

MARIANA APARECIDA BRUNINI ROSALES

**USO DO MIMÉTICO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE,
TEMPOL, NA RETINOPATIA DIABÉTICA
EXPERIMENTAL: IMPLICAÇÃO PARA O
DESENVOLVIMENTO DE POSSÍVEIS
TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS DAS
COMPLICAÇÕES RETINIANAS NO DIABETES**

*CAMPINAS
2010*

MARIANA APARECIDA BRUNINI ROSALES

**USO DO MIMÉTICO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE,
TEMPOL, NA RETINOPATIA DIABÉTICA
EXPERIMENTAL: IMPLICAÇÃO PARA O
DESENVOLVIMENTO DE POSSÍVEIS
TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS DAS
COMPLICAÇÕES RETINIANAS NO DIABETES**

*Tese 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: Prof. Dra. Jacqueline Mendonça Lopes de Faria

Co-orientador: Prof. Dr. José Butori Lopes de Faria

CAMPINAS

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R71u Rosales, Mariana Aparecida Brunini
Uso do mimético da supeóxido dismutase, tempol, na retinopatia diabética experimental: Implicação para o desenvolvimento de possíveis tratamentos farmacológicos das complicações retinianas no diabetes / Mariana Aparecida Brunini Rosales. Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Jacqueline Mendonça Lopes de Faria, José Butori Lopes de Faria

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Diabetes Mellitus. 2. Retinopatia Diabética. 3. Hipertensão. 4. Estresse oxidativo. I. Faria, Jacqueline Mendonça Lopes de. II. Faria, José Butori Lopes de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês: The use of mimetic superoxide dismutase, tempol, in diabetic retinopathy experimental: implication for the development of possible pharmacological treatment of retinal complications in diabetes

Keywords: • Diabetes Mellitus
• Diabetic retinopathy
• Hypertension
• Oxidative stress

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

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Jacqueline Mendonça Lopes de Faria
Prof^º. Dr^º. Maria Lucia Cardillo Corrêa Giannella
Prof. Dr. Edson Antunes

Data da defesa: 25-02-2010

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Mariana Aparecida Brunini Rosales

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

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Jacqueline Mendonça Lopes de Faria

2. Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Cardillo Corrêa Giannella

3. Prof. Dr. Edson Antunes

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 25/02/2010

DEDICATÓRIA

À minha família:

Aos meus pais, Silvia e Mário, que embora separados e com personalidades diferentes, sempre serão os responsáveis pelo o que eu sou, pessoal e profissional. Neles encontro a energia para percorrer o meu caminho, sendo minha mãe o meu porto seguro e meu pai a minha essência.

Ao meu avô Raul, médico veterinário e pesquisador aposentado, pelo o apoio nos meus estudos e por ter despertado em mim a curiosidade de pesquisar desde criança.

A Deus por iluminar o meu caminho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, profa. Dra. Jacqueline Mendonça Lopes de Faria, pela orientação, aprendizado, entusiasmo, dedicação, paciência e pela confiança no meu trabalho. Agradeço pelos trabalhos em que fui co-autora e também pelas oportunidades concedidas através de minhas participações em congressos nacionais e internacionais. Embora exista uma grande distância e muitos “*tabus*” na relação entre “*mentor e mentee*”, a nossa experiência de passarmos alguns dias sozinhas no congresso da ARVO de 2009, mostrou-me que atrás do estresse de prazos e resultados, os orientadores são também pessoas como nós, que sentem, se divertem, enfim “vivem” e que na verdade preocupam-se muito com a nossa contribuição para a ciência. Ninguém é igual a ninguém, alguns são mais emotivos, outros são mais racionais, o importante é respeitar a personalidade de cada um para se obter uma convivência pacífica, respeitosa e saudável.

Ao professor José Butori Lopes de Faria, um grande professor e pesquisador, o qual eu admiro muito pela sua ética e honestidade. Agradeço pela contribuição com idéias e soluções inteligentes, encorajamento para não desistir de experimentos que não ocorrem como esperamos e até mesmo com as críticas que com certeza estão sendo responsáveis pela minha construção intelectual. Sou grata pela sua atenção, ensino, respeito e incentivo em definições que surgem em meu raciocínio, como por exemplo, “o bom e o mau óxido nítrico”.

Neste caminho percorrido, também tive a oportunidade de contar com a convivência e colaboração de muitos colegas e amigos de laboratório. Dentre eles, Kamila, Denise, Pérola, Elisa, Bruno, Subrata, Felipe, Camila, Adriana, Fábio, Renata, Christine, Aline, Patrícia, Sandra, Vinícios, Juliana, Lucas e Nicholas. Em especial à minha colega de laboratório e amiga Kamila, pelo carinho, dedicação, ajuda e por me “orientar” de certa forma durante toda a minha trajetória, desde o estágio, treinamento técnico e mestrado.

Ao Sérgio Magalhães e Ismael pela assistência técnica com os cortes histológicos em meus experimentos. À aluna de doutorado do Instituto de Química da Unicamp, Gabriela, pela contribuição na utilização do equipamento *Nitric Oxide Analyzer*.

A todos os amigos e pessoas de fora que passaram pelo meu caminho e outros que ainda continuam e que compartilharam *MOMENTOS* me dando força, coragem, entusiasmo, e até mesmo sendo ouvinte sobre os meus experimentos com os ratinhos e os tratamentos de finais de semana. Agradeço também por compreenderem minha ausência em certos eventos e a minha emoção em certas circunstâncias devido ao nervosismo da defesa e da tese.

A toda minha família, pais, avós, tios, primos e padrinhos pelo carinho, amor, respeito, apoio e reconhecimento de meu trabalho.

A todos aquele que não foram citados, mas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À FAPESP e CAPES, pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

"Os olhos são os senhores da astronomia e os autores da cosmografia; eles desvendam e corrigem toda a arte da humanidade; conduzem os homens às partes mais distante do mundo; são os príncipes da matemática, e as ciências que os têm por fundamento são perfeitamente corretas. Os olhos medem a distância e o tamanho das estrelas; encontram os elementos e suas localizações; eles... deram origem à arquitetura, à perspectiva, e à divina arte da pintura... Que povos, que línguas poderão descrever completamente sua função! Os olhos são a janela do corpo humano pela qual ele abre os caminhos e se deleita com a beleza do mundo".

