CAMILA CERBONI PINTO

A HIPERTENSÃO ARTERIAL EXACERBA O ESTRESSE OXIDATIVO EM RETINA DE RATOS EXPERIMENTALMENTE DIABÉTICOS

CAMPINAS

2007

i

CAMILA CERBONI PINTO

A HIPERTENSÃO ARTERIAL EXACERBA O ESTRESSE OXIDATIVO EM RETINA DE RATOS EXPERIMENTALMENTE DIABÉTICOS

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas.

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Mendonça Lopes de Faria

CAMPINAS

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

P658h	Pinto, Camila Cerboni A Hipertensão arterial exacerba o estresse oxidativo em retina de ratos experimentalmente diabéticos / Camila Cerboni Pinto. Campinas, SP : [s.n.], 2007.
	Orientador : Jacqueline Mendonça Lopes de Faria Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
	 Diabetes Mellitus. Retinopatia Diabética. Hipertensão. Estresse oxidativo. Faria, Jacqueline Mendonça Lopes de. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. Título.

Título em inglês : Arterial hypertension exarcebates oxidative stress in retina of experimentally diabetic rats

Keywords: • Diabetes Mellitus

- Diabetic nephropathy
- Hypertension
- Oxidative stress

Titulação: Mestre em Clínica Médica Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora: Profa. Dra. Jacqueline Mendonça Lopes de Faria Prof Dr Roger Frigério Castilho Prof Dr Eduardo Melani Rocha

Data da defesa: 26 - 06 - 2007

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Jacqueline Mendonça Lopes de Faria

Meml	nbros:			
1.	. Prof(a). Dr(a) Eduardo Melauni Rocha	avonas de	allo	
2.	. Prof(a). Dr(a). Roger Frigérico Castilho	m Fly	h	
3.	. Prof(a). Dr(a). Jacqueline Milendonça Lopes de	Faria AL	X	

Curso de Pós-Graduação ema Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

v

Data: 26/06/2007

DEDICATÓRIA

À minha família:

Aos meus pais, Mauro e Ana Lúcia, às minhas irmãs, Mariana e Marcela, pelos exemplos, pelo amor e carinho.

Ao meu amor, Gabriel, pela incansável paciência, compreensão e carinho que trouxe coragem, força e alegria para prosseguir nos momentos mais difíceis. À minha orientadora, profa. Dra. Jacqueline Mendonça Lopes de Faria, por ter me recebido e acreditado no meu trabalho. Pela sua orientação, dedicação e paciência.

Ao professor Dr. José Butori Lopes de Faria, por ter aberto as portas do seu laboratório para a realização deste trabalho, pela atenção e ajuda.

Aos colegas e amigos de laboratório, Denise, Pérola, Elisa, Bruno, Mariana, Felipe, Rodrigo, Natássia, Roberto, Daniela, Vanessa, Denise P., em especial à Kamila e ao Subrata, pelo que me ensinaram, pela paciência, ajuda e convívio.

À minha família, pai, mãe, minhas irmãs, pelo apoio, pelo carinho, por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu noivo, amigo e companheiro, Gabriel, que sempre está ao meu lado, seja a hora que for. Agradeço a sua paciência, carinho, dedicação, ajuda e compreensão.

Ao Sérgio Magalhães pela assistência técnica muito importante nos meus experimentos.

À FAPESP e CAPES, pelo apoio financeiro.

ix

A Águia e o Pardal

O sol anunciava o final de mais um dia e lá, entre as árvores, estava Andala, um pardal que não se cansava de observar Yan, a grande águia.

Seu vôo preciso, perfeito, enchia seus olhos de admiração.

Sentia vontade em voar como a águia, mas não sabia como o fazer.

Sentia vontade em ser forte como a águia, mas não conseguia assim ser.

Todavia, não cansava de segui-la por entre as árvores só para vislumbrar tamanha beleza...

Um dia estava a voar por entre a mata a observar o vôo de Yan, e de repente a águia sumiu da sua visão.

Voou mais rápido para reencontrá-la, mas a águia havia desaparecido.

Foi quando levou um enorme susto: deparou de uma forma muito repentina com a grande águia a sua frente.

Tentou conter o seu vôo, mas foi impossível, acabou batendo de frente com o belo pássaro.

Caiu desnorteado no chão e quando voltou a si, pode ver aquele pássaro imenso bem ao seu lado observando-o.

Sentiu um calafrio no peito, suas asas ficaram arrepiadas e pôs-se em posição de luta.

A águia em sua quietude apenas o olhava calma e mansamente, e com uma expressão séria, perguntou-lhe: - Por que estás a me vigiar, Andala?

- Quero ser uma águia como tu, Yan. Mas, meu vôo é baixo, pois minhas asas são curtas e vislumbro pouco por não conseguir ultrapassar meus limites.

- E como te sentes amigo sem poder desfrutar, usufruir de tudo aquilo que está além do que podes alcançar com tuas pequenas asas?

- Sinto tristeza. Uma profunda tristeza. A vontade é muito grande de realizar este sonho... - O pardal suspirou olhando para o chão... E disse:

- Todos os dias acordo muito cedo para vê-la voar e caçar. És tão única, tão bela. Passo o dia a observar-te.

- E não voas? Ficas o tempo inteiro a me observar? Indagou Yan.

- Sim. A grande verdade é que gostaria de voar como tu voas... Mas as tuas alturas são demasiadas para mim e creio não ter forças para suportar os mesmos ventos que, com graça e experiência, tu cortas harmoniosamente...

- Andala, bem sabes que a natureza de cada um de nós é diferente, e isto não quer dizer que nunca poderás voar como uma águia. Sê firme em teu propósito e deixa que a águia que vive em ti possa dar rumos diferentes aos teus instintos. Se abrires apenas uma fresta para que esta águia que está em ti possa te guiar, esta dar-te-á a possibilidade de vires a voar tão alto como eu. Acredita! - E assim, a águia preparou-se para levantar vôo, mas voltou-se novamente ao pequeno pássaro que a ouvia atentamente:

- Andala, apenas mais uma coisa: Não poderás voar como uma águia, se não treinares incansavelmente por todos os dias. O treino é o que dá conhecimento, fortalecimento e compreensão para que possas dar realidade aos teus sonhos. Se não pões em prática a tua vontade, teu sonho sempre será apenas um sonho. Esta realidade é apenas para aqueles que não temem quebrar limites, crenças, conhecendo o que deve ser realmente conhecido. É para aqueles que acreditam serem livres, e quando trazes a liberdade em teu coração poderás adquirir as formas que desejares, pois já não estarás apegado a nenhuma delas, serás livre! Um pardal poderá, sempre, transformar-se numa águia, se esta for sua vontade. Confia em ti e voa, entrega tuas asas aos ventos e aprende o equilíbrio com eles. Tudo é possível para aqueles que compreenderam que são seres livres, basta apenas acreditar, basta apenas confiar na tua capacidade em aprender e ser feliz com tua escolha!

Autor desconhecido

PÁG.

RESUMO	xxvii
ABSTRACT	xxxi
1- INTRODUÇÃO	35
1.1- Diabetes mellitus	37
1.1.1- Conceito	37
1.1.2- Epidemiologia	37
1.2- Hipertensão arterial	39
1.2.1- Conceito	39
1.2.2- Epidemiologia	39
1.3- Estresse Oxidativo: aspectos básicos	40
1.3.1- Pró-oxidantes, antioxidantes e estresse oxidativo	40
1.3.2- Radicais livres	40
1.3.3- Espécies reativas	41
1.3.4- Sistema antioxidante	42
1.3.5- Injúria do tecido oxidado	43
1.4- Retinopatia diabética (RD)	46
1.4.1- Retina- morfologia	46
1.4.2- Epidemiologia da RD	48
1.4.3- Fatores associados à RD	50
1.4.4- Patogênese da RD e estresse oxidativo	52

2- OBJETIVOS	55
3- MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1- Animais	61
3.2- Procedimentos	61
3.2.1- Indução de diabetes mellitus	61
3.2.2- Quantificação da glicemia	62
3.2.3- Medida da pressão arterial sistólica	62
3.2.4- Ensaio para quantificar ânion superóxido	62
3.2.5- Ensaio para quantificar glutationa reduzida	63
3.2.6- Preparação globos oculares para imunohistoquímica	64
3.2.7- Imunohistoquímica para nitrotirosina	64
3.2.8- Imunohistoquímica para 8-OHdG	64
3.2.9- Extração proteína retiniana para western blot	65
3.2.10- Extração proteína nuclear para western blot NF-kB	66
3.2.11- Eletroforese para quantificação de NF-kB, p47phox, NOX-4, gp91phox e RAGE	66
3.3- Análises estatísticas	68
4- RESULTADOS	69
4.1- Características fisiológicas dos animais estudados	71
4.2- Produção de ânion superóxido na retina	71
4.3- Concentração de glutationa reduzida na retina	72
4.4- Expressão de nitrotirosina na retina	73
4.5- Identificação de 8-OHdG na retina	75

4.6- Análise das subunidades de NADPH oxidase em extrato protéico	0
de retina (p47phox, gp91phox e NOX-4)	. 77
4.7- Expressão do receptor dos produtos finais da glicação não enzimática (RAGE) em extrato protéico de retina	- 79
4.8- Análise da expressão de NF-kB em extrato protéico total e nuclea	r
de retina	. 80
5- DISCUSSÃO	. 83
6- CONCLUSÃO	. 91
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
8- APÊNDICE	. 107
Manuscrito submetido para publicação	. 109

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE	advanced glycation end-products (produtos finais da glicação avançada)
DM	diabetes mellitus
ERO	espécies reativas do oxigênio
HA	hipertensão arterial
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
NADPH	nicotinamida adenina dinucletideo fosfato (forma reduzida)
NF-κB	nuclear factor-κB (fator nuclear NF-kB)
NO•	óxido nítrico
8-OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-hidroxi-2'-deoxiguanosina)
O2 ^{•-}	superóxido
OH	radical hidroxila
ONOO	peroxinitrito
RAGE	receptor de AGE
RD	retinopatia diabética
rpm	rotações por minuto
SHR	spontaneously hypertensive rat (ratos espontaneamente hipertensos)
SOD	superóxido dismutase
WKY	Wistar-Kyoto

PÁG.

Tabela 1-	Importantes	espécies	reativas	no	sistema	biológico	
	(Halliwell, 20	06)		•••••			42
Tabela 2-	Característica	s gerais dos	animais est	udado	s		71

FIGURAS INTRODUÇÃO

PÁG.

Figura 1-	Número estimado de pessoas com diabetes no mundo (Wild et al.,	
	2004)	38
Figura 2-	Maiores reações pró-oxidantes—antioxidantes relevantes no sistema biológico (Schnachenberg, 2002)	45
Figura 3-	Estrutura da retina (Neuroscience, 2ª edição ano 2001 by Sinauer Associates)	47
Figura 4-	Corte de retina de rato corada com hematoxilina	48
Figura 5-	Pacientes acometidos pela RD pela duração do DM (Klein et al.,	
	1984)	49
Figura 6-	Fotos de fundo de olho com retinopatia diabética	50
Figura 7-	Capilares de retina com digestão de tripsina (Kern, 2001)	52

FIGURAS RESULTADOS

PÁG.

Figura 1-	Produção de ânion superóxido	72
Figura 2-	Concentração de glutationa reduzida	73
Figura 3-	Imunohistoquímica nitrotirosina	74
Figura 4-	Imunohistoquímica 8-OHdG	76
Figura 5-	Western blot gp91phox e NOX-4	78
Figura 6-	Western blot RAGE	79
Figura 7-	Western blot NF-kB	81

RESUMO

A presença de hipertensão arterial (HA) em pacientes com diabetes mellitus (DM) é identificada como o fator de risco independente mais importante para a progressão da retinopatia diabética (RD). O DM por si aumenta o estresse oxidativo na retina tanto em humanos quanto em animais. Contudo, o efeito da combinação da HA e do DM na retina ainda não foi demonstrado. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi investigar o estresse oxidativo na retina de modelo experimental que combina a HA genética e o DM induzido por estreptozotocina. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) de 4 semanas de idade e seus controles normotensos (WKY) receberam injeção intravenosa de estreptozotocina para indução do DM. Após 20 dias, os ratos foram sacrificados e os olhos e as retinas foram coletadas. Foi observado aumento na produção de ânion superóxido, avaliada através da quimiluminescência da lucigenina, nos ratos WKY diabéticos em relação aos controles (p<0,03) e os ratos SHR, controles e diabéticos, apresentaram elevada produção de superóxido em relação aos WKY controles (p < 0.009). O sistema antioxidante da glutationa (forma reduzida-GSH) apresentou diminuição somente nos animais SHR diabéticos (p<0,04). A nitração de tirosina avaliada por imunohistoquímica para nitrotirosina (NT) foi igualmente elevada nos animais WKY diabéticos e SHR controles comparada com o grupo WKY controle (p < 0.03) e foi observado um aumento nos animais SHR diabéticos (p < 0.02). O dano do DNA devido ao estresse oxidativo avaliado por imunohistoquímica para 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG) foi elevado nos animais SHR controles em comparação com os WKY controles (p=0,0003) e foi mais aumentado nos animais SHR diabéticos (p<0,0001). A atividade de NADPH oxidase, avaliada pela expressão de gp91phox e NOX-4, não apresentou alteração na retina dos animais hipertensos e diabéticos. Adicionalmente, a expressão do receptor de AGE, RAGE, não apresentou alteração no período estudado. Os ensaios de western blot para verificar a atividade de NF-kB demonstraram aumento somente nos ratos hipertensos. O DM determina um desequilíbrio precoce entre os sistemas oxidante e antioxidante causando danos à retina e a presença da HA exacerba este efeito. Essas anormalidades podem contribuir para o mecanismo pelo qual a hipertensão arterial agrava a RD.

ABSTRACT

The presence of arterial hypertension in patients with diabetes mellitus (DM) is identified as the most important independent risk factor for progression of diabetic retinopathy (DR). Independently, diabetes and hypertension increase oxidative stress in the retina both humans and animals. However, the effect of the combination of both hypertension and DM in the retina was never addressed. Therefore, the aim of this study was to investigate the oxidative stress in the retina of an experimental model that combines hypertension and DM. Four week old spontaneously hypertensive rats (SHR) and their normotensive counterpart Wystar Kyoto (WKY) rats were rendered diabetic by intravenous injection of streptozotocin. After 20 days, the rats were sacrificed and the eyes and retinas were collected. The production of superoxide evaluated by enhanced lucigenin method was higher in diabetic than the control WKY (p<0.03) and the SHR rats showed elevated superoxide production in both control and diabetic groups compared with non diabetic WKY (p<0.009). The antioxidant defense system of glutathione (reduced form, GSH), was significantly diminished only in diabetic SHR (p<0.04). Tirosyne nitration evaluated by immunohystochemistry for nitrotyrosine (NT) was equally elevated in both diabetic WKY and control SHY compared with control WKY (p<0.03) and further increment was observed in diabetic SHR group (p < 0.02). The DNA damage due oxidative stress evaluated by immunohystochemistry for 8-hydroxy-2 deoxyguanosine (8-OHdG) was higher in control SHR than in control WKY (p=0.0003) and further increment was detect in diabetic SHR rats (p<0.0001). The NADPH oxidase activity, evaluated by the retinal expression of gp91phox and NOX-4, was not altered in the retina from hypertensive and diabetic rats. The expression of AGE-receptor (RAGE) was not altered. Western blot assay for NF-kB showed increased in control and diabetic SHR rats. Diabetes determines an early unbalance between oxidant and antioxidant systems leading to damage in the retina and the presence of hypertension exacerbates this effect. These abnormalities may contribute to mechanism by which the hypertension aggravates RD.

