Novack RL, Csaky KG, Richmond PP, Birch DG, Kubota R. Phase ii, randomized, placebo-controlled, 90-day study of emixustat hydrochloride in geographic atrophy associated with dry age-related macular degeneration. *Retina*. 2015;35(6):1173-83.
57. Kubota R, Boman NL, David R, Mallikaarjun S, Patil S, Birch D. Safety and effect on rod function of ACU-4429, a novel small-molecule visual cycle modulator. *Retina*. 2012;32(1):183-8.
58. Mycyk MB, Leikin JB. Antidote review: fomepizole for methanol poisoning. *American journal of therapeutics*. 2003;10(1):68-70.
59. Bernstein PS, Rando RR. In vivo isomerization of all-trans- to 11-cis-retinoids in the eye occurs at the alcohol oxidation state. *Biochemistry*. 1986;25(21):6473-8.
60. Raskin NH, Sligar KP, Steinberg RH. A pathophysiologic role for alcohol dehydrogenase: is retinol its "natural" substrate? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1976;273:317-27.
61. Duester G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *European journal of biochemistry*. 2000;267(14):4315-24.
62. Jurgensmeier C, Bhosale P, Bernstein PS. Evaluation of 4-methylpyrazole as a potential therapeutic dark adaptation inhibitor. *Current eye research*. 2007;32(10):911-5.
63. Julien S, Schraermeyer U. Lipofuscin can be eliminated from the retinal pigment epithelium of monkeys. *Neurobiology of aging*. 2012;33(10):2390-7.
64. Fang Y, Tschulakow A, Tikhonovich M, Taubitz T, Illing B, Schultheiss S, et al. Preclinical results of a new pharmacological therapy approach for Stargardt disease and dry age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2017;58(8):256-.
65. Han Z, Conley SM, Naash MI. Gene therapy for Stargardt disease associated with ABCA4 gene. *Advances in experimental medicine and biology*. 2014;801:719-24.
66. Dalkara D, Goureau O, Marazova K, Sahel JA. Let There Be Light: Gene and Cell Therapy for Blindness. *Human gene therapy*. 2016;27(2):134-47.

67. Allocca M, Doria M, Petrillo M, Colella P, Garcia-Hoyos M, Gibbs D, et al. Serotype-dependent packaging of large genes in adeno-associated viral vectors results in effective gene delivery in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(5):1955-64.
68. Cideciyan AV, Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Schwartz SB, Boye SL, et al. Vision 1 year after gene therapy for Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine*. 2009;361(7):725-7.
69. Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine*. 2008;358(21):2231-9.
70. Azarian SM, Megarity CF, Weng J, Horvath DH, Travis GH. The human photoreceptor rim protein gene (ABCR): genomic structure and primer set information for mutation analysis. *Human genetics*. 1998;102(6):699-705.
71. Hirsch ML, Agbandje-McKenna M, Samulski RJ. Little vector, big gene transduction: fragmented genome reassembly of adeno-associated virus. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2010;18(1):6-8.
72. Trapani I. Dual AAV Vectors for Stargardt Disease. *Methods in molecular biology*. 2018;1715:153-75.
73. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature reviews Genetics*. 2003;4(5):346-58.
74. Kong J, Kim SR, Binley K, Pata I, Doi K, Mannik J, et al. Correction of the disease phenotype in the mouse model of Stargardt disease by lentiviral gene therapy. *Gene therapy*. 2008;15(19):1311-20.
75. Sarkis C, Philippe S, Mallet J, Serguera C. Non-integrating lentiviral vectors. *Current gene therapy*. 2008;8(6):430-7.
76. Chuang K, Fields MA, Del Priore LV. Potential of Gene Editing and Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) in Treatment of Retinal Diseases. *The Yale journal of biology and medicine*. 2017;90(4):635-42.
77. Han Z, Koirala A, Makkia R, Cooper MJ, Naash MI. Direct gene transfer with compacted DNA nanoparticles in retinal pigment epithelial cells: expression, repeat delivery and lack of toxicity. *Nanomedicine*. 2012;7(4):521-39.
78. Fink TL, Klepcyk PJ, Oette SM, Gedeon CR, Hyatt SL, Kowalczyk TH, et al. Plasmid size up to 20 kbp does not limit effective in vivo lung gene transfer using compacted DNA nanoparticles. *Gene therapy*. 2006;13(13):1048-51.
79. Ruan GX, Barry E, Yu D, Lukason M, Cheng SH, Scaria A. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing as a Therapeutic Approach for Leber Congenital Amaurosis 10. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2017;25(2):331-41.
80. Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, Heon E, Schwartz SB, Roman AJ, et al. Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Archives of ophthalmology*. 2012;130(1):9-24.
81. Wenkel H, Streilein JW. Analysis of immune deviation elicited by antigens injected into the subretinal space. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1998;39(10):1823-34.
82. Hambricht D, Park KY, Brooks M, McKay R, Swaroop A, Nasonkin IO. Long-term survival and differentiation of retinal neurons derived from human embryonic stem cell lines in un-immunosuppressed mouse retina. *Molecular vision*. 2012;18:920-36.
83. Schwartz SD, Tan G, Hosseini H, Nagiel A. Subretinal Transplantation of Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium for the Treatment of Macular Degeneration: An Assessment at 4 Years. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016;57(5):ORSFc1-9.
84. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews*. 2005;85(3):845-81.
85. Lu B, Malcuit C, Wang S, Girman S, Francis P, Lemieux L, et al. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem cells*. 2009;27(9):2126-35.