(autor desconhecido)

SUMÁRIO

RESUMO	xxxv
ABSTRACT	xli
1. INTRODUÇÃO	47
1.1. Diabetes mellitus	49
1.1.1. Conceito.....	49
1.1.2. Epidemiologia.....	50
1.2. Hipertensão Arterial	53
1.2.1. Conceito.....	53
1.2.2. Epidemiologia.....	54
1.3. Retina	57
1.3.1. A retina	57
1.3.2. A retina neuro glial	57
1.3.3. A retina vascular	58
1.4. Retinopatia Diabética	61
1.4.1. Conceito.....	61
1.4.2. Alterações clássicas da retinopatia diabética.....	61
1.4.3. Processos envolvidos nas alterações neurais e vasculares da retina diabética	65
1.4.4. Epidemiologia.....	67
1.4.5. Fatores de risco	68
1.5 Estresse Oxidativo	71
1.5.1. O estresse oxidativo.....	71
1.5.2. Espécies reativas.....	72
1.5.3. Lesão tecidual oxidativa	73
1.5.4. Estresse oxidativo na hiperglicemia	74

1.5.5. A indispensável discussão sobre a função do óxido nítrico	75
1.5.6. O sistema antioxidante	78
1.5.7. O potencial efeito antioxidante dos nitróxidos	81
1.5.8. Estresse oxidativo e a Retinopatia Diabética.....	82
1.6. Poli (ADP-ribose) polimerase (PARP).....	84
1.7. Tempol.....	87
2. OBJETIVOS	91
3. MATERIAIS E MÉTODOS	95
3.1. Animais	97
3.2. Procedimentos	98
3.2.1. Peso dos Animais	98
3.2.2. Medida da pressão arterial sistólica	98
3.2.3. Indução de <i>diabetes mellitus</i>	98
3.2.4. Glicemia	99
3.2.5. Preparo do TEMPOL	99
3.2.6. Preparo dos globos oculares para estudos de imunohistoquímica	100
3.2.7. Extração de proteína retiniana para ensaios de Western Blot	100
3.3. Experimentos	101
3.3.1. Western blot para quantificação da expressão protéica de GFAP, FN, Cu-Zn SOD, PARP and iNOS em tecido retiniano	101
3.3.2. Imunohistoquímica para detecção de proteína acídica fibrilar glial (GFAP) na retina	102
3.3.3. Imunohistoquímica para detecção de nitrotirosina (NT)	102
3.3.4. Imunohistoquímica para detecção de poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)	103
3.3.5. Detecção do ânion superóxido	104
3.3.6. Quantificação dos níveis dos produtos finais do óxido nítrico (NO _x ⁻) em tecido de retina	104

3.3.7. Quantificação dos níveis de glutathiona reduzida através de ensaio colorimétrico	105
3.3.8. Atividade da Cu-Zn superóxido dismutase (SOD)	106
3.3.9. Análise estatística	106
4. RESULTADOS	107
4.1. Características fisiológicas dos animais estudados	109
4.2. Observação da presença de marcadores precoces da retinopatia diabética	109
4.3. Avaliação dos sistemas oxidativo e antioxidante em tecido de retina	111
4.4. Detecção da lesão oxidativa no tecido retiniano	115
4.5. Investigação das possíveis vias envolvidas no mecanismo de proteção retiniana conferida pelo TEMPOL	117
4.6. A expressão da oxido nítrico sintase induzida (iNOS)	119
5. DISCUSSÃO	121
6. CONCLUSÃO	129
7. PERSPECTIVAS	133
8. REFERÊNCIAS	137
9. APÊNDICE	155
Artigo I. A decrease in retinal progenitor cells is associated with early features of diabetic retinopathy in a model that combines diabetes and hypertension	157
Artigo II. Diabetic retinal neurodegeneration is associated with mitochondrial oxidative stress and is improved by an angiotensin receptor blocker in a model combining hypertension and diabetes	169
Artigo III. Exogenous SOD mimetic tempol ameliorates the early retinal changes reestablishing the redox status in diabetic hypertensive rats	179

LISTA DE ABREVIATURAS

8-OHdG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
ADP	adenosina fosfato
AGE	advanced glycation end product (produtos finais da glicosilação avançada)
AIF	apoptosis-induced factor (proteína indutora de apoptose)
ANG II	angiotensina II
BH4	tetrahidrobiopterina
BM	basement membrane (membrana basal)
BRB	blood-retinal barrier (barreira hemato retiniana)
cGMP	cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (guanosina-3',5' monofosfato cíclico)
Cu/Zn SOD	cobre/zinco superóxido desmutase
DAB	diaminobenzidina
Dnm	dinamina
DM	diabetes mellitus
ECM	extracellular matrix (matriz extra celular)
e-NOS	endothelial nitric oxide synthase (óxido nítrico sintetase endotelial)
EPR	electron paramagnetic resonance (ressonância paramagnética eletrônica)
ESAM	endothelial cell selective adhesion molecule (molécula de adesão seletiva de célula endotelial)
ET	endotelina
Flot	flotilina
FN	fibronectina
GC	guanilato ciclase

GFAP	glial fibrillary acidic protein (proteína acídica fibrilar glial)
GSH	glutathiona reduzida
GSSH	glutathiona oxidada
GTP	guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HA	hipertensão arterial
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HOCl	ácido hipocloroso
iNOS	inducible nitric oxide synthase (óxido nítrico sintase induzida)
IDF	International Diabetes Federation (Federação Internacional do Diabetes)
JAMs	Junction adhesion molecules (moléculas de adesão de junção)
MEF2	myocyte enhancer factor-2 (fatores de transcrição de regulação da miogênese e morfogênese dos miócitos)
MnSOD	manganês superóxido desmutase
NAC	N-acetil-cisteína
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	nicotinamida adenine dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NF-κB	nuclear factor kappa B (fator de transcrição nuclear-κB)
NMDA	N-metil-D-aspartico
n-NOS	neuronal nitric oxide synthase (óxido nítrico sintetase neuronal)
NO	óxido nítrico
NO [•]	radical óxido nítrico
NOS	nitric oxide synthase (óxido nítrico sintetase)
O ₂ ^{•-}	radical superóxido

OH [•]	radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	peroxinitrito
PA	pressão arterial
PAD	pressão arterial diastólica
PAS	pressão arterial sistólica
PAR	polímeros de ADP-ribose
PARP	poli (ADP-ribose) polimerase
PKC	proteína quinase C
PV	plasmalemma vesicle-associated protein (proteína associada à vesícula de plasmalema)
RD	retinopatia diabética
RDNP	retinopatia diabética não proliferativa
RDP	retinopatia diabética proliferativa
RNS	reactive nitrogen species (espécies reativas do nitrogênio)
ROS	reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio)
RPM	rotação por minuto
SHR	Spontaneously Hypertensive Rats (ratos espontaneamente hipertensos)
SOD	superóxido desmutase
TEMPOL	4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidine-1-oxil
VEGF	vascular endothelial growth factor (fator de crescimento endotelial vascular)
WKY	Wistar Kyoto (ratos normotensos)
ZO-1	zônula ocludente

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Importantes espécies reativas no sistema biológico	73
Tabela 2. Defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas	81
Tabela 3. Características fisiológicas dos animais estudados	109

Figura 1. Principais complicações crônicas encontradas no DM	49
Figura 2. Prevalência de pessoas acometidas pelo DM nos diversos continentes no ano de 2000	51
Figura 3. Prevalência estimada do DM (20-79 anos de idade) por região: 2010 e 2030	52
Figura 4. Impacto previsto do custo nacional do DM nos EUA: 2002-2020	53
Figura 5. Prevalência dos casos de HA mundial em pessoas com 20 anos ou mais de acordo com a região e o sexo no ano de 2000 e a prevalência para 2025	55
Figura 6. Prevalência de HA no Brasil	56
Figura 7. Diagrama do circuito básico da retina	58
Figura 8. Representação esquemática demonstrando as principais artérias da circulação orbital	59
Figura 9. Esquema de localização de proteínas envolvidas no transporte intracelular e paracelular na barreira hemato-retiniana	60
Figura 10. Quebra da barreira hemato retiniana	61
Figura 11. Imagem que simula a visão do portador degeneração macular	62
Figura 12. Diagramas esquemáticos de corte transversal da retina externa normal e com espessamento da membrana basal e corte histológico	62