1- INTRODUÇÃO
1.1- Diabetes mellitus

1.1.1- Conceito

Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia resultante da deficiência da secreção de insulina e/ou da incapacidade da insulina exercer adequadamente seus efeitos. O DM tem sido classificado como DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional e outros tipos específicos (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003).

O DM tipo 1 é resultante, primariamente, da destruição das células beta pancreáticas e tem tendência a cetoacidose. Inclui casos decorrentes de doença auto-imune e há aqueles nos quais a causa da destruição das células beta não é conhecida. Corresponde de 5% a 10% do total dos casos. A forma rapidamente progressiva é comumente observada em crianças e adolescentes, porém pode ocorrer também em adultos. A forma lentamente progressiva ocorre geralmente em adultos e é referida como diabetes latente auto-imune do adulto (Consenso brasileiro sobre diabetes, 2002; Sociedade Brasileira de Diabetes, 2003).

O DM do tipo 2 resulta, em geral, de graus variáveis de resistência à insulina e deficiência relativa de secreção de insulina. A maior parte dos pacientes apresentam excesso de peso e a cetoacidose ocorre somente em algumas situações, como infecções graves. O diagnóstico, na maioria dos casos, é feito a partir dos 40 anos de idade, embora possa ocorrer mais cedo, mais raramente em adolescentes. Abrange 85% a 90% do total de casos de diabetes (Consenso Brasileiro sobre Diabetes, 2002; Sociedade Brasileira de Diabetes, 2003).

1.1.2- Epidemiologia

A prevalência do DM é acompanhada do crescimento mundial e vários relatos prognosticam que o DM está se tornando uma epidemia no primeiro quarto do século 21 (King et al., 1998; Zimmet et al., 2001; Wild et al., 2004). De fato a prevalência do DM no mundo para todas as idades foi estimada por 2,8% em 2000 e 4,4% em 2030 e a projeção

do número total de pessoas com diabetes supera 171 milhões em 2000 para 366 milhões em 2030 (Wild et al., 2004). Na América Latina consensos de DM e hipertensão arterial (HA) mostram a prevalência do DM na população adulta de 7% (Burlando e col., 2004). A prevalência no Brasil é comparável à dos países mais desenvolvidos, onde o DM é considerado um grande problema de saúde situando-se entre as 10 maiores causas de mortalidade (Malerbi e Franco, 1992).

A hiperglicemia crônica do DM é a maior responsável por danos, disfunções e deficiência de vários órgãos a longo prazo, especialmente dos olhos, rins, nervos, coração e vasos sangüíneos (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993; United Kingdom Prospective Diabetes Study Group, 1998; Stratton et al., 2000). Associada às complicações a longo prazo, a retinopatia resultante do DM, é uma das maiores complicações do DM.



Figura 1- Número estimado de pessoas com diabetes no mundo (Wild et al., 2004)

1.2- Hipertensão arterial (HA)

1.2.1- Conceito

A hipertensão arterial pode ser definida como um aumento crônico da pressão arterial sistêmica seja dos valores máximos (sistólicos), mínimos (diastólicos) ou de ambos. A classificação da HA, efetuada pela Organização Mundial da Saúde (O.M.S.) e com base nos valores da pressão arterial, permite distinguir três categorias:

- Normotensão: pressão arterial sistólica (PAS) < 130 mmHg; pressão arterial diastólica (PAD) < 85 mmHg;
- Hipertensão arterial Borderline (pressão arterial limítrofe): PAS compreendida entre 130/139 mmHg; PAD compreendida entre 85/89 mmHg;

- Hipertensão arterial: PAS > 140 mmHg; PAD > 90 mmHg.

1.2.2- Epidemiologia

Aproximadamente 50 milhões de indivíduos nos Estados Unidos e 1 bilhão de indivíduos no mundo todo são afetados pela HA (Chobanian et al., 2003). Nos diferentes países da América Latina, a porcentagem varia de 26 a 42% na população adulta (Burlando et al., 2004). A prevalência da HA aumenta com o avanço da idade da população. Recente dado sugere que indivíduos normotensos com 55 anos de idade têm risco de 90% de desenvolver HA (Vasan et al., 2002). A relação entre a pressão arterial sangüínea e o risco de doenças cardiovasculares é contínuo, consistente e independente de outros fatores de risco. O aumento da pressão arterial sangüínea pode aumentar a chance de infarto do miocardio, deficiência do coração, derrame e problemas no rim (Chobanian et al., 2003). A Organização Mundial de Saúde reporta que aproximadamente 62% das doenças vasculares do cérebro e 49% das doenças isquêmicas do coração são atribuídas ao controle da pressão arterial sangüínea. (World Health Report, 2002).

1.3- Estresse oxidativo: aspectos básicos

1.3.1- Pró-oxidante, antioxidante e estresse oxidativo

Quimicamente, oxidação é definida como a remoção de elétrons e redução como ganho de elétrons (Mayes e Botham, 2003). Nas reações, um radical livre pode agir como um agente oxidante por tomar elétron de outras espécies ou como um agente redutor por doar elétron para outras espécies (Halliwell, 2006). O termo pró-oxidante não é bem definido; é geralmente considerado que o pró-oxidante é qualquer substância que pode gerar espécies reativas ou capaz de induzir estresse oxidativo. Um antioxidante é definido como qualquer substância que quando presente em concentrações baixas, comparado com aquelas de um substrato oxidável, retarda ou previne a oxidação desse substrato (Halliwell e Whiteman, 2004). Estresse oxidativo é convencionalmente definido como um desequilíbrio entre o estresse pró-oxidante e a defesa antioxidante. Contudo, recente evidência indica que o rompimento da sinalização redução-oxidação é um importante aspecto do estresse oxidativo, às vezes mais importante que o desequilíbrio pró-oxidante—antioxidante ou do dano tecidual induzido pelo desequilíbrio (Jones, 2006). Dessa forma uma nova definição de estresse oxidativo tem sido proposta como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando ao rompimento da sinalização redox (redução e oxidação) e controle e/ou dano molecular (Jones, 2006). As consequências do estresse oxidativo podem ser muito sutis ou muito sérias (incluindo dano oxidativo das biomoléculas, interrupção do sinal de transdução, mutação e morte celular) dependendo do balanço entre a geração de espécies reativas e a defesa antioxidante (Halliwell e Whiteman, 2004).

1.3.2- Radicais livres

Um **radical livre** é qualquer espécie que contém um ou mais elétrons não pareados, ou seja, elétrons livres ocupando um orbital atômico ou molecular (Halliwell e Whiteman, 2004). Por ser os elétrons mais estáveis quando estão pareados nas orbitais, os radicais livres geralmente reagem com outras espécies (Halliwell, 1989). Elétrons não pareados têm uma forte tendência de formar par estável. Assim, um radical poderia doar seu elétron não pareado para outra molécula ou poderia tirar um elétron de outra molécula na seqüência para parear. Conseqüentemente, se um radical doa um elétron ou rouba um elétron de outra molécula, esta outra molécula torna-se um radical. Um importante aspecto das reações mediadas por radicais livres é que elas tendem a ocorrer como uma reação em cadeia (Halliwell, 1989).

1.3.3- Espécies reativas

As três classes diferentes de **espécies reativas** relevantes na biologia e na medicina são: espécies reativas do oxigênio (ERO), espécies reativas do nitrogênio e espécies reativas do cloro. Espécies reativas podem ser ou não um radical livre (Halliwell e Whiteman, 2004). ERO é um termo coletivo que inclui os radicais do oxigênio e não-radicais evidentes que são agentes oxidantes e/ou são facilmente convertidos em radicais. O superóxido (O_2^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são exemplos de ERO radical e não-radical, respectivamente. Similarmente, espécies reativas do nitrogênio é um termo coletivo que inclui radicais (óxido nítrico, NO[•]) e não-radicais (peroxinitrito, ONOO⁻) e as espécies reativas do cloro é também um termo coletivo que inclui radicais (ácido hipocloroso, HOCl) (Halliwell, 2006). Uma lista de espécies reativas importantes no sistema biológico é mostrada na Tabela 1.

Dentre as espécies reativas, o radical livre ânion superóxido $(O_2^{\bullet^*})$ é de grande importância por ser a primeira ERO produzida nas células. Várias outras espécies reativas de significado fisiológico, incluindo H₂O₂, radical hidroxila (OH[•]) e ONOO⁻ são derivadas do O₂^{•-} como produtos de uma reação em cascata (Munzel et al., 2002). O O₂^{•-} pode ser produzido pela corrente do transporte de elétrons mitocondrial, por NADPH oxidase, xantina oxidase, ciclooxigenase, lipoxigenase, oxido nítrico sintase e citocromo P450 (Schnachenberg, 2002).

Radicais livres	Não-radicais		
Espécies reativas do oxigênio			
Superóxido, O_2^{\bullet}	Peróxido de hidrogênio, H ₂ O ₂		
Hidroxila, OH•	Oxigênio singleto, $O_2^1 \Delta g$		
Peroxila, RO_2^{\bullet}	Peróxidos orgânicos, ROOH		
Alcoxila, RO [•]	Peroxinitrito, ONOO ⁻		
Carbonato, CO_3^{\bullet}	Ácido peroxinitroso, ONOOH		
Espécies reativas do cloro			
Cloro atômico, Cl [•]	Ácido hipocloroso, HOCl		
	Gás cloro, Cl ₂		
	Nitro-cloro-benzeno, NO ₂ Cl		
Espécies reativas do nitrogênio			
Óxido nítrico, NO•	Ácido nitroso, HNO ₂		
Dióxido de nitrogênio, NO ₂ •	Cátion nitrosila, NO ⁺		
	Ânion nitrosila, NO		
	Tetraoxido dinitrogênio, N2O4		
	Trioxido dinitrogênio, N2O3		
	Peroxinitrito, ONOO ⁻		
	Ácido peroxinitroso, ONOOH		
	Peroxinitritos alcila, ROONO		

Tabela 1- Importantes espécies reativas no sistema biológico (adaptado de Halliwell, 2006)

1.3.4- Sistema antioxidante

Os antioxidantes provêm proteção contra o estresse oxidativo pela neutralização ou pela limpeza das espécies reativas ou ainda pela quebra das reações de cadeia (Scandalios, 2005). Os antioxidantes são divididos em enzimáticos ou não-enzimáticos. Os enzimáticos são:

 o superóxido dismutase (SOD): uma enzima responsável por dismutar o superóxido em peróxido de hidrogênio. Existem três tipos de SOD específicos: manganês SOD (MnSOD) encontrado na mitocôndria; extra-celular SOD (EC SOD) encontrado no extra-celular e o cobre-zinco SOD (CuZn SOD) encontrado no citosol celular. - a catalase e a glutationa peroxidase: responsáveis por degradar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.

Os antioxidantes não-enzimáticos são as vitaminas C e E, a glutationa (forma reduzida, GSH) e o beta-caroteno. A transferrina, ceruloplasmina e albumina também possuem papel antioxidante por seqüestrarem íons de metais de transição, como o ferro e o cobre, os quais reagem rapidamente com H_2O_2 para produzir o radical livre hidroxila altamente tóxico pela reação de Fenton (Halliwell, 1989).

Contudo, as espécies reativas nem sempre são prejudiciais. Elas ajudam os fagócitos eliminarem microorganismos e regular eventos sinalizadores pela via redox (redução e oxidação) e dessa forma influenciar na fosforilação e desfosforilação de enzimas e fatores de transcrição (Halliwell, 2006). As maiores reações pró-oxidantes-antioxidantes foram resumidas na Figura 1.

1.3.5- Injúria do tecido oxidado

A retina é particularmente susceptível ao dano oxidativo por diversas razões. O tecido retiniano está exposto a altas taxas de oxigênio; possui essencial função fotossentitiva que o expõe a constantes doses de radiação além de conter alta proporção de ácidos graxos polinsaturados nos segmentos externos das células fotorreceptoras, o que o torna altamente susceptível a peroxidação lipídica.

Esses fatores resultam na geração das ERO que contribuem para o dano e doença ocular. No olho, os radicais livres possuem importante papel em várias doenças como a catarata, uveite, fibroplasia retrolental, degeneração macular relacionada à idade, e podem estar envolvidas na patogênese do glaucoma e nas diversas formas da retinopatia, incluindo a retinopatia diabética. (Ohia et al., 2005; Wu et al., 2006).

Há várias vias que induzem o dano oxidativo das biomoléculas mediado pelas ERO. Uma via que inicia da interação entre dois radicais livres comuns encontrados *in vivo* são o $O_2^{\bullet^-}$ e NO[•].

$O_2^{\bullet} + NO^{\bullet} \rightarrow ONOO^{\bullet}$ (Peroxinitrito)

O produto da reação é o peroxinitrito, que em pH fisiológico, rapidamente se transforma em ácido peroxinitroso. Este poderoso agente oxidante e nitrante pode danificar diretamente proteínas, lipídeos e DNA (Halliwell, 2006). O peroxinitrito pode reagir com resíduos de tirosina presentes em proteínas formando a nitrotirosina e/ou se decompõe em várias espécies reativas do oxigênio e nitrogênio que promovem a peroxidação lipídica, aumento da permeabilidade vascular e adesão plaquetária. A nitrotirosina é amplamente usada como um biomarcador do estresse oxidativo e nitrativo. Contudo, não é um biomarcador específico para a formação de peroxinitrito, pois há vários outros agentes nitrativos *in vivo* (Halliwell, 1997). A nitração de estruturas proteicas, incluindo neurofilamentos e actina, podem romper filamentos agrupados com conseqüências patológicas. (Beckman e Koppenol, 1996). E ainda, a nitração de moléculas de sinalização ou de fatores de transcrição pode modificar a função fisiológica das proteínas afetadas (como discutido por Biswas e Lopes de Faria, 2005). Em adição, o peroxinitrito intermedeia a disfunção mitocondrial dependente de cálcio e morte celular pela ativação das calpaínas, proteases de cisteína dependentes de cálcio (Whiteman et al., 2004).

A hidroxila (OH[•]) induz peroxidação lipídica e hidroxilação do DNA que são as maiores vias de dano oxidativo. A OH[•] é a espécie reativa mais conhecida quimicamente por atacar e danificar quase toda molécula encontrada nas células (Halliwell, 1989). A OH[•] pode reagir com a estrutura cíclica da guanina do DNA formando o radical 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) que pode propagar uma reação de cadeia através do DNA e causar alteração nas bases, assim como provocar a quebra da fita do DNA. O reparo imperfeito do dano do DNA pode levar a mutações, impedir o crescimento celular ou levar a apoptose (Evans et al., 2004). A OH[•] pode também levar a peroxidação lipídica reagindo com proteínas de membrana. Os efeitos gerais da peroxidação lipídica são a diminuição da fluidez da membrana, aumento da quebra de membrana e dano das proteínas de membrana, desse modo ocorre inativação de receptores, enzimas e canais de íon (Halliwell, 2006).



Figura 2- Maiores reações pró-oxidantes—antioxidantes relevantes no sistema biológico (adaptado de Schnachenberg, 2002). O superoxido (O2[•]) é produzido de inúmeras ações surgidas de espécies reativas. O2[•] reage rapidamente com o óxido nítrico (NO) para produzir peroxinitrito (ONOO⁻) ou é catalisado pelo superoxido dismutase (SOD) para produzir peróxido de hidrogênio (H2O2). H2O2 pode ser neutralizado pela catalase ou pela glutationa peroxidase. Contudo, na presença de metais de transição, como o ferro (Fe²⁺) e o cobre (Cu⁺), os radicais livres hidroxila (OH[•]), altamente tóxicos, podem ser produzidos por H2O2 via reação Fenton. Espécies reativas são mostradas em vermelho e enzimas antioxidantes em caixas verdes. GSH, glutationa reduzida; GS-SG, glutationa oxidada.