86. Lund RD, Wang S, Klimanskaya I, Holmes T, Ramos-Kelsey R, Lu B, et al. Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats. *Cloning and stem cells*. 2006;8(3):189-99.
87. Li Y, Tsai YT, Hsu CW, Erol D, Yang J, Wu WH, et al. Long-term safety and efficacy of human-induced pluripotent stem cell (iPS) grafts in a preclinical model of retinitis pigmentosa. *Molecular medicine*. 2012;18:1312-9.
88. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7.
89. Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, Elliott D, Rosenfeld PJ, Gregori NZ, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet*. 2015;385(9967):509-16.
90. MacLaren RE, Bennett J, Schwartz SD. Gene Therapy and Stem Cell Transplantation in Retinal Disease: The New Frontier. *Ophthalmology*. 2016;123(10S):S98-S106.
91. MacLaren RE, Uppal GS, Balaggan KS, Tufail A, Munro PM, Milliken AB, et al. Autologous transplantation of the retinal pigment epithelium and choroid in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2007;114(3):561-70.
92. Cramer AO, MacLaren RE. Translating induced pluripotent stem cells from bench to bedside: application to retinal diseases. *Current gene therapy*. 2013;13(2):139-51.
93. Radtke ND, Aramant RB, Petry HM, Green PT, Pidwell DJ, Seiler MJ. Vision improvement in retinal degeneration patients by implantation of retina together with retinal pigment epithelium. *American journal of ophthalmology*. 2008;146(2):172-82.
94. Singh MS, Charbel Issa P, Butler R, Martin C, Lipinski DM, Sekaran S, et al. Reversal of end-stage retinal degeneration and restoration of visual function by photoreceptor transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(3):1101-6.

Anexo - Normas da Revista da Sociedade Portuguesa de Oftalmologia (SPO)

Informação geral

A revista da Sociedade Portuguesa de Oftalmologia é uma revista em open access que publica de forma prioritária artigos de investigação básica e clínica, como artigos de revisão, artigos originais, casos clínicos, relacionados com Oftalmologia nas suas diferentes especialidades, bem como temas de áreas de conhecimento fronteira com interesse para a prática médico-cirúrgica e processo clínico na perspectiva da governação clínica em Oftalmologia.

O rigor e a exatidão dos conteúdos, assim como as opiniões expressas são da exclusiva responsabilidade dos Autores.

Processo editorial

1. Condições gerais – Os artigos devem ser preferencialmente redigidos em Português ou Inglês, sendo desejável que progressivamente sejam em Ing. Será dada sempre preferência de publicação aos artigos submetidos simultaneamente em Português e Inglês. Poderão ser publicados artigos numa outra língua (espanhol ou francês), sendo que estes tem de ser obrigatoriamente submetidos também em Inglês.