Figura 13. Fotos representativas de perda de pericito e capilares acelulares retinianos	63
Figura 14. Foto representativa de aumento da permeabilidade capilar e microaneurismas	63
Figura 15. Alterações vasculares encontradas na progressão da RD	64
Figura 16. Fotografias de fundo-de-olho humano através de um oftalmoscópio	65
Figura 17. Prevalência de RD e RD proliferativa em pacientes com DM tipos 1 e 2	68
Figura 18. Efeito do tratamento intensivo na progressão da RD em pacientes DM tipo 1	69
Figura 19. Tratamento intensivo da pressão arterial reduz a chance da progressão da RD em pacientes hipertensos e DM tipo 2	70
Figura 20. Balança ilustrativa do conceito de estresse oxidativo	71
Figura 21. Dismutação do anion radical superóxido espontânea e catalisada pela enzima SOD-1	79
Figura 22. Maiores reações pró-oxidantes-antioxidantes relevantes no sistema Biológico	80
Figura 23. A intensa poli ADP-ribosilação resulta em níveis elevados de apoptose	86
Figura 24. Estrutura molecular do TEMPOL	88
Figura 25. A redução da forma oxidada (TEMPOL) para a forma reduzida (TEMPOL-H) pelo ácido ascórbico	90
Figura 26. Expressão de GFAP em extrato de retina e imunoreatividade em corte histológico de retina	110

Figura 27. Expressão de FN em extrato retiniana	111
Figura 28. Produção de superóxido total em tecido de retina obtida pelo método quimioluminescente da lucigenina	112
Figura 29. Quantificação de produtos estáveis da oxidação do NO	113
Figura 30. A expressão e a atividade da Cu-Zn SOD em extrato de retina	114
Figura 31. Concentração de glutathiona reduzida (GSH) da retina dos ratos estudados	115
Figura 32. Fotomicrografia representativa da imunoreatividade da NT em corte histológico da retina	116
Figura 33. Atividade e imunolocalização da PARP estimada pela detecção dos polímeros de poli ADP-ribose em extrato de retina	118
Figura 34. Expressão da i-NOS em extrato de retina	119
Figura 35. Esquema proposto para demonstrar os mecanismos envolvidos nos benefícios conferidos pelo TEMPOL no grupo DM-SHR nos parâmetros estudados	127

A retinopatia diabética (RD) é a principal causa de cegueira adquirida em adultos em idade produtiva nos países desenvolvidos. A hipertensão (HA) é um importante fator de risco associado ao desenvolvimento da RD. O estresse oxidativo pode explicar como a hiperglicemia inicia os processos bioquímicos envolvidos na patogênese da RD. A retina possui vários mecanismos de defesa para minimizar o estresse oxidativo como “scavengers” de baixo peso molecular e sistemas enzimáticos. Sob condições do diabetes (DM), ocorre um aumento das espécies reativas, como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e óxido nítrico (NO^{\bullet}), conseqüentes da indução da reação da glicação. O produto desta reação, peroxinitrito ($ONOO^-$), pode diretamente causar lesões em proteínas, lipídios e DNA. Embora muitos mecanismos patológicos da RD sejam focados nos danos vasculares, tem sido descrito que o DM também induza danos nas células de Müller da retina neural que pode anteceder as anormalidades vasculares. A neurodegeneração retiniana pode ser detectada pelo aumento da imunoreatividade da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) em astrócitos e em células de Muller. O acúmulo de matriz extracelular (ECM) é instrumental para a quebra de barreira hemoretiniana da retina presente precocemente na patogênese da RD. O objetivo deste estudo foi investigar a eficácia do antioxidante tempol, mimético da superóxido dismutase (SOD), na prevenção das alterações precoces na retina de um modelo de RD que combina hipertensão e diabetes. Foram utilizados neste estudo ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seu controle normotenso (WKY) com 4 semanas de idade. O diabetes foi induzido experimentalmente através de injeção intravenosa de estreptozotocina. Após a confirmação da indução do DM, os ratos SHR (DM-SHR) foram randomizados para receber ou não tratamento com injeção de tempol intraperitonealmente (DM-SHR-tempol). Após 20 dias, os ratos foram eutanaziados e suas retinas foram coletadas para extração de proteínas, ensaios colorimétricos e imunohistoquímica. Os animais diabéticos apresentaram os marcadores precoces de RD: houve aumento da expressão do GFAP no grupo SHR e DM-SHR comparado ao grupo WKY e aumento da FN no grupo DM-SHR comparado ao SHR e WKY. O balanço oxidativo, avaliado pela produção de superóxido e pelos produtos finais do óxido nítrico, assim como a defesa antioxidante, estimada pela expressão e atividade da Cu/Zn SOD, revelou um desequilíbrio acentuado no grupo DM-SHR em relação ao grupo SHR e WKY. Como resultado, o produto peroxinitrito detectada por imuno-histoquímica para nitrotirosina (NT) foi maior no grupo DM-SHR. A atividade da enzima poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) detectada pela ribosilação, e a super regulação da expressão da

óxido nítrico sintase induzida (iNOS) foram exacerbadas neste grupo. A administração do TEMPOL impediu o dano oxidativo, reduziu a ativação exacerbada da PARP e diminuiu os níveis de i-NOS nos ratos DM-SHR. Como consequência, os marcadores estruturais precoce da RD, GFAP e FN, foram prevenidos pelo TEMPOL. Estes resultados fornecem uma base racional para o desenvolvimento com fins farmacológicos do TEMPOL na prevenção e tratamento da RD.

ABSTRACT

Diabetic retinopathy (DR) is the leading cause of blindness among working-age adults in developed countries. Hypertension (HA) is an important risk factor associated with the development of DR. Oxidative stress may explain how the hyperglycemia initiates the biochemical processes involved in the pathogenesis of DR. The retina has several defense mechanisms to minimize oxidative stress as scavengers of low molecular weight and enzyme systems. Under conditions of diabetes (DM), there is an increase of reactive species such as superoxide ($O_2^{\cdot -}$) and nitric oxide (NO^{\cdot}), induced by glycation reaction. The product of this reaction, peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$), can directly damage proteins, lipids and DNA. Although many pathologic mechanisms of DR have been focused on vascular damage, it has been reported that DM also induces damage in nonvascular retinal neurons of Müller cells occurred prior to vascular abnormalities. The retinal neurodegeneration can be detected by increased immunoreactivity of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in astrocytes and Muller cells. The extracellular matrix accumulation (ECM) is instrumental to blood retinal barrier breakdown present in early pathogenesis of DR. The objective of this study was to investigate the efficacy of the antioxidant TEMPOL, mimetic of superoxide dismutase (SOD) in the prevention of early changes in the retina in a model that combines hypertension and diabetes. Four-week-old spontaneously hypertensive rats (SHR) and their normotensive control (WKY) were used in this research. Diabetes was induced experimentally by intravenous injection of streptozotocin. SHR diabetic (DM-SHR) rats were randomized to receive or not treatment with intraperitoneal injection of tempol (DM-SHR-tempol). After 20 days, the rats were euthanized and their retinas were collected for protein extraction, colorimetric assays and immunohistochemistry. The presence of exacerbated early markers of DR was detected by increased GFAP expression in SHR and SHR-DM group compared to WKY and FN in group DM-SHR compared to SHR and WKY. The oxidative balance, evaluated by superoxide production and nitric oxide end-product levels and the counterpart antioxidant defense, estimated by the expression and activity of Cu / Zn SOD showed a marked unbalance in DM-SHR group compared to SHR and WKY group. As a result, the product peroxynitrite detected by immunohistochemistry for nitrotyrosine (NT) was higher in the DM-SHR. The activity of the enzyme poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) detected by ribosylation, and the upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression were exacerbated in this group. The administration of TEMPOL prevented the oxidative damage, reduced the exacerbated activation of PARP and decreased iNOS levels in DM-SHR rats. As a result, the

structural markers of early RD, GFAP and FN, were prevented by tempol. These findings provide a rationale for the development with pharmacological purposes of tempol in the prevention and treatment of DR.