1.4- Retinopatia diabética (RD)

1.4.1- Retina - morfologia

A **retina** é a camada mais interna do globo ocular e é responsável pela visão já que possui células sensíveis a estimulação luminosa. A retina é composta pela camada da membrana limitante interna; camada de fibras nervosas; camada interna neurosensorial composta por células ganglionares, interplexiforme interna, células amácrinas, células bipolares (nuclear interna) e células horizontais; camada externa composta pela interplexiforme externa, células horizontais, nuclear externa e os fotorreceptores; epitélio pigmentado da retina (Bosco et al., 2005; Wu et al., 2006).

As células fotorreceptoras são divididas em duas classes, os cones e os bastonetes. Estas células iniciam o processo visual na retina convertendo a imagem gerada do mundo físico pela dioptria do olho nos sinais neurais (Wu et al., 2006). Na retina possui ainda as células gliais. A célula de Muller é a principal célula glial da retina dos vertebrados e na parte avascular da retina de vários vertebrados constitui o único tipo de célula macroglial. As células de Muller são responsáveis pela manutenção da função e estrutura da retina (Bringmann et al., 2006).

As camadas internas da retina recebem suporte metabólico da rede vascular que atravessa a camada ganglionar e se estende até a camada plexiforme externa (Margalit e Sadda, 2003; Bosco et al., 2005). O oxigênio e os nutrientes para a retina externa são adquiridos por difusão através dos vasos da coróide que estão adjacentes ao epitélio pigmentar da retina (Margalit e Sadda, 2003; Bosco et al., 2005). Juntos, os vasos da retina e o epitélio pigmentar formam a barreira hemato-retiniana (BHR), uma forte barreira contra macromoléculas, fazendo da retina neural um tecido imunologicamente privilegiado e propiciando mecanismo para controlar fluxo de fluidos e metabólitos (Bosco et al., 2005). O endotélio dos capilares é rodeado, em intervalos irregulares, por células murais chamadas pericitos. Há controvérsias se os pericitos exercem papel regulador do fluxo sangüíneo dos capilares, pós-capilares e vênulas, mas a presença de actina, miosina e tropomiosina nestas células sugerem capacidade contrátil (Bosco et al., 2005).



Figura 3- Estrutura da retina (A) Secção da retina mostrando a disposição das camadas da retina. (B) Diagrama do circuito básico da retina. Os três canais das células neurais: os fotorreceptores, as células bipolares e as células ganglionares – determinando a mais direta rota para a transmissão visual da informação para o cérebro. Células horizontais e células amácrinas mediadas lateralmente nas camadas plexiformes externas e internas, respectivamente (Neuroscience, 2ª edição ano 2001 by Sinauer Associates).



Figura 4- Corte de retina de rato corada com hematoxilina. CCG: camada de células ganglionares; CPI: camada plexiforme interna; CNI: camada nuclear interna; CPE: camada plexiforme externa; CNE: camada nuclear externa.

1.4.2- Epidemiologia da RD

A RD á a primeira causa de novos casos de cegueira em pessoas de idade produtiva nos EUA (Patz e Smith, 1991). Esta complicação crônica microvascular acomete em algum grau virtualmente todos os pacientes com DM após 15 anos de duração da doença e somente um subgrupo de 60% desses pacientes irão apresentar a forma proliferativa (Klein et al., 1984), o que sugere existir suscetibilidade de um subgrupo de pacientes ao desenvolvimento de formas graves da retinopatia diabética (RD) (Figura 5).

A patogênese da RD pode ser agrupada em 3 categorias: bioquímicas, hemodinâmicas e endócrinas, que podem interagir entre si. A bioquímica é a anormalidade mais precoce dessas alterações (Bosco et al., 2005). O DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) (The DCCT, 1993) foi o primeiro grande e rigoroso ensaio clínico com o objetivo de avaliar o impacto do controle metabólico no risco do desenvolvimento de complicações microvasculares, incluindo a retinopatia. Nos pacientes diabéticos tipo 1, este estudo demonstrou redução no desenvolvimento e progressão dessa complicação quando feito controle metabólico rigoroso (The DCCT, 1995). Num relatório mais recente, este

ensaio clínico revelou agrupamento familiar, provavelmente genético, com risco de 5,4 vezes maior para o desenvolvimento de RD grave em pessoas da mesma família (The DCCT, 1997). Reanalisando os dados originais do DCCT, foi observado que em torno de 10% dos pacientes com "ótimo" controle metabólico (HbA<6,8%) desenvolveram RD, ou por outro lado, 40% daqueles com controle metabólico "inadequado" (HbA>9,4%) não apresentaram qualquer sinal de RD durante o período analisado (Zhang et al., 2001). Esta informação sugere que podem existir outros fatores além da hiperglicemia que contribuam para o desenvolvimento dessa complicação. Outro ensaio clínico importante do United Kingdon Prospective Diabetes Study (UKPDS, 1998), com pacientes diabéticos tipo 2, confirmou que em pacientes com controle metabólico intensivo houve uma redução de 25% no desenvolvimento da RD, e ainda, que o controle pressórico rigoroso teve um impacto protetor de 37% no desenvolvimento da RD. Estes dados confirmam outros importantes estudos epidemiológicos nos quais foi demonstrado que a HA é o fator independente mais importante associado à RD, depois da hiperglicemia (Klein et al., 1983; Janka et al., 1989).



Figura 5- Pacientes acometidos pela RD pela duração do DM (Klein et al., 1984)

1.4.3- Fatores associados à RD

Os danos teciduais induzidos pelo DM, segundo DCCT e UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study), são iniciados pela hiperglicemia, embora este processo seja modulado por determinantes genéticos de indivíduos susceptíveis e por fatores independentes como a HA. Em meio hiperglicêmico, muitos tipos celulares são capazes de reduzir o transporte de glicose para dentro de suas células. Há células, como as da retina, que não possuem esta habilidade e são danificadas pela hiperglicemia (Brownlee, 2005). A RD é uma das doenças resultantes da exposição aos altos níveis de glicose.

A RD é clinicamente dividida em dois estágios principais: a RD não-proliferativa e a RD proliferativa (Margalit e Sadda, 2003; Bosco et al., 2005). A RD não-proliferativa é caracterizada pelo aumento da permeabilidade capilar e oclusão vascular retiniana. Ainda nesta fase pode ocorrer microaneurismas, edema e exudatos duros (extravasamento de lipoproteínas). Quando a neovascularização aparece na interface vítrea da retina, a retinopatia é considerada em estágio proliferativo, a RD proliferativa (Bosco et al., 2005).

A



B



Figura 6- Fotos de fundo de olho com retinopatia diabética. A. RD não-proliferativa: é possível visualizar a presença de exudatos duros (→) e hemorragias retinianas (→);
B. RD proliferativa: presença de extensa neovascularização na retina (→).

Evidências sugerem que a pressão arterial, além da própria hiperglicemia, reflete importante efeito sobre a incidência e progressão de complicações microvasculares retinianas. Entretanto, ainda não é sabido se a associação entre hipertensão arterial e RD é secundária aos efeitos hemodinâmicos da pressão arterial alta na microvasculatura da retina ou se representa uma associação complexa com a genética da hipertensão arterial. O contra-transporte de Na⁺/Li⁺ (CT Na⁺/Li⁺) em hemáceas, marcador genético de predisposição da hipertensão arterial (Canessa et al., 1980), representa o modelo de funcionamento da bomba de Na⁺ e H⁺ nas membranas celulares. Este é um transportador de cátions transmembrana envolvido em eventos celulares básicos, como controle de pH e volume celular, resposta a fatores de crescimento e citocinas (Canessa et al., 1980). Em outros estudos e mais recentemente em um estudo prospectivo longitudinal, a atividade do CT Na⁺/Li⁺ esteve associada ao desenvolvimento da nefropatia diabética. Foi demonstrado em um estudo de nosso grupo que o CT Na⁺/Li⁺ também está associado à presença de RD proliferativa em pacientes diabéticos tipo 1 (Lopes de Faria et al., 2000), sugerindo que a genética da hipertensão arterial possa ser importante no desenvolvimento das formas graves da RD.

A hiperglicemia induz alterações metabólicas que iniciam uma seqüência de eventos que levam às alterações morfológicas mais precoces descritas na patogênese da RD, como perda de pericitos (Cogan et al., 1961), espessamento da membrana basal capilar (Williamson e Kilo, 1976), quebra da barreira hemato-retiniana (Dorchy, 1993) e leucostase. No entanto, várias evidências têm demonstrado que alterações funcionais, através de estudos eletrofisiológicos como potencial visual evocado (Puvanendran et al., 1983; Lopes de Faria et al., 2001) e eletrorretinografia (Bresnick et al., 1984; Ghirlanda et al., 1991) estão presentes nas fases mais precoces da patogênese da RD, sugerindo que além dos eventos vasculares (células endoteliais, pericitos e membrana basal), as células neurais e gliais também estejam envolvidas na cascata de eventos fisiopatogênicos da RD. Recentemente, a avaliação quantitativa da espessura da camada de fibras nervosas da retina de pacientes diabéticos sem retinopatia, através de polarimetria de laser de varredura, apresentou significativa e assimétrica perda de fibras do nervo da retina desses pacientes (Lopes de Faria et al., 2002). Provavelmente ocorreu perda de células ganglionares da retina, corroborando com estas evidências. Por

todas estas razões, a avaliação celular e molecular dos elementos neuro-gliais na retina de modelos experimentalmente diabéticos se faz imprescindível.



Figura 7- Capilares de retina com digestão de tripsina mostrando perda de pericitos (setas), capilares acelulares (A) e microaneurisma (M) (Kern, 2001)

1.4.4- Patogênese da RD e estresse oxidativo

Múltiplas hipóteses propõem como a hiperglicemia por si inicia os mecanismos bioquímicos envolvidos na patogênese da RD. O DM resulta no aumento da produção de ERO (Ha et al., 1994; VanderJagt et al., 2001; Du et al., 2003). O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas do oxigênio (ERO), principalmente o ânion superóxido (O_2^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o sistema antioxidante, incluindo superóxido dismutase (SOD) e peroxidases, determina o grau de estresse oxidativo em determinado tecido. A retina é particularmente susceptível ao estresse oxidativo por ter alto consumo de oxigênio, alta proporção de ácidos graxos polinsaturados e por ser exposta à luz (Jain, 2006). Em pacientes diabéticos tipo 2, o aumento da produção dos radicais livres e a diminuição dos mecanismos antioxidantes têm sido associados às complicações microvasculares do DM, incluindo a RD (Maritim et al., 2003).

A origem da produção de ânion superóxido, verificado em vários tipos celulares, é identificado por diversas maneiras. A mitocôndria contribui para a maior parte da produção de ânion superóxido na retina, já o NADPH oxidase e o óxido nítrico sintase

contribuem com uma pequena parcela, porém ainda não é claro como a hiperglicemia aumenta a produção de superóxido na mitocôndria das células da retina (Du et al., 2003). Estudos mostram que as terapias com aminoguanidina, aspirina e antioxidantes inibem o desenvolvimento da RD e também inibem o aumento de produção de ânion superóxido pela retina de animais experimentais (Hammes et al., 1991; Kowluru et al., 2001; Kern , 2001; Du et al., 2003).

Recentemente, estudos demonstram o papel do peroxinitrito na disfunção vascular de diabéticos. Análises mostram que a formação de nitrotirosina em retina de ratos diabéticos e no plasma de pacientes diabéticos tem evidenciado o papel do peroxinitrito nas complicações vasculares do diabetes (Caldwell et al., 2003).

A hidroxila pode modificar muitas moléculas celulares causando-lhes danos. Quando OH[•] reage com a estrutura cíclica da guanina do DNA forma o radical 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) que pode promover uma reação de cadeia e causar alterações nas bases e também provocar a quebra da fita do DNA. Evidências mostram participação do 8-OHdG no dano celular de retina de animais com diabetes sugerindo que a modificação do DNA causada pela oxidação pode ter papel importante na patogênese da retinopatia diabética (Kowluru e Odenbach, 2004).

O estresse oxidativo pode estar ligado a apoptose em vários tipos celulares por mecanismos que influenciam a expressão de múltiplos genes, inclusive alteração de sinalização de moléculas. O aumento da expressão desses genes pode causar disfunção mitocondrial, peroxidação lipídica e proteica o que induz uma variedade de disfunções celulares levando à retinopatia (Kowluru et al., 2001; Du et al., 2003; Jain, 2006). A mitocôndria é considerada como centro regulador da via intrínsica da apoptose. Durante a apoptose, a permeabilidade da camada externa da membrana mitocondrial aumenta possibilitando o acúmulo de citocromo c no citoplasma celular ativando a cascata das caspases levando a apoptose celular. Na patogênese da RD, as células microvasculares, os pericitos e as células endoteliais, além das células neurais da retina, são perdidas seletivamente por apoptose antes que a perda de visão seja evidenciada (Kowluru, 2005; Kowluru et al., 2006a e b).

2- OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos oxidativos decorrentes da hiperglicemia no tecido retiniano em animais experimentalmente diabéticos e hipertensos geneticamente em comparação com seus controles normotensos.

Os objetivos específicos deste projeto de pesquisa foram:

- Verificar a produção de ânion superóxido, pela quimiluninescência da lucigenina identificada por luminômetro, no tecido retiniano;
- 2. Quantificar a concentração de glutationa reduzida, importante antioxidante endógeno, em proteína total de retina;
- Investigar a expressão de nitrotirosina em tecido retiniano através de ensaios de imunohistoquímica;
- Quantificar o dano oxidativo do DNA por ensaios de imunohistoquímica para 8-OHdG no tecido retiniano;
- Avaliar a participação da via NADPH oxidase como fonte geradora de radicais superóxidos na retina através das expressões das subunidades gp91phox, NOX-4 e p47phox por ensaio de western blot;
- Investigar a expressão de RAGE, receptor de AGE, em tecido retiniano, por western blot;
- Investigar a expressão e a ativação de NF-kB por western blot em amostras de proteína total e em extrato nuclear de retina.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais

Foram utilizados ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wystar Kyoto (WKY) com 4 semanas de idade e diabéticos ou não por 20 dias. Os animais desse projeto foram criados no biotério central da Unicamp a partir de matrizes importadas da Taconic (Germantow NY, USA). Todos os experimentos seguiram as orientações da Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia sobre a utilização de animais e foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal do IB/UNICAMP (protocolo 446-2) intitulado "Anormalidades precoces na retina de ratos experimentalmente diabéticos. Potenciais mecanismos de exacerbação da retinopatia diabética pela hipertensão arterial".

Os animais foram mantidos em gaiolas-padrão com água e ração *ad libitum*, com ciclos dia-noite (luz fluorescente 500 lux) de 12/12 horas. Antes das manipulações experimentais, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico 3% (30mg/Kg Hipnol®, Fontoveter, Itapira, Brasil) intraperitonealmente.

3.2- Procedimentos

3.2.1- Indução de diabetes mellitus

Os animais foram previamente pesados para o cálculo da quantidade de droga para indução do diabetes mellitus. A indução do DM foi realizada através da injeção de estreptozotocina (Sigma, St Louis, MO, USA), na dose de 50 mg/kg, na veia caudal, dissolvida em tampão citrato 0,5 M, pH 4,5. Após 48 horas da injeção de estreptozotocina, a confirmação da presença do diabetes mellitus foi feita através da glicemia pelo método da glicose oxidase (Precision QID, Abbott) e incluídos no estudo animais com glicemia acima 15 mmol (270 mg/dl). Os animais do grupo controle receberam injeção endovenosa de tampão citrato, seguindo exatamente o mesmo protocolo utilizado para o grupo diabético. Antes do sacrifício dos animais, a glicemia foi realizada novamente para confirmação do estado diabético.