Os manuscritos depois de rececionados são encaminhados para o editor da revista, que fará uma primeira avaliação editorial com o fim de comprovar a sua adequação (no âmbito temático e de interesse para a revista) e o cumprimento dos requisitos de apresentação formal exigidos nas normas de publicação. Desta apreciação resulta a aceitação para revisão por pares ou a sua devolução ao autor para correção e nova submissão.

Os manuscritos devem ser submetidos em ficheiros de texto em formato Word (.DOC ou .DOCX), com texto seguido e sempre com o mesmo tipo de letra. Os textos devem ser formatados em letra “Arial”, tamanho 11 com espaçamento de 1,5 linhas. Os títulos e sub-títulos deverão estar assinalados a negrito e em tamanho 12. A primeira página (página de rosto) deve conter somente os elementos descritos adiante na rubrica “Organização do Artigo”.

Os documentos submetidos para publicação serão propriedade da revista Oftalmologia da SPO transferindo os seus autores o direito de propriedade (copyright) a partir do momento que são aceites para publicação. Não serão aceites artigos simultaneamente submetidos noutras publicações científicas.

Os trabalhos devem ser submetidos em formato electrónico, na plataforma da revista da SPO, acessível a partir do site da SPO : <http://www.spoftalmologia.pt> ou da plataforma da revista “Oftalmologia” no serviço de alojamento de revistas científicas do

Repositório Científico de Acesso Aberto de Portugal (RCAAP):
revistas.rcaap.pt/index.php/ofthalmologia .

2.– Uma vez aprovado pelo editor o manuscrito será enviado para revisão por parte de dois ou mais revisores, de forma confidencial e anónima. Os autores receberão a informação da avaliação dos revisores através do editor, sendo-lhes solicitadas as correções oportunas e consequente re-submissão. A seleção dos revisores realiza-se através do conselho redatorial da revista, tendo em conta os méritos académicos, científicos e experiência profissional, em cada uma das subespecialidades oftalmológicas, incluindo investigadores nacionais ou internacionais. Cada artigo será obrigatoriamente revisto por um membro do conselho redatorial e por um revisor externo ao mesmo.

3. Política editorial – a decisão do editor, após consultados os revisores, para aceitação-rejeição de um trabalho submetido baseia-se nos seguintes fatores:

I. Originalidade: assunto e/ou método original, com informação valiosa e apresentação de resultados novos ou confirmação de resultados já anteriormente verificados.

II. Atualidade e/ou novidade – tema que está na agenda das reuniões ou comunicações científicas ou é novo.

III. Relevância – aplicabilidade dos resultados para a resolução de problemas concretos da prática oftalmológica.

IV. Inovação e significância – avanço do conhecimento científico, técnico e/ou prática clínica.

V. Fiabilidade e validade científica – boa qualidade metodológica evidenciada.

VI. Apresentação – boa redação e organização do texto (boa coerência lógica e apresentação do material).

VII. Prazo de resposta as revisões – Todos os artigos que não tenham uma resposta às decisões editoriais num prazo de 6 meses serão automaticamente rejeitados pelo editor

Secções

1. Editoriais e notas - Os editoriais e notas editoriais serão ou encomendados pelo editor da revista a quem considere oportuno ou da sua responsabilidade.

2. Cartas ao editor - Esta secção pode incluir comentários sobre artigos previamente publicados ou comentários sobre outras matérias de interesse científico para oftalmologia. Esta correspondência estará sujeita ao processo de revisão pelos pares e será publicada na medida em que o espaço, as prioridades e interesse o permitam. Estas não devem ultrapassar as 500 palavras. As cartas ao editor que versem sobre artigos previamente publicados terão direito de resposta, preferencialmente no mesmo número.

3. Artigos de revisão e “guidelines” – O objetivo da secção é atualizar determinados temas de oftalmologia, discutir novos conceitos ou rever conceitos clássicos tendo em vista os novos avanços de diagnóstico e tratamento e a divulgação das boas práticas em oftalmologia. Serão solicitados pelo Editor / Conselho Redatorial a personalidades reconhecidas e ou grupos de trabalho. Para além das revisões por convite, os artigos de revisão podem ainda ser submetidos por autores com elevada experiência numa área de estudo da oftalmologia para serem submetidos ao processo editorial.