1.1 - Diabetes mellitus

1.1.1 – Conceito

Diabetes mellitus (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla caracterizada pela hiperglicemia crônica, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos resultando em distúrbios do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. As conseqüências do DM à longo prazo incluem danos, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente rins, olhos, nervos, coração e vasos sanguíneos. O DM pode ser classificado tipo 1 e tipo 2, DM gestacional e “outros tipos de DM” (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003).

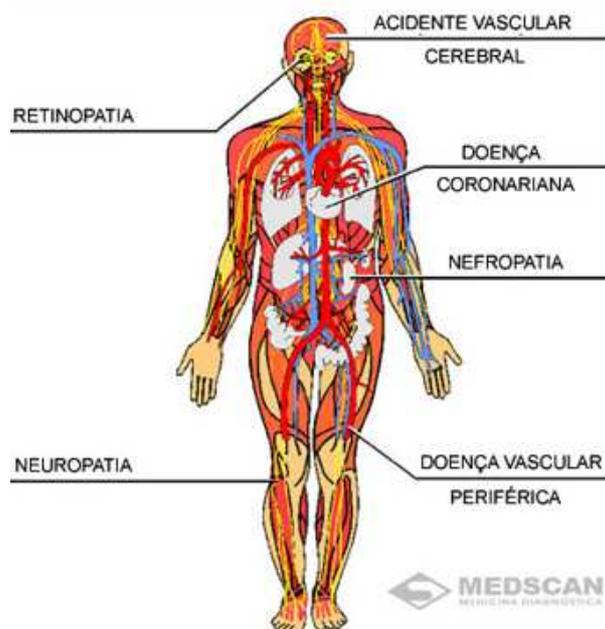


Figura 1. Principais locais das complicações crônicas encontradas no DM. Se não tratadas, estas complicações podem levar à cegueira, amputação de membros, diálise renal, infarto do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais.

O DM tipo 1, caracteriza-se por um déficit da secreção de insulina (pouca ou nenhuma) resultante primeiramente da destruição das células beta das ilhotas de Langerhans pancreáticas produtoras de insulina por processos auto-imunes ou idiopáticos (causa desconhecida). Apresenta tendência a cetoacidose, processo pelo qual o fígado, quebra gorduras e proteínas em resposta a uma necessidade percebida de substrato respiratório quando não há insulina para

captação de glicose intracelular. O DM tipo 1 corresponde de 5% a 10% dos casos totais, a qual se apresenta mais freqüentemente entre jovens e crianças sendo mais freqüente antes dos 20 anos de idade, mas pode se desenvolver em qualquer faixa etária e não está associada à obesidade (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2009).

O DM tipo 2 é resultante, em geral, de graus variáveis de resistência à insulina (diminuição na resposta dos receptores de glicose presentes no tecido periférico à insulina) e deficiência relativa de secreção de insulina (secreção de insulina inadequada em relação aos níveis plasmáticos de glicose). As células beta do pâncreas aumentam a produção de insulina e, ao longo dos anos, a resistência à insulina acaba por levar as células beta à exaustão. Não ocorre destruição auto-imune das células beta. Embora a resistência à insulina pareça ser hereditária, a maioria dos pacientes são obesos e há uma forte contribuição da obesidade para o seu desenvolvimento. A cetoacidose ocorre apenas em situações especiais, como durante infecções graves. Aproximadamente 90% a 95% dos pacientes com diabetes têm DM tipo 2 no nosso país. Desenvolve-se freqüentemente em etapas adultas da vida, comumente diagnosticado após os 30 anos de idade. Mas, atualmente, cada vez mais se observam crianças e adolescentes com diabetes tipo 2, caracterizando esta doença como uma associação aos hábitos alimentares e estilo de vida. (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2009).

1.1.2 – Epidemiologia

O DM já era conhecido antes da era cristã, foi descrito pelo médico Hesy-Ra no papiro de Ebers (um dos tratados médicos mais antigos e importantes que se conhece) descoberto no Egito, correspondente ao século XV antes de Cristo, onde se descreveram sintomas típicos desta doença, porém sem nomeá-la (Canadian Diabetes Association, 2005-2009).

Atualmente, o DM alcançou uma proporção epidêmica e transformou-se em um dos desafios de saúde pública do século XXI nos países desenvolvidos e em desenvolvimento,

devido às complicações que comprometem a produtividade, qualidade de vida e sobrevivência dos indivíduos, além de envolver altos custos no seu tratamento.

De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF), a prevalência da doença afeta mais de 285 milhões de pessoas no mundo e estima-se que se o atual índice de crescimento continuar, o número total de pessoas com diabetes no mundo deve ultrapassar 435 milhões em 2030, valor maior à população da América do Norte (International Diabetes Federation, 2009). No ano de 2000, os 10 países com maior número de pessoas com DM em ordem crescente foram: Índia, China, Estados Unidos (EUA), Indonésia, Japão, Paquistão, Rússia, Brasil, Itália, Bangladesh (Wild e cols., 2004).

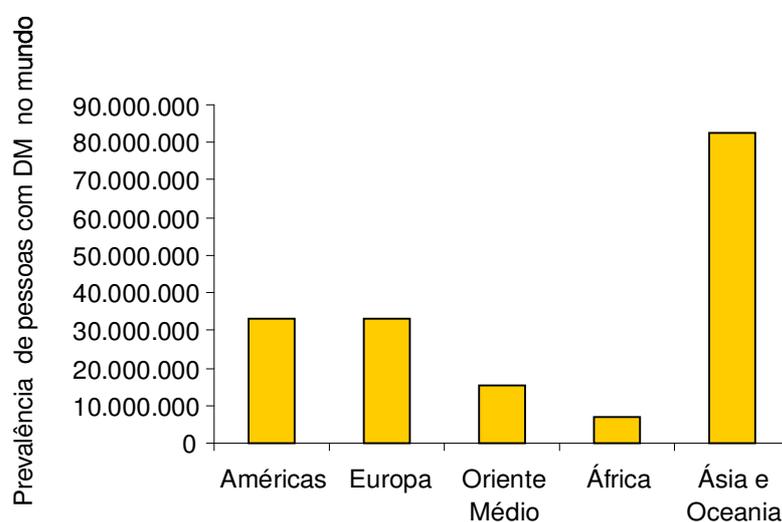


Figura 2. Prevalência de pessoas acometidas pelo DM nos diversos continentes no ano de 2000 (Wild e cols., 2004).