3.2.2- Quantificação da glicemia

A glicemia foi realizada após 4 horas de jejum dos animais. Os ratos foram anestesiados e o sangue periférico da cauda do animal foi coletado. O sangue foi imediatamente colocado em *eppendorf* heparinizado, posteriormente centrifugado a 3000rpm por 10 minutos. O plasma, que ficou suspenso no *eppendorf*, foi utilizado na determinação da glicemia através de método enzimático-colorimétrico (Glicose PAP Liquiform, Labtest). Tubos de ensaio contendo 1 ml do reagente de cor (tampão 50mM, pH 7,5; fenol \geq 1mM; glicose oxidase \geq 11000 U/L; peroxidase \geq 700 U/L; 4-aminoantipirina \geq 290µM; azida sódica 0,05%; estabilizadores e surfactantes) foram homogeneizados após a adição de 10 µl de padrão de glicose nos tubos dos padrões e 10 µl das amostras analisadas. Os homogeneizados foram incubados em banho-maria a 37°C durante 15 minutos e iniciada a leitura em espectofotômetro em comprimento de onda de 505 nm, de acordo com as instruções do fornecedor. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Após a confirmação do DM, os animais foram mantidos por 20 dias.

3.2.3- Medida da pressão arterial sistólica

Os ratos foram aquecidos a 38°C por aproximadamente 10 minutos e, após este período, foram colocados num contentor sobre uma placa aquecida que mantem a temperatura corporal a 37°C, não anestesiados e acostumados ao procedimento. A pressão arterial sistólica foi determinada com um sensor acoplado num *cuff* na cauda dos ratos, e os valores foram registrados por um pletismógrafo (Narco Bio System, Houston, Tx, USA). O valor da medida da pressão arterial foi obtido após 4 medidas consecutivas semelhantes.

3.2.4- Ensaio para quantificar a presença de ânion superóxido na retina através da reação da lucigenina

Du et al. (2003) descreveram a lucigenina (bis-N-metilacridinio nitrato) como um composto que emite luz quando interage com o superóxido. Dessa forma, utilizamos esta metodologia para quantificar a produção de ânion superóxido na retina dos animais. Os olhos dos animais foram enucleados, após procedimento de sacrifício, e as retinas foram isoladas do epitélio pigmentado da retina (EPR) e transferidas para tubos de polipropileno contendo 237 µl de tampão Krebs-HEPES (20mM HEPES, 128mM NaCl, 2.5mM KCl, 2.7mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 16mM glicose, pH 7,4) e incubadas no escuro a 37°C por 30 minutos. Após este período, foi adicionado 0,05mM de lucigenina no escuro e a leitura da reação foi realizada no luminômetro (TD 20-E Luminometer Turner, USA) após 10 segundos e repetidas por um período de 10 minutos. Foi feita a média dessas leituras e esses valores foram normalizados pela concentração de proteína total quantificada por Bradford (Bradford, 1976).

3.2.5- Ensaio colorimétrico para quantificação dos niveis de glutationa reduzida em tecido retiniano

Os níveis de glutationa reduzida foram avaliados pela metodologia de Beutler *et al.* (1963). As retinas extraídas dos animais foram colocadas em eppendorf contendo 300µl de ácido tricloroacético 10% (TCA), 5mM EDTA e sonicadas. Foi feita centrifugação deste homogeneizado a 3000rpm por 15 minutos a 4°C. 200µl do sobrenadante foram colocados em 1ml de Na₂HPO₄ adicionado de 125µl de ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) em tubo de ensaio. Uma curva com concentrações diferentes e conhecidas de glutationa foi obtida para o cálculo da concentração de glutationa nas diversas amostras. A leitura foi feita em espectofotômetro com comprimento de onda de 412 nm (Kowluru et al., 2001). Ao final, a concentração de glutationa foi corrigida pela concentração de proteína total do tecido retiniano desses animais (quantificada por Bradford).

3.2.6- Preparação dos globos oculares para estudos de imunohistoquímica

Os olhos enucleados foram fixados em metacarnol (clorofórmio 30%, ácido acético 10%, metanol 60%) por no máximo 24 horas e então transferidos para álcool 70% por 24 horas. Após este período foram embebidos em parafina e realizados cortes transversais de 4 micra de espessura. Os cortes foram montados em lâminas tratadas com silano.

3.2.7- Imunohistoquímica para detecção de nitrotirosina na retina

O peroxinitrito é um poderoso agente oxidante e nitrante que pode danificar diretamente proteínas, lipídeos e DNA (Halliwell, 2006). O peroxinitrito pode reagir com resíduos de tirosina presentes em proteínas formando a nitrotirosina A nitrotirosina pode ser usada como um biomarcador do estresse oxidativo e nitrativo. Assim realizamos experimentos de imunohistoquímica para a detecção de nitrotirosina na retina dos animais estudados. Primeiramente foi realizada desparafinização dos cortes de olho com xilol, re-hidratação com passagens por concentrações decrescentes de etanol, recuperação antigênica com aquecimento em microondas e bloqueio das ligações inespecíficas com leite desnatado 1% em PBS (tampão fosfato); a seguir as lâminas foram incubadas com o anticorpo policional anti-nitrotirosina (Upstate, NY) 1:100 em BSA 1% à 4°C overnight. Após 3 lavagens em PBS, o polímero marcado com fosfatase alcalina conjugado com anticorpo de cabra anti IgG de coelho conjugado de biotina (1:200, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) foi aplicado por 1 hora em temperatura ambiente. As lâminas foram então incubadas com complexo avidina-biotina (ABC) (Vector) seguido pela adição de diaminobenzidina tetrahidroclorido (DAB) (Sigma). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina, reidratados e montados com entellan. O controle negativo foi obtido omitindo-se o anticorpo primário para o controle da reação. Foram realizadas avaliações de 8 cortes não consecutivos de retina de um olho para cada animal. As lâminas foram observadas em um microscópio Leica DMLS (Leica, Bensheim, Germany) sob o aumento de 1000x. Imagens da retina foram digitalizadas com câmera Cânon Power Shot S60 (Cânon Inc., Japan) conectada ao microscópio. A análise da intensidade das imagens foi obtida através da graduação por intensidade, sendo de zero (ausência de positividade) a 4 (acima de 75% de positividade) por um observador que desconhecia a identidade de cada lâmina.

3.2.8- Imunohistoquímica para detecção de células 8-OHdG positivas na retina

O radical 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) é o produto da reação do radical livre hidroxila com a estrutura cíclica da guanina do DNA. O 8-OHdG pode propagar uma reação de cadeia através do DNA e causar alteração nas bases, assim como

provocar a quebra da fita do DNA. Foi realizado experimentos de imunohistoquímica para detecção de 8-OHdG na retina dos ratos estudados. O ensaio inicia-se com a desparafinização dos cortes de olho com xilol, re-hidratação com passagens por concentrações decrescentes de etanol. A recuperação antigênica foi realizada através de aquecimento em microondas e o bloqueio das ligações inespecíficas com leite desnatado 1% em PBS por 1 hora em temperatura ambiente. A seguir as lâminas foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti-8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (Jaica, Japão) 1:50 em BSA 1% à 4°C overnight, que possui especificidade ao antígeno estudado. Após 3 lavagens em PBS, o polímero marcado com fosfatase alcalina conjugado com anticorpo de cavalo anti IgG de rato conjugado de biotina (1:200, Vector, Burlingame, CA) foi aplicado por 1 hora em temperatura ambiente para se ligar ao anticorpo primário. As lâminas foram então incubadas com complexo avidina-biotina (ABC) (Vector) seguido pela adição de diaminobenzidina tetrahidroclorido (DAB) (Sigma). Os cortes foram reidratados e montados com entellan. O controle negativo foi obtido omitindo-se o anticorpo primário para o controle da reação. A contagem das células positivas, em todas as camadas da retina, foi realizada por examinador que não conhecia a identidade de cada lâmina. O valor de cada animal foi obtido como o total de células positivas divididas pelo número de cortes de retina ao final das contagens.

3.2.9- Extração de proteína retiniana para ensaios de Western blot

Os olhos dos animais foram enucleados, as retinas foram isoladas do epitélio pigmentado da retina (EPR) e transferidas para tampão de homogeneização (30 mmol Tris-HCL, 10 mmol/l EGTS, 5 mmol/l EDTA, 1% Triton X-100, 250 mmol/l sucrose e 1 mmol/l fenilmetilsulfonil Fluorido, pH 7.5) suplementado com coquetel de inibidores de protease (Complete®, Boehringer Mannheim, Germany) (Silveira et al., 2002). O homogeneizado foi submetido às ondas de ultra-som, 3 vezes por 5 segundos. Após centrifugação, 3000rpm por 10 minutos a 15°C, uma alíquota de 10 µl era separada para quantificação da proteína total pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como padrão albumina bovina sérica. O restante do homogeneizado foi misturado no tampão de corrida contendo: 10% de glicerol, 0,06% de azul de bromofenol e 20 mmol/l de DTT, fervido por 5 minutos, aliquotados e mantidos em -80°C.

3.2.10- Extração de proteínas nucleares de retina para ensaios de Western blot para avaliar a expressão da subunidade p65 do fator nuclear kappa beta (NF-kB) - medida indireta da ativação do NF-kB em tecido retiniano

Um pool de 8 retinas de 4 animais foram separadas e imediatamente imersas no tampão A (20 mM Tris [pH 7.6], 10 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 20% [do volume] glicerol, 1,5 mM MgCl₂, 2 mM DTT e inibidor de protease) (5 vezes o volume das retinas) em um *potter* pequeno para serem homogeneizadas. O núcleo foi peletizado, a 2500g à 4°C por 10 minutos, e ressuspendido com tampão B (idem tampão A exceto KCl que aumentou para 0,42M) (2 vezes o volume do *pellet*). Foi feita centrifugação deste homogeneizado a 15000g à 4°C por 20 minutos. Uma alíquota de 10 µl foi separada para quantificação da proteína pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como padrão albumina bovina sérica. O restante do homogeneizado foi misturado no tampão de corrida contendo: 10% de glicerol, 0,06% de azul de bromofenol e 20 mmol/l de DTT, fervido por 5 minutos e mantidos em -80°C até seu uso.

3.2.11- Eletroforese para quantificação da expressão protéica da subunidade p65 do fator nuclear kB (NF-kB), das subunidades do NADPH oxigenase (p47phox, NOX-4 e gp91phox) e do RAGE (receptor de AGE) em proteína total de retina e em extrato protéico nuclear (para a fração p65 do NF-kB)

A partir de estudos pilotos para otimização do método, foram determinadas a quantidade de proteínas e as concentrações necessárias de anticorpos a serem utilizados nos ensaios de western blot. Dessa forma obteve-se: 30 µg de proteína total e 50 µg de extrato de proteína nuclear para o western blot da subunidade p65 do NF-kB; 200 µg de proteína para p47phox; 50 µg de proteína para NOX-4 e 100 µg de proteína para gp91phox e RAGE. Essas concentrações de proteínas foram aplicadas a um gel de 10% SDS-poliacrilamida com uma fase de empilhamento, contendo água destilada, tampão de empilhamento (EDTA 4mM, SDS 2%, Trizma base 50mM, pH 6.7), acrilamida 40%, TEMED (Gibco) e amônio per sulfato (PSA) 10%, e uma outra fase inferior, chamada fase de resolução constituída por água destilada, glicerol, tampão de resolução (EDTA 4mM,

SDS 2%, Trizma base 750mM, pH 8.9), acrilamida 40%, TEMED (Gibco) e amônio per sulfato (PSA) 10%. As proteínas e o marcador de peso molecular (Amersham Biosciences) foram submetidos à eletroforese, com voltagem progressiva de 20-40 volts no gel de empilhamento e 40-120 volts no gel de resolução, utilizando-se o aparato Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose de porosidade 0.45 um (Bio-Rad) por 2 horas com corrente constante de 200mA, em tampão de transferência (50mM Tris-HCl, pH 7, 380mM glicina, 0.1% SDS e 20% metanol). Em seguida, foi realizado bloqueio inespecífico com leite 5% diluído em tampão fosfato (PBS) e Tween 20 a 1% por 1 hora a temperatura ambiente ou overnight. Em seguida membranas foram incubadas com anticorpo de coelho policional anti NF-kB p65 (1:500; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA), anticorpo de camundongo monoclonal anti-p47phox (1:500 BD Transduction Laboratories, BD Biosciences Pharmingen, NJ, USA), anticorpo de coelho policional anti-NOX-4 (1:2500 doado pela Dra. Karen Block, Universisity of Texas Health Science Center at San Antonio), anticorpo de coelho policional anti-gp91phox (1:750 Upstate, NY) e anticorpo de cabra policional anti-RAGE (1:1000; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA), por 1 hora em temperatura ambiente ou overnight. Após este período as membranas foram incubadas com anticorpo anti IgG coelho conjugada com HRP (1:10000 para NF-kB, NOX-4 e gp91phox; Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ), anticorpo anti IgG camundongo conjugada com HRP (1:10000 para p47phox; Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ), anticorpo anti IgG cabra (1:50000 para RAGE; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA). Os sinais foram visualizados através de quimiluminescência (SuperSignalTM CL-HRP Substrate System, Pierce, Rockfor, IL), de acordo com as instruções do fabricante, e posteriormente autoradiografadas. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria computadorizada (BIO-RAD Model GS 700 Imaging Densitometer). Para confirmação da uniformidade de concentração das proteínas, as membranas foram incubadas com tampão "stripping" (Tris HCl 62.5mM, DTT 10mM e SDS 20%, pH 6.8) a 60°C por 30 minutos, foram lavadas com TBST (10mM Tris-HCL, 15mM NaCl e Tween-20 a 1%), bloqueadas com leite 5% em TBST para posterior incubação com anticorpo de coelho policional antiß actina (1:1000; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) seguido pelo anticorpo anti IgG coelho conjugada com HRP (1:5000; Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ). Na seqüência, foram utilizados os mesmos procedimentos de quimiluminescência, revelação e densitometria computadorizada. Os resultados foram obtidos com os valores densitométricos das proteínas de interesse corrigidas pelos valores densitométricos da actina (unidades arbitrárias).

3.3- Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como média±desvio padrão. Comparações entre os diversos grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA) seguido de Fisher LSD. Todas as comparações foram feitas usando o programa Stat View (Power PC version 5.0, Statview, Berkeley, CA), sendo considerado estatisticamente significativo um valor de p<0,05.

4- RESULTADOS

4.1- Características fisiológicas dos animais estudados

Animais de 4 semanas de idade e sacrificados após 20 dias da indução do DM

Os animais WKY apresentam maior peso corporal que o grupo SHR (p<0,0001). Os animais diabéticos apresentaram menor ganho ponderal em comparação aos controles não-diabéticos tanto no grupo WKY quanto no grupo SHR (p<0,0001). Nos animais SHR, a pressão arterial sistólica foi significativamente maior do que nos normotensos WKY (p<0,0001). Os animais SHR e WKY diabéticos apresentaram glicemia de jejum mais elevada (p<0,0001) que os controles não diabéticos (tabela 2).

Tabela 2- Características gerais dos animais estudados de 4 semanas de idade esacrificados após 20 dias da indução do diabetes.