4. Artigos originais – Podem incluir-se tanto trabalhos experimentais como clínicos, sempre que se trate de trabalhos de investigação. Os trabalhos de investigação devem ser inéditos e não podem ter sido submetidos para publicação em outra revista estrangeira indexada. Incluem-se nesta rubrica os prémios atribuídos no âmbito da SPO.

5. Comunicações curtas e casos clínicos – Deverão ser manuscritos resumidos descrevendo inovações técnicas e tecnológicas, manobras cirúrgicas inovadoras, aspectos de outras áreas do conhecimento relacionados com a prática oftalmológica, bem como casos clínicos com informação de prática clínica relevante.

6. Histórias da História da Oftalmologia Portuguesa – Será uma rubrica curta realçando aspectos relacionados com personalidades ou acontecimentos da oftalmologia portuguesa.

7. Flash-look. Nesta rubrica agrupam-se artigos curtos de atualização em conceitos básicos da prática clínica de oftalmologia, como classificação, opções terapêuticas, manuais de procedimentos de determinadas patologias.

Organização do artigo

Os artigos devem ser submetidos em formato bilingue (sendo que a segunda língua do manuscrito deve ser o Inglês), ou somente em Inglês.

1. Página do título/identificação – (página separada) Contendo título do artigo, nome (s) dos (s) autor (es), serviço (s) hospitalar (es) e departamentos ou organismos onde foi realizada a investigação, títulos académicos e/ou hospitalares dos autores. Nesta página deve ainda figurar o endereço postal completo para envio de correspondência e o endereço eletrónico do autor correspondente. Se o trabalho já tiver sido apresentado, indicar onde e em que data bem como a referência a prémio obtido. Os autores deverão manifestar a existência de conflito de interesse (nomeadamente comercial no produto, equipamento ou processo), certificar que o trabalho não foi publicado previamente e que cedem os direitos de autor à SPO.

2. Resumo – Em Português e em Inglês com o máximo 250 palavras. O resumo deve ser subdividido em: Objetivos, Material e Métodos, Resultados, Conclusões.

3. Palavras chave – Duas listas de cinco palavras chave, em Português e Inglês, que resumam e classifiquem os principais assuntos focados no texto :estas destinam-se a codificação no índice.

4. Texto – Recomenda-se que o texto tenha as seguintes secções separadas: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão; poderá ser necessário fazer adaptações a circunstâncias particulares, como no caso dos casos clínicos ou dos artigos de “flash look”. O autor deverá indicar no texto, em local apropriado, em numeração árabe e em “superscript”, as citações bibliográficas que fizer. É da exclusiva responsabilidade do autor a verificação da exatidão das referências bibliográficas e da sua colocação no texto.

5. Agradecimentos – Tanto a pessoas, como a entidades, quando tal for justificado.

6. Declaração de interesses financeiros

7. Bibliografia – De modo geral segue-se o sistema de Vancouver, com a diferença principal de que a lista das referencias bibliográficas deve ser alfabetada e subsequentemente numerada. Se houver mais de uma referencia do mesmo autor, serão indicadas em primeiro lugar aquelas em que o autor aparece isolado e só depois aquelas em que há mais que um autor.

8. Quadros, tabelas e figuras – são enviados em formato eletrónico, em ficheiros separados do texto. Os quadros e tabelas podem ser feitos num processador de texto ou numa folha de calculo (em Excel). As figuras devem ser feitos formato editável tipo “TIF”, um ficheiro para cada imagem com qualidade de impressão (≥ 300 dpi). As figuras quadros e tabelas devem ser referenciadas no texto e deve ser indicado a zona do texto às quais ficarão adstritas após formatação do artigo.

9. Legendas das figuras. As figuras devem ser obrigatoriamente legendadas e as legendas enviadas nesta secção. Os quadros e tabelas não devem ter legendas.

10. Abreviaturas e símbolos – Só devem ser usadas abreviaturas de uso corrente. Se for imprescindível recorrer a abreviaturas menos usuais, na primeira vez em que o termo aparece no texto ele deve figurar por extenso, logo seguido pela abreviatura entre parêntesis.