O DM está em quarto lugar entre as doenças que mais matam no mundo, à cada 10 segundos uma pessoa morre de causas relacionadas ao DM (Kowluru e Chan, 2007). Estima-se que para o ano de 2010, a Ásia represente 61% do número global total previsto de pessoas com DM, não só porque é o continente mais populoso do planeta, mas também por causa do aumento da urbanização e da melhora da expectativa de vida. Espera-se que a Índia, China e os EUA apresentem o maior número de pessoas com DM em 2030 (Mitchell e Foran, 2008). O Brasil se apresenta em quinto lugar na lista com a taxa de prevalência de 7,6 milhões de casos valor comparável ao dos países mais desenvolvidos (International

Diabetes Federation, 2009) e situa-se entre as dez causas de mortalidade (Malerbi e Franco, 1992).

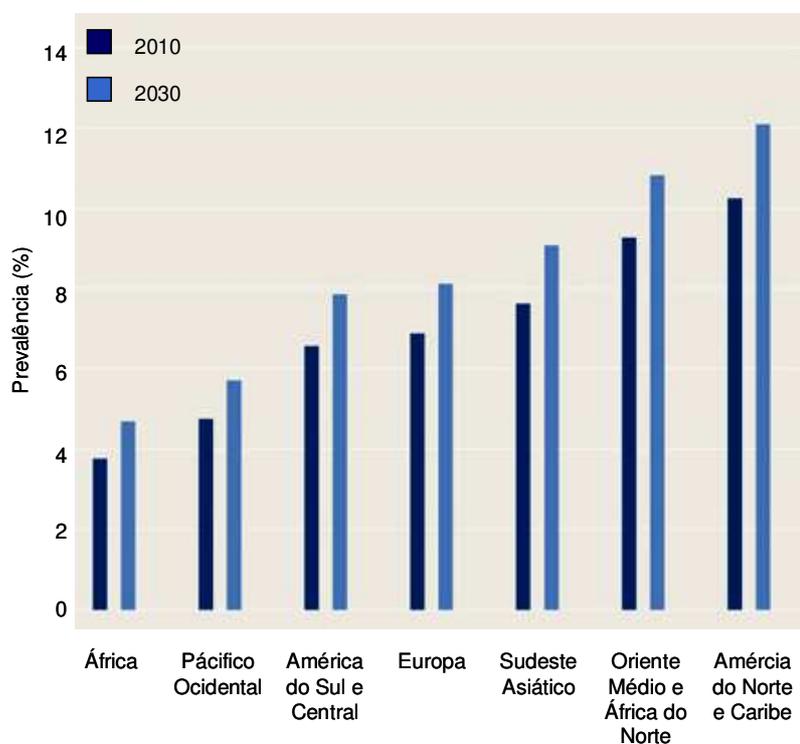


Figura 3. Prevalência (%) estimada do DM (20-79 anos de idade) por região, 2010 e 2030. (Diabetes Atlas, 4th edition. International Diabetes Federation, 2009).

Entretanto, é na sua morbidade que se concentra o maior impacto sócio-econômico. O IDF prevê que o DM vai custar para a economia mundial pelo menos US\$376 bilhões em 2010, ou 11.6% do total de gastos de saúde. Em 2030, este número é projetado para mais de US\$490 bilhões. Mais de 80% dos gastos com DM são efetuados em países ricos e não em países pobres, onde vivem 70% das pessoas com DM. Os EUA contabilizam \$198 bilhões ou 52.7% do total de investimento mundial com diabetes. A Índia, que possui maior população diabética, gasta US\$2.8 bilhões ou 1% do total global (International Diabetes Federation, 2009).

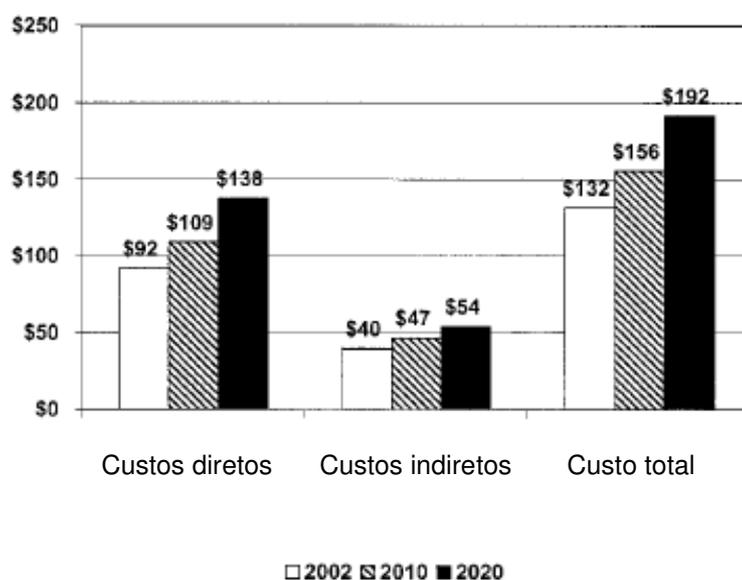


Figura 4. Impacto previsto sobre do custo nacional do DM nos EUA: 2002-2020 (em 2002 milhões de dólares). (Diabetes Care, 2003).

1.2 - Hipertensão Arterial

1.2.1 – Conceito

A hipertensão arterial (HA), ou pressão arterial elevada, 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, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e com base nos valores da pressão arterial, permite classificar nos seguintes níveis:

*PAS	**PAD	NÍVEL
< 120	<80	Ótima
< 130	< 85	Normotenso
130-139	85- 89	Normotenso limítrofe
140 -159	90 - 99	Hipertensão leve
160-179	100-109	Hipertensão moderada
> 179	> 109	Hipertensão grave
> 140	< 90	Hipertensão sistólica ou máxima

* PAS - pressão arterial sistólica; ** PAD - pressão arterial diastólica

A elevação anormal da pressão arterial pode causar lesões em diferentes órgãos do corpo humano, tais como cérebro, coração, rins e olhos. Mas, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) não pode ser vista apenas pelo aspecto da tensão elevada. Na verdade a HAS existe num contexto sindrômico, com alterações hemodinâmicas, tróficas e metabólicas, entre as quais a própria elevação dos níveis tensionais, a dislipidemia, resistência insulínica, obesidade centrípeta, a microalbuminúria, a atividade aumentada dos fatores de coagulação, a redução da complacência arterial e a hipertrofia com alteração da função diastólica do ventrículo esquerdo (Mano, 2009).

1.2.2 – Epidemiologia

A HA é um importante desafio público para a saúde mundial. A prevalência aumenta conforme o aumento da idade da população. Dados sugerem que indivíduos que são normotensos aos 55 anos de idade possuem um risco de 90% de desenvolver a HA (Vasan e cols., 2002).

Mundialmente, 26,4% da população adulta em 2000 apresentaram HA (26,6% dos homens e 26,1% das mulheres) e estima-se que a prevalência seja de 29,2% até 2025 (29,0% dos homens e 29,5% das mulheres). O número estimado de adultos com HA em 2000 foi de 972 milhões, sendo 333 milhões em países economicamente desenvolvidos e 639 milhões em países em desenvolvimento. Para o ano de 2025, foi previsto um aumento de 60%, 1,56 bilhões de casos (Kearney e cols., 2005).

Atualmente, os EUA apresenta cerca de 50 milhões de indivíduos e mundialmente há aproximadamente 1 bilhão de indivíduos com pressão arterial elevada (Chobanian e cols., 2003). Nos diferentes países da América Latina, a porcentagem varia entre 26% e 42% na população adulta (Burlando e cols., 2004).