	Wc	Wd	Sc	Sd
n	36	36	36	36
Peso inicial (g)	108±2	114 ± 6.7	69±5.4*	67±3.5*
Peso final (g)	245±15.9	$173 \pm 13.4^{\pi}$	181±12.4	$116 \pm 16.4^{\pi}$
Pressão arterial sistólica (mmHg)	127±2.7	127±2.6	150±17.6*	157±14.2*
Glicemia (mmol/L)	10.5±1.4	29.9±1.9*	9.44±0.46	30.38±2.9*

Wc: WKY controle; Wd: WKY diabético; Sc: SHR controle; Sd: SHR diabético. *p<0,0001 em comparação ao grupo WKY, $\pi p<0,0001$ em comparação aos grupos controles, p<0,005 em comparação ao grupo WKY, *p<0,0001 em comparação aos grupos controles.

4.2- Produção de ânion superóxido na retina

Para avaliar a produção de espécies reativas do oxigênio quantificamos a produção de ânion superóxido pela metodologia da lucigenina conforme descrito na seção materiais e métodos. Verificamos aumento na produção de superóxidos nos animais WKY diabéticos (p=0,03) e nos animais SHR controles e diabéticos (p<0,0001) em relação ao grupo WKY controle. Este resultado indica que a presença da hiperglicemia ou da hipertensão arterial isoladamente induz o aumento da produção do superóxido, porém a concomitância do DM e da hipertensão arterial não provocou efeito aditivo (figura 1).



Figura 1- Produção de ânion superóxido usando o método da lucigenina para retina de ratos controles e diabéticos WKY e SHR. As colunas representam média \pm desvio padrão. *p<0.03 em relação ao Wc, $^{\#}p$ <0.009 em relação ao grupo WKY.

4.3- Concentração de glutationa reduzida na retina

A glutationa reduzida é um importante antioxidante intracelular responsável por neutralizar o peróxido de hidrogênio gerado pelo transporte de elétrons mitocondrial. Avaliamos a glutationa em sua forma reduzida nos animais de 4 semanas de idade e 20 dias de DM, por ensaios de colorimetria para analisar se o sistema antioxidante apresentava alteração entre os grupos. Verificamos diminuição de sua expressão no grupo de animais diabéticos hipertensos em relação aos diabéticos normotensos (Sd em comparação ao Wd, p=0,04) conforme mostrado na figura 2. Este resultado sugere que a presença do DM e da HA induz o consumo desse sistema antioxidante o que pode predispor a lesões oxidativas da retina se houver aumento de espécies reativas.


Figura 2- Níveis de Glutationa Reduzida (GHS) de retina de ratos WKY e SHR controles e diabéticos. As barras representam a média \pm desvio padrão. *p< 0,04 em comparação ao Wd.

4.4- Expressão de nitrotirosina avaliada por imunohistoquímica nas retinas dos animais estudados

Uma das vias que induz o dano oxidativo das biomoléculas mediado pelas espécies reativas do oxigênio é a interação do ânion superóxido com o óxido nítrico que gera o peroxinitrito. O peroxinitrito, que pode causar a nitração da tirosina das proteínas, é quantificado através da nitrotirosina por ser um composto mais estável que o peroxinitrito. Foi observada positividade para nitrotirosina em todas as camadas da retina diferenciando a intensidade entre os grupos. Nos animais WKY diabéticos e nos animais SHR controles houve um moderado aumento na expressão da nitrotirosina em relação ao grupo WKY controle (p=0,03). Já nos animais SHR diabéticos esta expressão foi mais acentuada (p<0,02) indicando que a concomitância do DM e da HA exacerbou a nitração da tirosina das proteínas da retina desses animais (figura 3 A e B).



Figura 3- A. Fotomicrografia representativa de imunohistoquímica para quantificação de nitrotirosina em retina de animais WKY e SHR controles e diabéticos. A presença de nitrotirosina apresenta tonalidade marrom. B. As barras representam a média ± desvio padrão da intensidade de nitrotirosina por secção de retina como definido em materiais e métodos. *p< 0,03 em comparação ao Wc, #p< 0,02 em comparação com os demais grupos.

4.5- Imunohistoquímica para identificação de 8-OHdG na retina

A figura 4 mostra os resultados dos experimentos de imunolocalização do radical 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) em cortes de retina de animais de 4 semanas de idade e mantidos diabéticos por 20 dias. O 8-OHdG identifica o dano dos ácidos nucléicos do DNA causados pela reação do ânion hidroxil com a estrutura cíclica da guanina resultando em estresse oxidativo. Detectamos um aumento moderado da expressão de 8-OHdG na retina dos animais WKY diabéticos e SHR controles (p=0,02) em comparação ao grupo WKY controle. A concomitância do DM e da HA resultou no aumento do dano do DNA das células da retina desses animais (p<0,0001).



Figura 4- A. Fotomicrografia representativa de imunohistoquímica para quantificação de 8-OHdG em retina de animais WKY e SHR controles e diabéticos. A presença de 8-OHdG apresenta tonalidade marrom escuro. B. As barras representam a média ± desvio padrão do número de células positivas para 8-OHdG por secção de retina. **p*=0,02 em comparação ao Wc; #*p*< 0,0001 em comparação ao Wc.

4.6- Análise das expressões de gp91phox, NOX-4 e p47phox, , subunidades de NADPH oxidase, em extrato protéico de retina

Após verificar aumento de produção de ânion superóxido, analisamos a possível participação da via do NADPH oxidase na geração de superóxidos nesses animais. Avaliamos a expressão das subunidades reguladora p47phox e a subunidade catalítica de membrana, gp91phox e seu homólogo NOX-4, por ensaios de western blot. As subunidades p47phox e NOX-4 ainda não haviam sido demonstradas em tecido retiniano. Os nossos resultados demonstraram que o homólogo da subunidade gp1phox, NOX-4, foi detectado na retina desses animais, porém não se alterou com a presença do DM ou hipertensão arterial (figura 5A). A subunidade p47phox não foi detectada na retina por essa metodologia (dado não mostrado). O gp91phox, assim como o NOX-4, não apresentou nenhuma diferença entre os grupos estudados (figuras 5A e B). Esses dados sugerem que a produção de superóxido na retina nesse modelo experimental não foi dependente da via do NADPH oxidase. Provavelmente outra via participa na produção desses radicais neste período experimental.



Figura 5- Análises por western blot de gp91phox (A) e NOX-4 (B) de extrato protéico de retina de animais WKY e SHR controles e diabéticos e as respectivas correções pela β-actina. Os filmes representam ensaio de western blot e as barras representam a média ± desvio padrão da densitometria das bandas expressadas em unidades arbitrárias.

4.7- Expressão do receptor dos produtos finais da glicação avançada (RAGE)

A exposição das proteínas e lipídeos à glicose após um período resulta nos produtos finais da glicação avançada (AGE). O RAGE é um importante receptor de AGE que inicia sinais intracelulares que podem levar a alterações funcionais das células. Estas alterações ativam a cascata de sinalização do NADPH oxidase com conseqüente aumento de espécies reativas do oxigênio e possível ativação do NF-kB (Goldin et al., 2006). Dessa forma analisamos se a expressão de RAGE apresentava alteração nos animais com curto tempo do DM por ensaios de western blot. Como demonstrado na figura 6, não observamos diferença entre os grupos sugerindo que as proteínas e os lipídeos não sofrem glicação não-enzimática neste tempo experimental no tecido retiniano.



Figura 6- Análises por western blot de RAGE, receptor de AGE de retina de animais WKY e SHR controles e diabéticos. Os filmes representam ensaio de western blot e as respectivas correções pela β-actina e as barras representam a média ± desvio padrão da densitometria das bandas expressadas em unidades arbitrárias.

4.8- Análise da expressão e ativação do fator de transcrição nuclear NF-kB em extrato protéico e extrato nuclear de retina

A ativação do NF-kB pode ocorrer por diversos estímulos, entre eles o estresse oxidativo, que leva à transcrição de moléculas importantes para a patogênese da retinopatia diabética (Kowluru, 2005). Nas células normais o NF-kB encontra-se no citoplasma e, sob estímulos extracelulares, o NF-kB é ativado e transloca-se para o núcleo e ativa a transcrição de vários genes (Chen et al., 1999). Assim analisamos a expressão dessa subunidade por western blot de extrato proteico total e também sua provável ativação através do extrato nuclear de tecido retiniano.

No extrato proteico total de retina, obtivemos um bom resultado técnico, com um filme sem "background" e banda única na altura esperada (65kD). Houve aumento da expressão da fração p65 nos animais geneticamente hipertensos (SHR em comparação com WKY, p=0,005; figura 7A). Como foi detectado aumento na expressão de NF-kB em proteína total da retina nos animais SHR, realizamos a quantificação da fração p65 de NF-kB em proteínas nucleares para investigar se a ativação apresentava diferença entre os grupos estudados. Em tecido retininiano é uma metodologia difícil dada à pequena quantidade de proteína extraída de cada retina (torno de 400µg/retina). Para os diferentes protocolos de extração nuclear testados, foram necessários pool de pelo menos 4 animais, ou seja, 8 retinas para cada ponto de extrato de proteína nuclear. Surpreendentemente, esse experimento não demonstrou diferenças na expressão da fração NF-kB p65 nuclear entre os grupos SHR controle e diabético (figura 7B). Este experimento nos permite sugerir que na retina dos animais hipertensos ocorre maior expressão da fração p65 do NF-kB e que na presença do DM esta condição não se altera.



Figura 7- Análises por western blot de p65 NF-kB em extrato protéico total (A) e em extrato nuclear (B) de retina de animais WKY e SHR controles e diabéticos. Os filmes representam ensaio de western blot e as barras representam a média ± desvio padrão da densitometria das bandas expressadas em unidades arbitrárias. Foi realizada correção pela β-actina para a expressão de NF-kB e coloração com Ponceu S foi realizada nas membranas para a confirmação da uniformidade de concentração de proteínas nucleares.

5- DISCUSSÃO

No presente estudo, nós investigamos os possíveis efeitos precoces da hipertensão arterial nos fenômenos oxidativos na patogênese da RD. O DM experimental foi simultaneamente induzido nos ratos SHR e seu controle normotenso WKY com 4 semanas de idade para avaliarmos a produção de superóxidos, os níveis de glutationa reduzida, a nitração da tirosina, a presença de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, a atividade do NADPH oxidase, expressão do RAGE e do NF-kB em tecido retiniano após o período de 20 dias de duração do DM. Verificamos que a curta duração do DM ou somente a hipertensão arterial induziram um desequilíbrio moderado no sistema redox do tecido retiniano com o predomínio das espécies reativas do oxigênio. A concomitância do DM e da HA promoveram claramente uma extensiva e profunda nitração de tirosina e principalmente dano do DNA na retina desses animais. Este efeito se deu possivelmente pela maior produção de radicais superoxidos e diminuição do sistema antioxidante glutationa no tecido retiniano. Esses achados sugerem que a hipertensão arterial pode contribuir para o agravamento precoce da RD através das vias oxidativas.

As complicações do DM promovem um desequilíbrio entre a produção dos radicais livres e a defesa dos antioxidantes na retina. O termo radical livre envolve várias moléculas reativas como, por exemplo, as espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio. A nitração de proteína retiniana induzida pelo DM, presumidamente pelo peroxinitrito, sugere que tanto o superóxido como o óxido nítrico estão presentes em quantidade excessiva na retina (Du et al., 2002). Neste presente estudo a concomitância do DM e da hipertensão arterial resultou no aumento da produção de superóxido na retina associado à debilitação do sistema de defesa antioxidante levando a nitração de tirosina e ao dano do DNA das células retinianas.

O O_2^{\bullet} é a primeira espécie reativa do oxigênio produzida nas células e várias outras espécies reativas importantes para a fisiologia celular são derivadas do O_2^{\bullet} como produtos de uma reação em cascata (Munzel et al., 2002). O O_2^{\bullet} pode ser produzido pela corrente do transporte de elétrons mitocondrial, por NADPH oxidase, pela xantina oxidase, ciclooxigenase, lipoxigenase, oxido nítrico sintase e citocromo P450 (Schnachenberg, 2002). Há consideráveis evidências de que a hiperglicemia leva ao aumento das espécies reativas do oxigênio (Ha et al., 1994; VanderJagt et al., 2001;

Du et al., 2003). Verificamos aumento na produção de superóxidos nos animais WKY diabéticos e nos animais geneticamente hipertensos na ausência ou na presença do DM sugerindo que a hiperglicemia ou a hipertensão arterial isoladamente induz o aumento da produção do superóxido.

Como previamente demonstrado por Nishikawa et al. (2000), a excessiva produção de superóxido é conseqüência da alteração bioquímica causada pela hiperglicemia (proteína kinase C, via do poliol e vias da glicação avançada). Apesar disso, a geração de superóxidos pode ter efeito deletério independente de sua via de origem. O superóxido pode reagir rapidamente com o óxido nítrico para formar o peroxinitrito, um oxidante altamente reativo (Tamir et al., 1996; Burney et al., 1999; Szabo e Ohshima, 1997) que pode resultar na citotoxidade devido a peroxidação lipídica, a inativação de enzimas pela oxidação de radicais sulfidrilas, pela nitração de tirosina e também pelo dano causado ao DNA (Goldstein et al., 1996). Estudos in vivo e in vitro demonstram que a nitrotirosina está aumentada na presença da hiperglicemia nas células retinianas (Kowluru e Odenbach, 2004; El-Remessy et al., 2003). Em estudos de imunolocalização observamos positividade para nitrotirosina em todas as camadas da retina sendo que o DM ou a hipertensão arterial isoladamente elevou a nitração das proteínas retinianas desses animais. Em adição, a concomitância do DM e da HA exacerbou este evento. Esse resultado sugere que, nesses animais estudados, há expressiva quantidade de óxido nítrico disponível e alta produção de superóxido resultando na reação desses produtos e posterior dano celular identificado através da nitrotirosina.

Outra forma de medir as espécies reativas é pela expressão do radical livre hidroxila (OH[•]) que induz peroxidação lipídica e dano ao DNA pela sua reação com a estrutura anelar da guanina no DNA. Como resultado, o 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) formado causa alterações químicas das bases e leva à quebra da fita do DNA. Já foi descrito que ocorre oxidação do DNA das células retinianas *in vivo* e *in vitro* na presença da hiperglicemia (Kowluru et al., 2006a e b; Yamagishi et al., 2006). Verificamos aumento da expressão de 8-OHdG na retina dos ratos normotensos com DM e nos ratos hipertensos de maneira similar. Observamos maior expressão de 8-OHdG nas retinas dos animais com HA e DM. O reparo imperfeito do DNA pode levar a mutações, interrupção

do ciclo celular ou induzir apoptose (Evans et al., 2004). A apoptose é descrita como o mecanismo pelo qual as células vasculares e neurais da retina de diabéticos são perdidas na patogênese precoce da RD (Barber et al., 1998; Joussen et al., 2003).

O estresse oxidativo provem do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a debilitação do sistema antioxidante. Os antioxidantes possuem importante função de proteção contra o estresse oxidativo pela neutralização das espécies reativas ou ainda pela quebra das reações de cadeia (Scandalios, 2005). A glutationa reduzida (GSH), antioxidante intracelular, faz parte do sistema antioxidante mais usado pela mitocôndria servindo como doador de elétrons para a glutationa peroxidase neutralizando o peróxido de hidrogênio gerado no transporte de elétrons mitocondrial (Schnachenberg, 2002). Sendo assim, a glutationa reduzida representa um confiável parâmetro de estresse oxidativo. Avaliamos sua concentração na retina dos ratos através de ensaios colorimétricos. Identificamos diminuição de sua expressão no grupo de animais com DM e HA. Esse dado reforça a sugestão de que o estresse oxidativo está aumentado nos animais hipertensos e com curta duração do diabetes melitus.