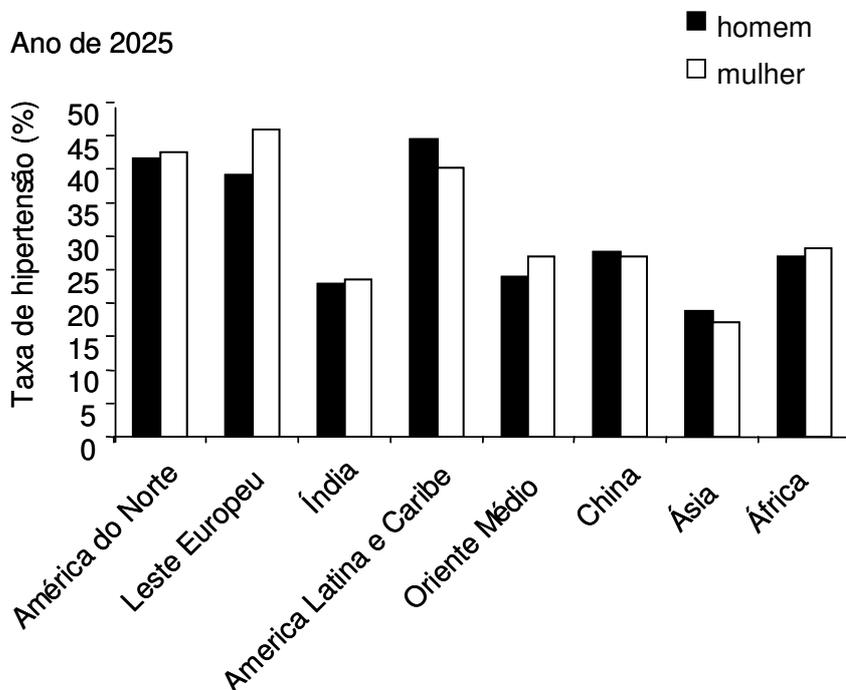
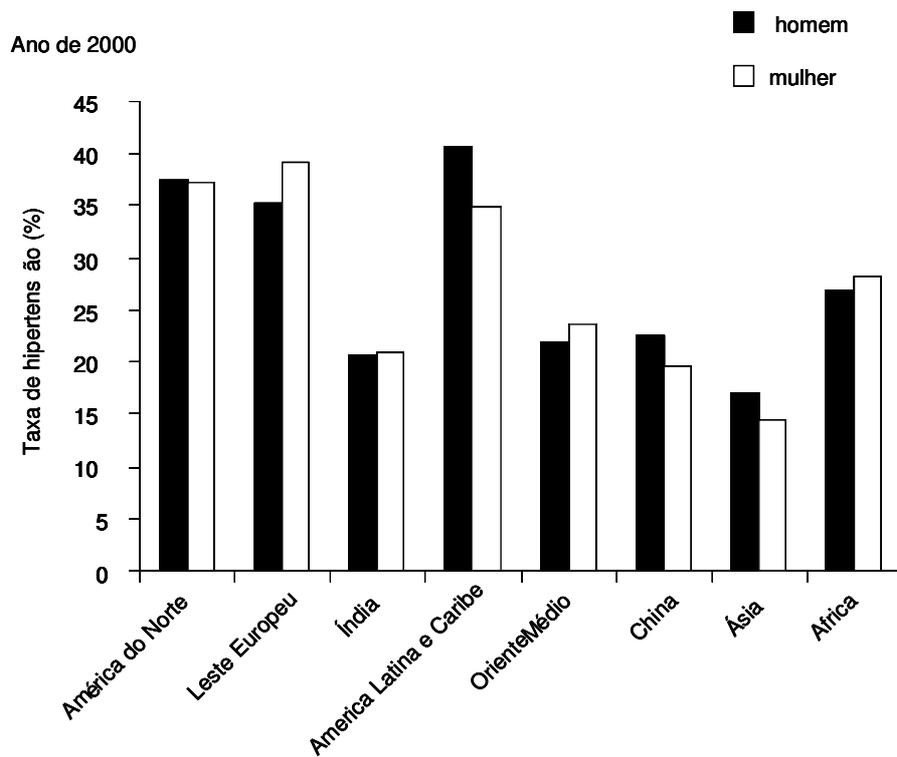


Figura 5. Prevalência dos casos de hipertensão mundial em pessoas com 20 anos ou mais de acordo com a região e o sexo no ano de 2000 (acima) e a prevalência para 2025 (abaixo) (Kearney e cols., 2005).

No Brasil há 17 milhões de portadores de HA, 35% da população de 40 anos e mais. E esse número é crescente; seu aparecimento está cada vez mais precoce e estima-se que cerca de 4% das crianças e adolescentes também sejam portadoras (Lessa, 2001). Há inquéritos de base populacional realizados em algumas cidades do Brasil que apontam alta prevalência. Utilizando-se o critério atual de diagnóstico de HA ($\geq 140/90$ mmHg), as taxas de prevalência na população urbana adulta brasileira em estudos selecionados variam de 22,3% a 43,9% (Freitas e cols., 2001; Fuchs e cols., 1995; Lolio, 1990; Martins e cols., 1997; Rego e cols., 1990; Ayres, 1991).

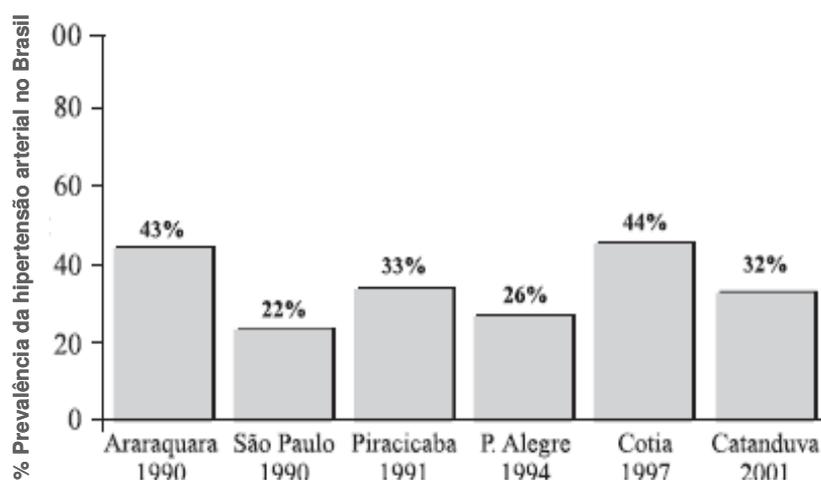


Figura 6. Prevalência de hipertensão arterial no Brasil. Estudos populacionais para pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg (Freitas e cols., 2001; Fuchs e cols., 1995; Lolio, 1990; Martins e cols., 1997; Rego e cols., 1990; Ayres, 1991).

A associação entre a HA e o risco de doenças cardiovasculares é consistente e independente de outros fatores de risco. Segundo a OMS, a doença cardiovascular é responsável por um terço das mortes no mundo (World Health Organization, 2002). O estudo realizado por Chobanian e cols. (2003), demonstrou que a HA aumenta a chance de infarto do miocárdio, parada cardíaca, acidente cerebral vascular e doença renal. A OMS relata que 62% de doenças cérebro-vasculares e 49% das doenças isquêmicas do coração são atribuídas ao controle pressórico (World Health Report, 2002). A HA também coexiste com outros fatores de risco cardiovasculares como o uso do tabaco, diabetes, hiperdislipidemia e obesidade. Mundialmente, estes fatores de risco são inadequadamente abordados em pacientes com HA, resultando em alta morbidade e mortalidade.

A sociedade americana do coração (American Heart Association) demonstrou que em 2007 os EUA gastou \$64,9 bilhões de dólares, 69,4 bilhões em 2008 e estima-se que este custo atinja \$73.4 bilhões no ano de 2009 (Heart Disease and Stroke Statistics, 2009).

1.3 – Retina

1.3.1 – A Retina

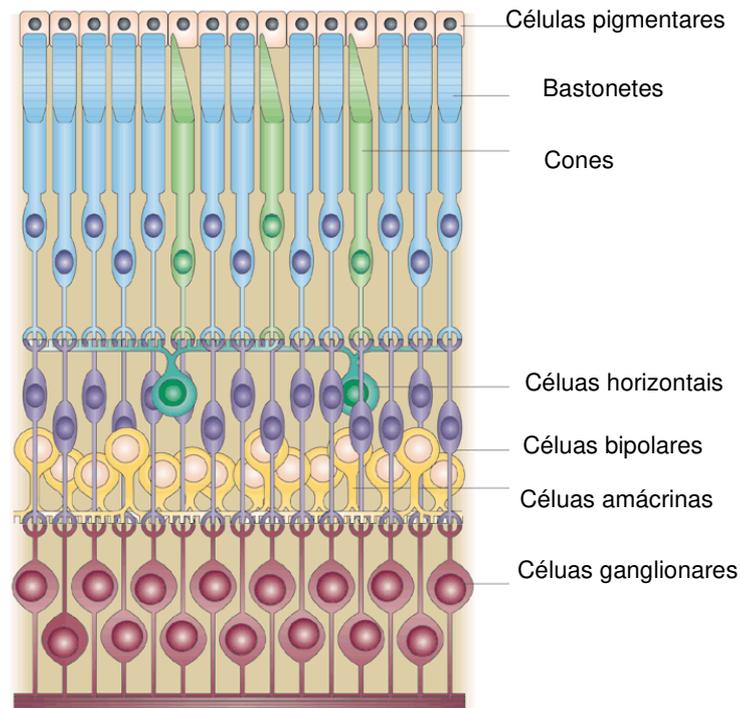
A retina é a camada mais interna do globo ocular, possui cerca de 0,5 mm de espessura e é responsável pela visão. Possui células sensíveis à estimulação luminosa e responsáveis por enviar as imagens ao cérebro.

Durante a embriogênese, o desenvolvimento e a diferenciação da retina, exige a concomitante formação de elementos neuronais e gliais, juntamente com uma densa rede vascular. Em adultos, esses três compartimentos interagem entre si para manter a estrutura e função da retina normal (Provis, 2001; Saint-Geniez e D'Amore, 2004).

1.3.2 – A Retina Neuro Glial

A retina é composta por 10 camadas: membrana limitante interna, camada de fibras nervosas, camada de células ganglionares, plexiforme interna, nuclear interna, plexiforme externa, os fotorreceptores (nuclear externa, segmento interno e o externo) e epitélio pigmentado da retina. A camada dos fotorreceptores é composta de células chamadas cones e bastonetes. Essas células estão próximas à superfície externa da retina e a luz, para atingi-la, deve atravessar toda a cavidade vítrea e a retina interna. Após a fotorrecepção, o sinal é conduzido para as células bipolares, (camada nuclear interna), que transmitem os sinais para a camada de células ganglionares, cujos axônios que chegam ao cérebro se agrupam na superfície interna da retina para formar o nervo óptico. As células horizontais também recebem informações dos fotorreceptores e influenciam as células bipolares enquanto as células amácrinas influenciam a excitabilidade das células ganglionares. O nervo óptico também contém os vasos sanguíneos que irrigam as camadas internas da retina. Ele situa-se

no centro da retina e possui cerca de 2 x 1,5 mm de diâmetro. A camada mais externa da retina é o epitélio pigmentado da retina, o qual está em íntimo contato com os segmentos externos dos fotorreceptores. A retina também possui colunas de sustentação, compostas pelas células gliais (ou fibras de Müller), que sustentam o metabolismo dos neurônios da retina (Cormack, 1996; Heegand, 1997).



Nature Reviews

Figura 7. Diagrama do circuito básico da retina. Os sete principais tipos de células neurais encontradas na 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 (Livesey e Cepko, 2001).

1.3.3 – A Retina Vascular

O suprimento sanguíneo da retina advém de dois sistemas circulatórios distintos: sistema retiniano e sistema uveal. O sistema retiniano origina a partir da artéria central da retina, e o sistema uveal origina a partir das artérias ciliares posteriores, ambos são ramos da artéria oftálmica (ramo direto da carótida interna).

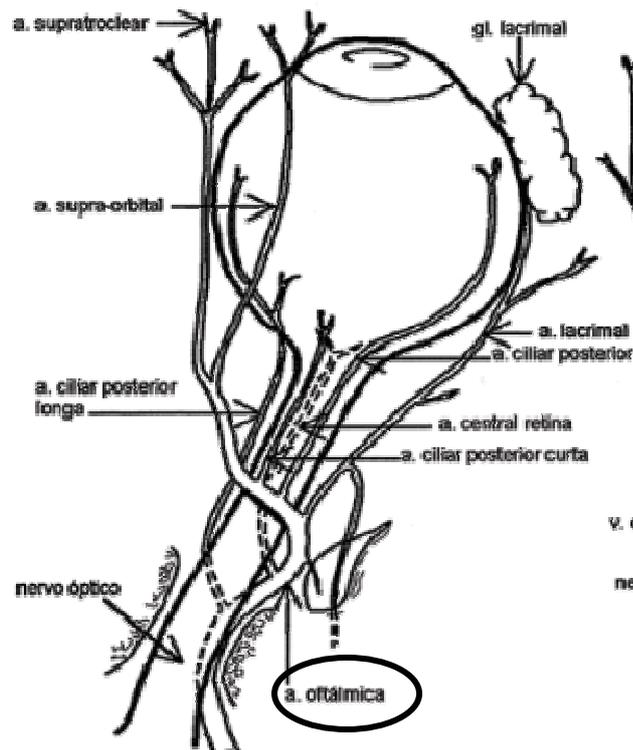


Figura 8. Representação esquemática demonstrando as principais artérias da circulação orbital. Artéria oftálmica, origem de ramificações das artérias: ciliar posterior e artéria central.

O suporte para a retina externa é dado por difusão através dos vasos da coróide que estão adjacentes ao epitélio pigmentar da retina. Juntos, os vasos da retina e o epitélio pigmentar formam a barreira hemato-retiniana (blood-retinal barrier, BRB), uma forte barreira contra macromoléculas, fazendo da retina neural um tecido imunologicamente privilegiado e propiciando mecanismo para controlar fluxo de fluidos e metabólitos. Os capilares são revestidos por uma membrana basal que ancora suas células endoteliais à matriz intersticial adjacente. O endotélio dos capilares é rodeado, em intervalos irregulares, por células chamadas pericito. Há controvérsias se os pericitos exercem papel regulador no fluxo sanguíneo dos capilares, pós-capilares e vênulas, mas a presença de actina, miosina e tropomiosina sugere capacidade contrátil (Schroder e cols., 1990).