Os produtos finais da glicação avançada (AGE) são formados *in vivo* após um determinado período de exposição à hiperglicemia resultando na modificação irreversível das moléculas de proteínas e lipídeos (Kowluru e Odenbach, 2004). Os AGE podem acumular nas paredes dos vasos sangüíneos prejudicando a estrutura e função celular. O RAGE é um dos receptores de AGE que inicia sinais intracelulares interrompendo a função celular através do reconhecimento e ligação com o AGE. Uma cascata de sinalização pode ser ativada por essa ligação estimulando a atividade de NADPH oxidase, conseqüente aumento de espécies reativas do oxigênio e possível ativação do NF-kB (Goldin et al., 2006). Investigamos a expressão de RAGE e não obtivemos alteração nos diferentes grupos estudados. Possivelmente o curto período do DM pode explicar este resultado, pois estudos que demonstram aumento na formação de AGE *in vivo* apresentam períodos mais longos (em meses) de exposição à hiperglicemia (McPherson et al., 1988; Lin et al., 2006; Kowluru e Odenbach, 2004).

Nossos estudos sugeriram que o papel de NADPH oxidase na produção do superóxido na retina de ratos expostos a um período curto de DM e ou a genética da hipertensão arterial não contribuem com o estresse oxidativo na retina. Analisamos a expressão das subunidades reguladora p47phox e catalítica gp91phox e seu homólogo NOX-4 em tecido retiniano. Não identificamos alterações entre os grupos estudados. A contribuição dessa enzima na produção do superóxido pode ser diferenciada entre tipos celulares específicos ou provavelmente pelo período de exposição à hiperglicemia.

A explicação bioquímica das complicações do DM é especialmente complexa. Vários estudos identificam aumento de NF-kB na presença de hiperglicemia (Kowluru e Odenbach, 2004; Lin et al., 2006), porém há dificuldade para identificar a exata via molecular que envolve a ativação de NF-kB sob o efeito da hiperglicemia (Schiekofer et al., 2003). As espécies reativas do oxigênio geradas por NADPH oxidase é uma das vias sugeridas por alguns estudos que pode ativar este fator de transcrição nuclear (Goldin et al., 2006). Nossos estudos não apontaram aumento de expressão e ativação de NF-kB nos ratos com DM. Novamente o curto período de exposição à hiperglicemia pode ter contribuído para este resultado. Já os ratos com HA apresentaram aumento de NF-kB sugerindo que pode haver uma via de ativação independente da hiperglicemia.

O superóxido pode ser gerado por várias vias distintas, porém estudos demonstram que o transporte de elétrons mitocondrial corresponde à maior parte dos superóxidos produzidos na retina (Sandbach et al., 2001). Sob condições normais, o transporte de elétrons mitocondrial é responsável pela maior parte da produção de superóxido convertendo até 2% (de 0,2-2%) do oxigênio molecular em ânion superóxido, mas em condições patológicas, como no DM, esses níveis são bem elevados (Kowluru et al., 2006a e b). As espécies reativas do oxigênio podem ativar a mitocôndria levando à liberação de citocromo c, pelo aumento da porosidade da membrana mitocondrial, para o citoplasma celular resultando na ativação da cascata apoptótica (Anuradha et al., 2001; Phaneuf e Leeuwenburg, 2002). As alterações mitocondriais são associadas às ativações das vias apoptóticas que resultam na debilitação das funções renais (Verzola et al., 2002) e nas anormalidades do miocardio (Cai et al., 2002). O envolvimento

da disfunção mitocondrial, em diversos tecidos, em modelo experimental de HA e DM ainda não foi descrito.

Na literatura, não há dados quanto aos possíveis efeitos da hipertensão arterial no estado redox da retina. Prévios estudos experimentais usando modelos hipertensos sensíveis a sal demonstraram que há aumento da glutationa quando administrado N-acetilcisteina na dieta dos animais atenuando o dano renal (que normalmente ocorre nesse modelo). Este dado indica que o estresse oxidativo atua sob o desenvolvimento das complicações microvasculares relacionadas à HA (Tian et al., 2006). Contudo, os mecanismos envolvidos na interação da HA exacerbando a toxidade da hiperglicemia nos órgãos alvo, como a retina, não são conhecidos.

Em resumo, nossos dados demonstram que em modelos animais que combinam DM experimental e a hipertensão arterial genética ocorre um precoce e acentuado desequilíbrio no estado redox com conseqüente nitração de tirosina e dano do DNA nas células da retina. Esse desequilíbrio do estado redox é causado pelo aumento na produção de superóxido e pela diminuição da capacidade antioxidante. Esta evidência pode contribuir para um melhor entendimento do mecanismo de exacerbação da retinopatia na presença da hipertensão arterial em pacientes com DM.

6- CONCLUSÃO

Nossos dados demonstraram que a curta duração do DM, induzido por estreptozotocina, ou somente a hipertensão arterial elevou a expressão de nitrotirosina e de 8-OHdG no tecido retiniano, sugerindo que neste modelo experimental ocorre estresse oxidativo. As subunidades de NADPH oxidase não demonstram alteração nas retinas dos animais estudados sugerindo que esta via não participa da produção de ânion superóxido neste período experimental.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anuradha CD, Kanno S, Hirano S. Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. Free Radic Biol Med 2001; 31: 367-373.

Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. J Clin Invest 1998; 102: 783-791.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol 1996; 271: C1424-C1437.

Beutler E, Duron O, Mikus B. Improved me thod for the determination of blood gluthatione. J Lab Clin Med 1963; 16: 882-888.

Biswas SK, Lopes de Faria JB. Does peroxynitrite sustain nuclear factor-κB? Cardiovasc Res 2005; 67: 745-746.

Bosco A, Lerário AC, Soriano D, Santos RF, Massote P, Galvão D, Franco ACHM, Purisch S, Ferreira AR. Retinopatia diabética. Arq Bras Endocrinol Metab 2005; 49: 217-227.

Bradford MM. A rapid and sensive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.

Bresnick GH, Korth K, Groo A et al. Electroretinographic oscillatory potentials predict progression of diabetic retinopathy. Arch Ophthalmol 1984; 102: 1307-11.

Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov S, Osborne N, Reichenbach A. Müller cells in the healthy and diseased retina. Retinal and Eye Research 2006; 25: 397-424.

Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. Diabetes 2005; 54: 1615-1625.

Burlando G, Sanchez RA, Ramos FH, Mogensen CE and Zanchetti A, on behalf of the Latin American Experts Group. Latin American Consensus on diabetes mellitus and hypertension. J Hypertens 2004; 22: 2229-2241.

Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. Mutat Res 1999; 424: 37–49.

Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway. Diabetes 2002; 51: 1938-1948.

Caldwell RB, El-Remessy AB, Abou-Mohamed G, Caldwell RW. Hight glucose-induced tyrosine nitration in endothelial cells: role os eNOS uncoupling and aldose reductase activation. Investigative Ophthalmology & Visual Science 2003; 44: 3135-43.

Canessa M, Adragna N, Solomon H, Connolly TM, Tosteson BS, Tosteson DC. Increased sodium-lithium counter transport in red cell of patients with essential hypertension. N Engl J Med 1980; 302: 772-776.

Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. Clin Chem 1999; 45: 7-17.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr, et al. The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure: The JNC 7 Report. JAMA 2003; 289: 2560-2572.

Cogan D, Toussaint D, Kuwabara T. Retinal vascular pattern. IV. Diabetic retinopathy. Arch Ophthalmol 1961; 66: 366-78.

Sociedade Brasileira de Diabetes. Consenso brasileiro sobre diabetes 2002: diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2. Ed. Diagraphic, 2003. 72p.

Dorchy H. Characterization of early stages of diabetic retinopathy. Importance of the breakdown of the blood-retinal barrier. Diabetes Care 1993; 16: 1212-14.

Du Y, Smith MA, Miller CM, Kern TS. Diabetes-induced nitrative stress in the retina, and correction by aminoguanidine. J Neurochem 2002; 80: 771–779.

Du Y, Miller CM, Kern TS. Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells. Free Radic Biol Med 2003; 35: 1491-1499.

El-Remessy AB, Abou-Mohamed G, Caldwell RW, Caldwell RB. High Glucose-Induced Tyrosine Nitration in Endothelial Cells: Role of eNOS Uncoupling and Aldose Reductase Activation. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003; 44: 3135-3143.

Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutat Res 2004; 567: 1-61.

Ghirlanda G, Di Leo MA, Caputo S et al. Detection of inner retina dysfunction by steady-state focal electroretinogram pattern and flicker in early IDDM. Diabetes 1991; 40: 1122-27.

Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creages MA. Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. Circulation 2006; 114(6): 597-605.

Goldstein IM, Ostwald P, Roth S. Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. Vision Res 1996; 36: 2979–2994.

Ha H, Kim C, Son Y, Chung MH, Kim KH. DNA damage in the kidney of diabetic rats exhibiting microalbuminuria. Free Radical Biol Med. 1994; 16: 271-74.

Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. J Roy Soc Med 1989; 82: 747-752.

Halliwell B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? FEBS Lett 1997; 411: 157-160.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? Brit J Pharmacol 2004; 142: 231-255.

Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiol 2006; 141: 312-322.

Hammes HP, Martim S, Federlim K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 11555-11558.

Jain SK. Superoxide dismutase overexpression and cellular oxidative damage in databetes-A commentary on "Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress". Free Radic Biol Med 2006; 41: 1187-90.

Janka HU, Ziegler AG, Valsania P, Warram JH, Krolewski AS. Impact of blood pressure on diabetic retinopathy. Diabete Metab 1989; 15: 333-37.

Jones DP. Redefining oxidative stress. Antioxid Redox Signal 2006; 8: 1865-1879.

Joussen AM, Poulaki V, Mitsiades N, Cai WY, Suzuma I, Pak J, Ju ST, Rook SL, Esser P, Mitsisdes CS, Kirchhof B, Adamis AP, Aiello LP. Suppression of Fas-FasL-induced endothelial cell apoptosis prevents diabetic blood-retinal barrier breakdown in a model of streptozotocin-induced diabetes. FASEB J 2003; 17: 76-78.

Kern TS, Engerman RL. Pharmacological inhibition of diabetic retinopathy. Aminoguanidine and aspirin. Diabetes 2001; 50: 1636-1642.

King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. Diabetes Care 1998; 21: 1414-1431.

Klein R, Klein BAK, Davis MD. Is cigarette smoking associated with diabetic retinopathy? Am J Epidemiol 1983; 118: 228-38.

Klein R, Klein BAK, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. Arch Ophthalmol 1984; 102: 520-526.

Kowluru RA, Tang J, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and galactosemia. VII. Effects of long-term administration of antioxidants on retinal oxidative stress and the development of retinopathy. Diabetes 2001; 50: 1938-1942.

Kowluru RA, Odenbach S. Effect of Long-Term Administration of α-Lipoic Acid on Retinal Capillary Cell Death and the Development of Retinopathy in Diabetic Rats. Diabetes 2004; 53: 3233-3238.

Kowluru RA. Diabetic retinopathy; mitochondrial dysfunction and retinal capillary cell death. Antioxid Redox Signal 2005; 7: 1581-1587.

Kowluru RA, Kowluru V, Xiong Y, Ho Y. Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress. Free Radic Biol Med 2006a; 41: 1191-1196.

Kowluru RA, Atasi L, Ho Y. Role of mitochondrial superoxide dismutase in the development of diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006b; 47: 1594-1599.

Lin J, Bierhaus A, Bugert P, Dietrich N, Feng Y, Hagen F, Nawroth P, Browlee M, Hammes HP. Effect of R-(+)- α -lipoic acid on experimental diabetic retinopathy. Diabetologia 2006; 49: 1089-1096.

Lopes de Faria JM, Silveira LA, Morgano M, Pavin EJ, Lopes de Faria JB. Erythrocyte sodium-lithium countertransport and proliferative diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000; 41(6): 1482-1485.

Lopes de Faria JM, Katsumi O, Cagliero E et al. Neurovisual abnormalities preceding the retinopathy in patients with long-term type 1 diabetes mellitus. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2001; 239: 643-48.

Lopes de Faria JM, Russ H, Costa VP. Retinal nerve layer loss in patients with type 1 diabetes mellitus without retinopathy. Br J Ophthalmol. 2002; 86: 725-8.

Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. Diabetes Care 1992; 15: 1509-1516.

Margalit E, Sadda SR. Retinal and optic nerve diseases. Artificial Organs 2003; 27(11): 963-974.

Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress and antioxidants: A review. J Biochem Mol Toxicol. 2003; 17: 24-38.

Mayes PA, Botham KM. Biologic oxidation. In: *Harper's Illustrated Biochemistry*, edited by Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. McGraw-Hill: India 2003; 86-91.

McPherson JD, Shilton BH, Walton DJ. Role of fructose in glication and cross-linking of proteins. Biochemistry 1988; 27: 1901-1907.

Munzel T, Afanas'ev IB, Kleschyov AL, Harrison DG. Detection of superoxide in vascular tissue. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22: 1761-1768.

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature 2000; 404: 787-790.

Ohia SE, Opere CA, LeDay AM. Pharmacological consequences of oxidative stress in ocular tissues. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutageneses 2005; 579(1-2): 22-36.

Patz A, Smith RE. The ETDRS and Diabetes 2000. Ophthalmology 1991; 98: 1755-1756.

Phaneuf S, Leeuwenburg C. Cytochrome c release from mitochondria in the aging heart: a possible mechanism for apoptosis with age. Am J Physiol 2002; 282: R423-R430.

Puvanendran K, Devathasan G, Wong PK. Visual evoked responses in diabetes. Journal Neurosurg Psychiatry 1983; 46: 643-47.

Sandbach JM, Coscun PE, Grossniklaus HE, Kokoszka JE, Newman NJ, Wallace WC. Ocular pathology in mitochondrial superoxide dismutase (SOD2)-deficient mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001; 42:2173-2178.

Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Braz J Med Biol Res 2005; 38: 995-1014.

Schnachenberg CG. Oxygen radicals in cardiovascular-renal disease. Curr Opin Pharmacol 2002; 2: 121-125.

Schiekofer S, Andrassy M, Chen J, Rudofsky G, Schneider J, Wendt T, Stefan N, Humpert P, Fritsche A, Stumvoll M, Schleicher E, Häring HU, Nawroth PP, Bierhaus A. Acute hyperglycemia causes intracellular formation of CML and activation of ras, p42/44 MAPK, and Nuclear Factor kB in PBMCs. Diabetes 2003; 52: 621-633.

Silveira LA, Bacchi CE, Pinto GA, De Faria JB. The genetics of hypertension modifies the renal cell replication response induced by experimental diabetes. Diabetes 2002; 51: 1529-1534.

Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. BMJ 2000; 321: 405-412.

Sociedade Brasileira de Diabetes 2003 <u>http://www.diabetes.org.br</u>

Szabo C, Ohshima H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. Nitric Oxide 1997; 1: 373–385.

Tamir S, Burney S, Tannenbaum SR. DNA damage by nitric oxide. Chem Res Toxicol 1996; 9: 821–827.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1993; 329: 977-986.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The relationship of glycemic exposure (HbA_{1c}) to the risk of development and progression of retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes 1995; 44: 968-983.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: Clustering of long-term complications in families with Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Diabetes 1997; 46: 1829-1839.

The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2003; 26: S5-S20.

Tian N, Rose RA, Jordan S, Dwyer TM, Hughson MD. Manning, Jr.R.D. N-Acetylcysteine improves renal dysfunction, ameliorates kidney damage and decreases blood pressure in salt-sensitive hypertension. Journal of Hypertension 2006; 24(11): 2263-2270.

United Kingdom Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet 1998; 352: 837-853.

VanderJagt DJ, Harrison JM, Ratliff DM, Hunsaker LA, Vander Jagt DL. Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. Clinical Biochemistry 2001; 34: 265-270.

Vasan RS, Beiser A, Seshadri S, Larson MG, Kannel WB, D'Agostino RB, et al. Residual lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: The Framingham Heart Study. JAMA 2002; 287: 1003-1010.

Verzola D, Bertolotto MB, Villaggio B, Ottonello L, Dallegri F, Frumento G, Berruti V, Gandolfo MT, Garibotto G, Deferran G. Taurine prevents apoptosis induced by high ambient glucose in human tubule renal cells. J Invest Med 2002; 50: 443-451.

Whiteman M, Armstrong JS, Cheung NS, Siau JL, Rose P, Schantz JT, et al. Peroxynitrite mediates calcium-dependent mitochondrial dysfunction and cell death via activation of calpains. FASEB J 2004; 18: 1395-1397.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000and projections for 2030. Diabetes Care 2004; 27: 1047-1053.

Williamson JR, Kilo C. Basement-membrane thickening and diabetic microangiopathy. Diabetes 1976; 25: 925-27.

World Health Report 2002: Reducing risks, promoting healthy life. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 2002 <u>http://www.who.int/whr/2002/</u>

Wu J, Seregard S, Algvere PV. Photochemical damage of the retina. Survey of Ophthalmology 2006; 51: 461-481.

Yamagishi S, Matsui T, Nakamura K, Takeuchi M, Imaizumi T. Pigment epitheliumderived factor (PEDF) prevents diabetes- or advanced glycation end products (AGE)elicited retinal leukostasis. Microvasc Res 2006; 72: 86-90. Zhang L, Krzentowski G, Albert A, Lefebvre PJ. Risk of developing retinopathy in Diabetes Control and Complications Trial type 1 diabetic patients with good or poor metabolic control. Diebetes Care 2001; 24: 1275-79.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and Societal implications of the diabetes epidemic. Nature 2001; 414: 782-787.

8- APÊNDICE
Free Radical Research



Arterial hypertension exacerbates oxidative stress in early diabetic retinopathy

Journal:	Free Radical Research
Manuscript ID:	GFRR-2007-0112
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	03-May-2007
Complete List of Authors:	Pinto, Camila; Faculty of Medical Sciences, University of Campinas Silva, Kamila; University of Campinas, Faculty of Medical Sciences Biswas, Subrata; Faculty of Medical Sciences, University of Campinas Martins, Natássia; University of Campinas, Faculty of Medical Sciences Lopes de Faria, Jose; University of Campinas, Department of Internal Medicine, Division of Nephrology Lopes de Faria, Jacqueline M; University of Campinas, Faculty of Medical Sciences
Keywords:	3-nitrotyrosine, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, diabetes, free radicals, glutathione, hypertension



Arterial hypertension exacerbates oxidative stress in early diabetic retinopathy

Camila C. Pinto, Kamila C. Silva, Subrata K. Biswas, Natássia Martins, José B. Lopes de Faria, Jacqueline M. Lopes de Faria

Renal Pathophysiology Laboratory, Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences (FCM), State University of Campinas (UNICAMP), 13084-971, Campinas, São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Jacqueline M. Lopes de Faria

Renal Pathophysiology Laboratory, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas

(UNICAMP), Campinas, SP, Brazil, 13084-971; P.O Box 6111.

Phone: +55-19-35217499, fax: +55-19-35217366

e-mail: jmlfaria@fcm.unicamp.br

RUNNING TITLE: Hypertension exacerbates diabetic retinopathy

ABSTRACT

The present study was undertaken to investigate the redox status in the retina of an experimental model that combines hypertension and diabetes. Spontaneously hypertensive rats (SHR) and their control Wystar Kyoto (WKY) rats were rendered diabetic and after 20 days, the rats were sacrificed and the retinas collected. The superoxide production was higher in diabetic than in control WKY (p<0.03) and SHR rats showed elevated superoxide production compared with WKY groups (p<0.009). The glutathione antioxidant system was diminished only in diabetic SHR (p<0.04). Tirosyne nitration was higher in diabetic WKY and control SHR compared with control WKY (p<0.03) and further increment was observed in diabetic SHR (p<0.02). The DNA damage estimated by immunohystochemistry for 8-OHdG was higher in control SHR than in WKY, mainly in diabetic SHR (p<0.0001). Hypertension aggravates oxidative-induced citotoxicity in diabetic retina due to increasing of superoxide production and impairment of antioxidative system.

Keywords: diabetic retinopathy; hypertension; oxidative stress; superoxide; nitrotyrosine; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; glutathione.

Introduction

The long-term eve complications of diabetes are the leading cause of blindness in patients aged 20-64 years [1]. Hyperglycemia is needed to initiate diabetic retinopathy (DR) but the sequence of the events, which lead to early retinal lesion, is not yet clear. In addition to hyperglycemia, epidemiological studies clearly identify hypertension as the most important independent risk factor for DR [2, 3]. The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) have convincingly demonstrated that in patients with type 2 diabetes, the strict metabolic control leads to a 25% reduction in the risk of development and progression of DR. Interestingly, the effect of rigorous control of blood pressure was higher than glycemic control since its protective impact of up to 37% reduction in the risk of development and progression of DR [4]. But the mechanism of interaction between hyperglycemia and hypertension exacerbating DR is not fully understood. Various hyperglycemia-induced metabolic abnormalities have been postulated to contribute to the development of the diabetic retinal disease, including increased oxidative stress, nonenzymatic glycation, polyol pathway, and protein kinase C (PKC) activation [5-7]. The possible role of oxidative stress in the mechanism of interaction between diabetes and hypertension in the pathogenesis of diabetic retinopathy is not known.

Under diabetic conditions, an imbalance exists between oxidant stress and antioxidative defense mechanisms that favor the former. The retina is susceptible to oxidative stress due to its high consumption of oxygen, high proportion of polyunsaturated fatty acids, and exposure to visible light [8]. Oxidative stress can influence the expression of multiple genes, including signaling molecules. The over expression of these genes may cause mitochondrial dysfunction and peroxidization of the lipid and protein structure

http://mc.manuscriptcentral.com/gfrr

which further induce a variety of cellular dysfunctions [8]. Oxidative stress develops in the retina of diabetic animals indicating that oxidative stress is associated with the development of retinopathy [6]. Consistent with this, Armstrong *et al.* [5] reported a correlation between increased serum lipid hydroperoxides and the prevalence of retinopathy in diabetic patients. Superoxide is of particular interest as it can react with nitric oxide (NO) to produce the highly reactive peroxynitrite, which can result in cytotoxicity due to lipid peroxidation, inactivation of enzymes by oxidation of protein sulfhydryls and nitration of tyrosines, and damage to DNA and mitochondria. Nitrotyrosine has been detected on retinal proteins of diabetic animals [9]. In the present study, we examined whether the presence of hypertension stimulates an accentuated oxidative stress changes in the retina of diabetic rats. We observed that in hypertensive diabetic rats there was an early and marked imbalance between superoxide production and anti oxidative stress defense system present in the retina resulting in extensive retinal citotoxicity.

METHODS

Research design and methods

The protocol for this study complies with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and it was approved by the local Committee for Ethics in Animal Research and in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Spontaneously hypertensive rats (SHR) and their normotensive control Wistar-Kyoto (WKY) rats used in the present study were derived from animals supplied by Taconic (Germantown, NY) and bred in our animal facility. Experimental diabetes was induced in 4-week-old pre-hypertensive male SHR and WKY rats by injecting streptozotocin (STZ, 60 mg/kg) (Sigma, St. Louis, MO) dissolved in

Page 5 of 26

Free Radical Research

sodium citrate buffer (pH 4.5) via a tail vein after an overnight fast. Control groups received only vehicle (citrate buffer). Plasma glucose levels were measured using an enzymatic colorimetric GOD-PAP assay (Merck, Darmstadt, Germany) 72 h after the injection of STZ or citrate buffer and on the day before sacrificing the rats. Glucose values ≥ 15 mmol/L were considered diabetic for the present study. Systolic blood pressure (three to five determinations per rat) was obtained by indirect tail-cuff plethysmography in unanesthetized rats using an MK III physiograph (Narco Bio-System, Houston, TX). Twenty days after the induction of diabetes, the rats were sacrificed and the retinas were detached from the retinal pigmented epithelium cell layer and collected for protein extraction and colorimetric assays. In the retina, redox status markers were evaluated through production of superoxide anion, immunolocalization of nitrotyrosine and 8-hydroxy-2²-deoxyguanosine (8-OhdG) and measurement of reduced glutathione levels which is an important anti oxidant defense system present in the retina. Additionally, the role of the NADPH oxidase in the generation of superoxide anion was evaluated by its subunits gp91phox and NOX-4 expressions in total retinal lysated.

Isolation of retina

The eyes were enucleated, and the retinas were dissected and isolated from the pigmented epithelium and were lysed directly on ice in 300 µl of a buffer containing 2% SDS and 60 mmol Tris-HCl (pH 6.8) supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Complete: contains antipain-HCl, chymostatin, leupeptin, bestatin, pepstatin, phosphoramidon, aprotinin, and EDTA; Boehringer) [10]. After centrifugation, the supernatants were transferred to new tubes and the protein concentrations were measured by the Bradford method [11], using BSA as a standard.

Detection of superoxide anion

As previously described by Du Y *et al* [9], the lucigenin (bis-N-methylacridinium nitrate), an acridylium dinitrate compound was used to measure superoxide anion production. On the day of the study, rats were killed and both retinas were rapidly isolated and placed in polypropylene tubes containing 0.2 ml Krebs-HEPES buffer, and incubated in the dark at 37°C in 95% O2/5% CO2 for a 30 min equilibration period. After equilibration, 0.5 mM lucigenin was added to the tube, and photon emission was measured over 10 s, repeated measurements were made over a 10 min period in a luminometer (TD 20-E Luminometer Turner, USA). Reaction blanks (vials containing all components except retinas) were counted and these blank values subtracted from all other readings.

Determination of reduced glutathione (GSH) levels

Retinal GSH level was measured by the method described by Beutler *et al* [14] with few modifications. The eyes were enucleated, and the retinas were dissected and isolated from the pigmented epithelium and were lysed directly on ice in 300 μ l of a buffer containing 10% tricloroacetic acid and 5mM EDTA. The homogeneized was centrifugated at 3,000 rpm for 15 min at 4°C. The supernatant was reacted with 0.3M phosphate buffer and 0.04% 5, 5' dithio-bis-2-nitrobenzoic acid. Absorbance was read at 412 nm and the GSH concentration expressed as μ M GSH per μ g of retinal protein. GSH was used as an external standard for preparation of a standard curve.

Immunohistochemistry for nitrotyrosine and 8-hydroxy-2 deoxyguanosine (8-OHdG) in retinal tissues

Page 7 of 26

Free Radical Research

Paraformaldehyde 4%-fixed paraffin-embedded eye sections (4 μ) were dewaxed and rehydrated. Then the slides were put in citrate buffer (10 mM, pH 6) and exposed to microwave in a domestic oven (Panasonic Junior, Panasonic) for two cycles of 10 minutes at maximum potency. Slides were cooled in ice-cold water for 20 minutes maintaining the slides in citrate buffer. Thereafter, the slides were put in $3\% H_2O_2$ methanol for 10 min to block endogenous peroxidase. The slides were incubated in 1% nonfat milk in PBS for 1 hour at room temperature to block nonspecific staining. Tissue sections were then incubated with a 1:200 dilution of a polyclonal rabbit anti-Nitrotyrosine antibody (Upstate Cell Signaling Solutions, Lake Placid, NY) and 1:50 dilution of a mouse monoclonal anti-8-OhdG antibody (N45.1; Japan Institute for the Control of Aging, Japan) for overnight at 4°C. After washing in PBS, alkaline phosphatase labelled polymer conjugated with 1:200 dilution of secondary anti-rabbit antibody (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) for nitrotyrosine and 1:200 dilution of secondary anti-mouse antibody IgG antibody (Vector, Burlingame, CA) for 8-OhdG were applied for 1 hour at room temperature. After washing in PBS, slides were incubated with 1:50 avidin-biotin complex (ABC) reagent (Dako, Glostrup, Denmark), for 30 min at room temperature. After, 2 mg of diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) in 5mL of 1 M Tris-HCl, pH7.5 plus 2.5uL H_2O_2 were put in slides for 2 minutes. The slides were then counterstained with hematoxylin (only for Nitrotyrosine) and mounted with entellan and coverslip. For negative controls, staining was performed omitting the primary antibody or by using an irrelevant immunoglobulin (an immunoglobulin G which does not binds with the specific protein). The semi quantitative analyses of the images of immunohystochemistry for nitrotyrosine were determinate using the public domain program Image J (National Institutes of Health, http://rsb.info.nih.gov/ij). For 8-OHdG, the quantitative analyses were performed as percentage of positive cells in the ganglion

cell and inner nuclear layers scored as 0 (no positivity), 0.5 (up to 10% of positivity), 1 (11-25% of positivity), 1.5 (26-40% of positivity), 2 (41-53% of positivity), 2.5 (54-66% of positivity), 3 (67-80% of positivity) to 4 (>80% of positivity) [12, 13]. The positive cellular nuclei were counted by an observer with no knowledge of the studied groups in eight non consecutive retinal sections distanced about 24 μ m from each other under high power microscopic fields (X1000).

Western blotting for gp91phox and Nox-4

For Western blot analysis, 100 µg for gp91phox and 50µg for Nox-4 of total retinal protein in 5% glycerol/0.03% bromophenol blue/10 mmol dithiothreitol were loaded into 8% SDS polyacrylamide gels. Molecular weight markers (Rainbow; Amersham Pharmacia) were used as standards. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA) in transfer buffer (50 mml Tris-HCl, pH 7.0, 380 mmol glycine, 0.1% SDS, and 20% methanol). Membranes were blocked (for 1 h at room temperature in 2.5% nonfat milk) and incubated with rabbit polyclonal IgG gp91phox antibody (1:750; Upstate Cell Signaling Solutions, Lake Placid, NY, USA) and rabbit polyclonal IgG Nox-4 antibody (1:2500 donated by Dr. Karen Block, University of Texas Health Science Center at San Antonio, CA, USA) for 1 h at room temperature. The blots were subsequently incubated with horseradish peroxidase HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:10000, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) and developed using chemiluminescence method (Super Signal CL-HRP Substrate System; Pierce, Rockford, IL). Exposed films were scanned with a densitometer (Bio-Rad) and analyzed quantitatively with Multi-Analyst Macintosh Software for Image Analysis Systems. Western blots were repeated three to five times and gave

qualitatively similar results. Equal loading and transfer was ascertained by reprobing the membranes for ß-actin.

Statistical Analysis

The results were expressed as the mean \pm SD, unless otherwise stated. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's protected least-significant difference test was used to assess differences among the groups. All comparisons were carried out using the StatView statistical package software. A value of p< 0.05 indicated significance.

RESULTS

Physiological characteristics of the studied groups

The weight at the sacrifice was lower following streptozotocin injection in both WKY and SHR rats (p<0.0001). As expected, systolic blood pressure (SBP) was significantly higher in SHR than the WKY rats (p<0.005) and blood glucose levels were higher in diabetic rats compared with non diabetic groups (p<0.0001) (Table 1).

Superoxide anion production, reduced glutathione (GSH) and nitrotyrosine

concentrations

We aimed to identify the possible contribution of hypertension on the redox state in the retina of diabetic rats. As the redox state is largely dependent upon glutathione levels, which in turn influence nitration, we measured the production of superoxide anion production, reduced glutathione concentrations and protein tyrosine nitration in retinal tissue. We detected a significant increment of superoxide production in the diabetic

Page 10 of 26

WKY group (p=0.03) and further increase was observed in both control and diabetic SHR groups compared with control WKY (p<0.0009). This finding indicates that the presence of diabetes or hypertension solely induced an early increase of superoxide anion production, but the concomitance of hypertension and diabetes did not further increased the superoxide anion production in the retina tissue (figure 1). Along with the superoxide production, an antioxidant defense system was accessed through the quantitative measurement of GSH levels in the retina tissue. After 20 days of diabetes, the GSH concentrations were slightly decreased in control SHR (by approximately 4%) compared with WKY groups and markedly diminished in the presence of diabetes (by 15%, p=0.04) (figure 2). The nitrosative stress-induced protein modification was assessed in retinal tissue by immunohystochemistry for nitrotyrosine. We detected a moderate increase in both diabetic WKY and control SHR (p=0.03) in comparison to control WKY. The concomitance of diabetes and hypertension leaded to a marked increment of nitrotyrosine in all retinal layers (p=0.004) (figures 3A, B). These data indicate that in normotensive short term diabetic rats, there is a significant increment in superoxide production which is at least in part equilibrated by the retinal antioxidant denfense system resulting in a moderate tyrosine nitration, a marker of nitrosative stress. Similarly, in the hypertensive rats, the redox state shows a tendency to unbalance of the oxidative stress resulting in a moderate level of tyrosine nitration in the retinal tissue. Diversely, in the hypertensive and diabetic rats, the increment of the superoxide anion production with a significant diminishing in reduced glutathione levels leaded to a profound tyrosine nitration in the retina tissue, as demonstrated in figure 3. These evidences suggest that the presence of hypertension may exacerbate the hyperglycemia-induced oxidative damage in the retina.

Oxidative damage of nucleic acids

To identify the damaging effect of oxidative stress on nucleic acids, we studied the expression of 8-OHdG, a modification of DNA base guanine-containing nucleoside 2'-deoxyguanosine, by immunohistochemical assay. We demonstrated a moderate increase in both diabetic WKY and control SHR (p=0.2) in comparison to control WKY. The concomitance of short term diabetes and genetic hypertension resulted in a distinguishable DNA damage in the retinal cells (p<0.0001) (figures 4A, B). Accordingly, both evaluation parameters of oxidative citotoxicity in the retina, nitration of tyrosine and 80HdG positivity indicate that the concomitance of diabetes and hypertension are deleterious to retinal cells leading to diffuse cell damage in retinal tissue.

The role of NADPH oxidase in production of anion superoxide

NADPH oxidase is an enzyme system that source pro-oxidant superoxide in the vascular tissue [15]. To study the participation of this enzyme system in the pathogenesis of retinal oxidative stress, we investigated the expression of gp91phox, a regulatory subunit of NADPH oxidase, and Nox4, a homologue of gp91phox subunit of NADPH oxidase system. The expressions of both, gp91phox and Nox4 in total retinal lysates evaluated by western blot assay were not different among different groups (figures 5A, B).

DISCUSSION

In the present study, we investigated the possible effects of arterial hypertension on early oxidative stress phenomena in the pathogenesis of DR. Experimental diabetes was simultaneously induced in genetic hypertensive SHR rats and its normotensive

control WKY and the superoxide production, reduced glutathione levels, tyrosine nitration and 8-OHdG in the retinal tissue were analyzed after 20 days. We demonstrated that either the short duration of diabetes or arterial hypertension solely induced moderate unbalance redox in the retina tissue, and the concomitance of diabetes and hypertension clearly promoted an extensive and profound tyrosine nitration and mainly DNA damage in the diabetic retina. These findings promoted an experimental evidence that hypertension may contribute to early aggravation of DR through oxidative stress unbalance means.

Diabetes related complications promote an imbalance between the production and defense against free radical species in the retina. The term free radical species encompasses several highly reactive molecules that include reactive oxygen species and reactive nitrogen species, superoxide and NO being prominent members of those groups. The diabetes-induced increase in nitration of retinal proteins [16] (presumably via peroxynitrite) suggests that both superoxide and NO are present in excessive amounts. Our studies demonstrate that the concomitance of diabetes and hypertension results in increase of superoxide production in the retina accompanied by impaired antioxidant defense system leading to massive tyrosine nitration and DNA damage. Additionally, in the present paper, the role of NADPH oxidase to retinal production of superoxide in short term diabetes was minor or did not contribute to oxidative stress in the retina. The contribution of these enzymes to superoxide production might differ between specific cell types.

Mitochondria are important endogenous source of superoxides and hydroxyl radicals [9, 17] and is pivotal in the mechanism for diabetic complications [18]. Reactive oxidant

species can trigger mitochondria to release cytochrome *c*, resulting in activation of apoptotic cascade [19-21]. Mitochondrial changes are associated with the activation of apoptotic pathways resulting in impaired kidney function [22] and myocardial abnormalities [23]. But the involvement of the mitochondrial dysfunction on an experimental model of hypertension and DM was never addressed.

As previously demonstrated by Brownlee and colleagues [24], the excessive production of superoxide has been reported to stimulate several biochemical sequelae of hyperglycemia (protein kinase C, polyol pathway, and advanced glycation pathways). Nevertheless, superoxide generation can have deleterious effects on cells even independent of these pathways. Superoxide also can react with NO to form peroxynitrite, a highly reactive oxidant [25-27], which can result in cytotoxicity due to lipid peroxidation, inactivation of enzymes by oxidation of protein sulfhydryls and nitration of tyrosines, and damage to DNA [28]. The hydroxyl free radical (OH⁻) induces lidip peroxidation and DNA damage by reacting with the ring structure of guanine in DNA. As a result the 8-hydroxy-2'-deoxyhuanosine (80HdG) formed causes chemical alterations of the bases and DNA breakage. Imperfect repair of DNA can lead to mutations, arrest cell cycle or induce apoptosis [29]. Of interest, apoptosis is now described as the main mechanism by which vascular and neuro-glial cells of diabetic retina are lost in the early pathogenesis of DR [31,32].

In the literature, there is no data of the possible effects of arterial hypertension on the redox state of the retina, one of its target organs for microvascular complications. Hypertension has been shown to cause oxidative stress and inflammation in renal and cardiovascular tissues in experimental animals. Previous experimental studies using a

salt-sensitive hypertension model demonstrated that enhancing of glutathione system with dietary N-acetylcysteine administration attenuates the renal damage that normally occurs in this model, indicating that the oxidative stress acts upon the development of hypertension-related microvascular complications [32]. However, the mechanisms involved in the interaction of hypertension exacerbating the toxicity of the hyperglycemia in the target organs, as retina, is not known. Since superoxide production is higher in diabetic retina from hypertensive rats, induced mitochondrial dysfunction leading to apoptosis of retinal cell is expected. The function of mitochondria and its participation on the generation of superoxide anionin a model that combines diabetes and hypertension is under investigation.

In conclusion, we first demonstrated that in an experimental animal model that combines diabetes and hypertension, there is an early and deep imbalance in the redox status, leading to nitration of tyrosine and DNA damage of retinal cells. The redox unbalance is due to increasing in superoxide production in presence of an inadequate antioxidative system. This evidence may contribute to a better understanding of the mechanism of exacerbation of diabetic retinopathy in presence of hypertension.

Acknowledgements - This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and Camila Cerboni Pinto received a scholarship from CAPES. The authors wish to thank Bruno Sevá Pessoa, Elisa B. M. I. Peixoto, Denise Silvia de Souza for assistance in laboratory procedures and Sérgio Magalhães for technical assistance.

Abbreviations:

 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) · Peroxynitrite (ONOO⁻) · Reactive oxygen species (ROS) · Spontaneously hypertensive rat (SHR) · Superoxide dismutase (SOD) · Wistar-Kyoto (WKY)

References

[1] Patz A, Smith RE. The ETDRS and Diabetes 2000. Ophthalmology 1991;98:1755-1756.

[2] Klein R, Klein BAK, Davis MD. Is cigarette smoking associated with diabetic retinopathy? Am. J. Epidemiol. 1983;118:228-238.

[3] Janka HU, Ziegler AG, Valsania P, Warram JH, Krolewski AS. Impact of blood pressure on diabetic retinopathy. Diabete Metab.1989;15(5 Pt 2):333-337.

[4] United Kingdom Prospective Diabetes Study Group. Tight blood pressure control and

risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38.

British Med. Journal 1998;317:703-713.

[5] Armstrong D, Abdella N, Salman A, Miller N, Rahman EA, Bojancyzk M. Relationship

of lipid peroxides to diabetic complications. Comparison with conventional laboratory tests.

J. Diabetes Complications 1992;6:116-122.

[6] Kowluru RA, Tang J, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia:VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy. Diabetes 2001;50:1938-1942.

[7] Kowluru RA, Odenbach S. Effect of long-term administration of α-Lipoic acid on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats. Diabetes 2004;53:3233-3238.

[8] Jain SK. Superoxide dismutase overexpression and cellular oxidative damage in diabetes: A commentary on "Overexpressin of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress". Free Radical Biol. Med.2006; 41:1187-1190.

[9] Du Y, Miller CM, Kern TS. Hyperglycemia increases mitocondrial superoxide in retina and retinal cells. Free Radic Biol. Med. 2003;35:1491-1499.

[10] Silveira LA, Bacchi CE, Pinto GA, De Faria JB. The genetics of hypertension modifies the renal cell replication response induced by experimental diabetes. Diabetes 2002; 51:1529-1534.

[11] Bradford MM. A rapid and sensive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem.1976;72:248-254.

[12] Mezzano S, Droguett A, Burgos ME, Ardiles LG, Flores CA, Aros CA, Caorsi I, Vio CP, Ruiz-Ortega M, Egido J. Renin-angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy. Kidney Int Suppl. 2003;86:S64-S70
[13] Nangaku M, Miyata T, Sada T, Mizuno M, Inagi R, Ueda Y, Ishikawa N, Yuzawa H, Koike H, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Anti-hypertensive agents inhibit in vivo the formation of advanced glycation end products and improve renal damage in a type 2 diabetic nephropathy rat model. J. Am. Soc. Nephrol. 2003;14:1212-1222.
[14] Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. J. Lab. Clin. Med. 1963;16:882-888.

[15] Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NADPH oxidase: role in cardiovascular biology and disease. Circ. Res. 2000;86:494-501.

[16] Du Y, Smith M A, Miller C M, Kern T S. Diabetes-induced nitrative stress in the retina, and correction by aminoguanidine. J. Neurochem. 2002;80:771–779.

[17] Sandbach JM, Coscun PE, Grossniklaus HE, Kokoszka JE, Newman NJ, Wallace

WC. Ocular pathology in mitochondrial superoxide dismutase (SOD2)-deficient mice.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci 2001; 42:2173-2178.

[18] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism.Diabetes 2005;54:1615–1625.

[19] Anuradha CD, Kanno S, Hirano S. Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. Free Radic. Biol. Med. 2001;31:367-373.

[20] Phaneuf S, Leeuwenburg C. Cytochrome c release from mitochondria in the aging heart: a possible mechanism for apoptosis with age. Am. J. Physiol.2002;282:R423-R430.
[21] De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK, Schubert A, Grimm S, Hanson GT, Remington SJ, Youle RJ, Ichas F. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. FASEB J 2002;16:607–609.

[22] Verzola D, Bertolotto MB, Villaggio B, Ottonello L, Dallegri F, Frumento G, Berruti V, Gandolfo MT, Garibotto G, Deferran, G. Taurine prevents apoptosis induced by high ambient glucose in human tubule renal cells. J. Invest. Med.2002;50:443-451.

[23] Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway. Diabetes 2002;51:1938-1948.

[24] Nishikawa T, Edelstein D, Du X L, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek M A, Beebe D, Oates P J, Hammes H P, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature 2000;404:787–790.

[25] Tamir S, Burney S, Tannenbaum SR. DNA damage by nitric oxide. Chem. Res. Toxicol.1996;9:821–827.

[26] Burney S, Caulfield J L, Niles J C, Wishnok J S, Tannenbaum S R. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. Mutat. Res. 1999;424:37–49.

[27] Szabo C, Ohshima H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. Nitric. Oxide1997;1:373–385.

[28] Goldstein I M, Ostwald P, Roth S. Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. Vision Res. 1996;36:2979–2994.

[29] Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke M S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutat. Res.2004;567:1-61.

[30] Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. J. Clin. Invest. 1998;102:783-791.

[31] Joussen AM, Poulaki V, Mitsiades N, Cai WY, Suzuma I, Pak J, Ju ST, Rook SL,

Esser P, Mitsiades CS, Kirchhof B, Adamis AP, Aiello LP. Suppression of Fas-FasL-

induced endothelial cell apoptosis prevents diabetic blood-retinal barrier breakdown in a model of streptozotocin-induced diabetes. FASEB J. 2003;17:76-78.

[32] Tian N, Rose RA, Jordan S, Dwyer TM, Hughson MD, Manning Jr RD. N-

Acetylcysteine improves renal dysfunction, ameliorates kidney damage and decreases

blood pressure in salt-sensitive hypertension. Journal of Hypertension 2006;24:2263-

2270.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. Production of superoxide anion using the lucigenin enhanced method from control and diabetic WKY and SHR rat retinas. Diabetes or hypertension increased

superoxide production (units/min/mg protein) in retina. Bars represent mean±SD. *p< 0.03 vs Wc, $p^{\#} < 0.009$ vs WKY groups. All data shown are of $n \ge 6$ observations.

Figure 2. Concentration of reduced glutathione (GSH) from retina of control and diabetic WKY and SHR rats (μ M glutathione/ μ g of retinal protein). There was a significant decreasing in reduced glutathione levels only in diabetic SHR retina rats. Bars represent mean±SD. **p*<0.04 *vs* Wd.

Figure 3. (A) Representative photomicrograph of immunolocalization of nitrotyrosine in control and diabetic WKY and SHR rat retina. Presence of nitrotyrosine is indicated in brown color. (B) Bars represent mean \pm SD of intensity of nitrotyrosine per retinal section as defined in the Method section. Diabetes and hypertension solely increased tirosyne nitration in retinal tissue and further nitration was observed when both were present. * p< 0.03 vs Wc, # p< 0.02 vs other groups.

Figure 4. (A) Representative photomicrograph of immunohistochemistry for 8-hydroxi-2'deoxiguanosine (8OHdG) from control and diabetic WKY and SHR rat retinas. The 8OHdG positive cells are indicated by arrows. (B) Bars represent mean±SD of score of positivity of 8OHdG per retinal section as defined in Method section. Similarly as observed in figure 4, diabetes or hypertension solely induced DNA damage by oxidative stress and further damage was observed in concomitance of both factors *p=0.02 *vs* Wc; *p<0.0001 *vs* Wc.

Figure 5. (A) Western blot analysis of gp91phox from control and diabetic WKY and SHR rat retinas. The film represents the western blot assay for gp91phox and the bars

represent mean±SD of band densities expressed in arbitrary densitometric units. (B) The membranes were incubated with NOX 4 antibody. The bars represent mean±SD of band densities expressed in arbitrary densitometric units. The membranes were reprobed with anti- β -actin antibody as control for protein loading.

Wc: control WKY, Wd: diabetic WKY, Sc: control SHR, Sd: diabetic SHR.

<text>

Table 1. Physiological characteristics of studied rats.



Wc: control WKY; Wd: diabetic WKY; Sc: control SHR; Sd: diabetic SHR; SBP: systolic blood pressure. *p<0.0001 vs WKY groups, $\pi p<0.0001$ vs respective control groups, p<0.005 vs WKY groups























http://mc.manuscriptcentral.com/gfrr