Os vasos da retina de humanos e animais são caracterizados por células endoteliais contínuas, não fenestradas, com junções intercelulares impermeáveis, que se apresentam para formar a BRB. A interação entre as células endoteliais forma a barreira que permite ao tecido, assim como ao endotélio capilar e ao epitélio pigmentar da retina, criarem condições para um tecido com integridade funcional. Há duas vias de permeabilidade vascular, o

transporte paracelular o qual envolve as proteínas de junções e o transporte transcelular mediado por vesículas endocíticas. A junção intercelular representa um pequeno poro (9 a 11nm) que é responsável pelas trocas transcapilares de água e outras moléculas hidrofílicas menores que 15Å. Há três tipos de junções intercelulares que fazem essa mediação no endotélio: as junções ou zonas de oclusão (*tight junctions*), as zonas de adesão e as junções *gap* (Schroder e cols., 1990; Cormack, 1996). As moléculas de junção envolvidas no transporte paracelular, ou seja, situadas no espaço intercelular da célula endotelial da retina são as “tight junctions” (occludina, claudina, moléculas de junções de adesão (JAMs), molécula de adesão seletiva da célula endotelial (ESAM) e NECTIN) e as de zona de oclusão (ZO-1). As caderinas (VE-caderina e N-caderina) e a β -catenina, também presentes na retina, são moléculas de junção de adesão dependente do cálcio que permitem a ligação entre as células vizinhas. O transporte de vesículas transcelular, envolve as seguintes moléculas: caveolina-1, dinamina (Dnm), flotilina (Flot), PV e moléculas do complexo SNARE: Pacsina, NSF, SNAP, Vamp (Klaassen e cols., 2009).

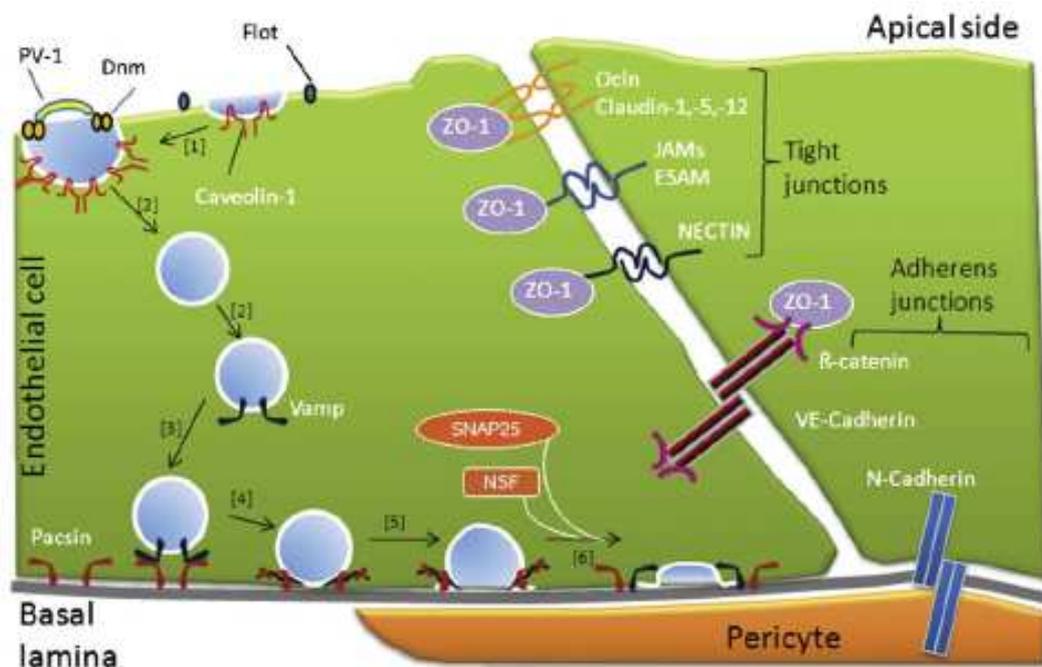


Figura 09. Esquema de localização de proteínas envolvidas no transporte intracelular e paracelular na barreira hemato-retiniana (Klaassen e cols., 2009).

1.4 – Retinopatia Diabética

1.4.1 - Conceito

Atualmente a retinopatia diabética (RD) é compreendida como uma doença neuronal degenerativa progressiva acompanhada por extensas alterações vasculares. Pode estar presente no DM tipo 1 e tipo 2 da doença (Barber, 2004; Zheng e cols., 2007). Estas complicações estão diretamente associadas ao tempo de duração do DM (Klein e cols., 1984) e ao controle glicêmico (DCCT, 1993; UKPDS, 1998). As possíveis causas das alterações anatômicas da retina são agrupadas em 3 categorias: bioquímicas, hemodinâmicas, endócrinas (Fong e cols., 2004). As categorias interagem entre si e apresentam seqüência temporal, sendo a bioquímica a anormalidade mais consistentemente ligada ao início destas alterações (Alder e cols., 1997).

1.4.2 – Alterações Clássicas da Retinopatia Diabética

Na RD, encontra-se com freqüência a ruptura das junções intercelulares, principalmente das junções de oclusão. A ruptura destas junções, a chamada quebra da BRB, é considerada um marcador precoce da RD e caracteriza uma gama de complicações como, por exemplo, o edema macular. (Ishibashi e Inomata, 1993).

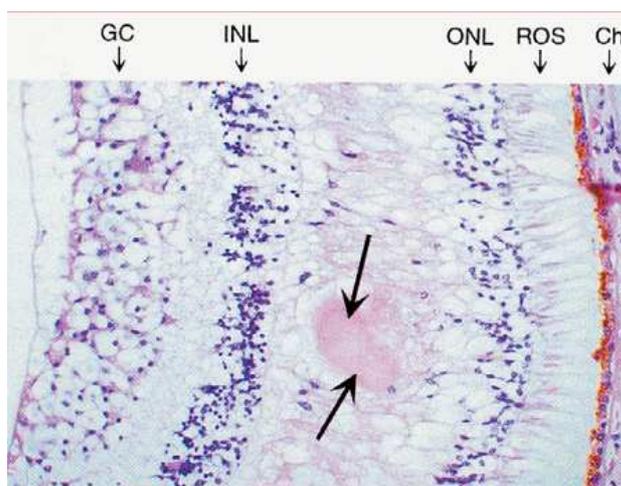


Figura 10. Quebra da barreira hemato retiniana. A seta inidica um exudato duro em um corte de retina isquêmica de um paciente diabético.



Figura 11. Imagem que simula a visão do portador de degeneração macular. O afinamento e rompimento da retina prejudicam o funcionamento da mácula resultando em uma “visão borrada” e dificuldade na visão para perto.

O espessamento da membrana (lâmina) basal do capilar também é um fenômeno que ocorre unânime e precocemente no DM e é causado pelo acúmulo de matriz extracelular. Este espessamento altera a função celular e/ou a difusão de oxigênio e reduz o contato entre os pericitos e a célula endotelial, contribuindo para as alterações vasculares dos diabéticos. A perda de pericitos nos capilares retinianos tornam os vasos acelulares ou fantasmas (Imesch e cols., 1997), fato este que parece permitir o processo angiogênico (Hirschi e D’Amore, 1997).

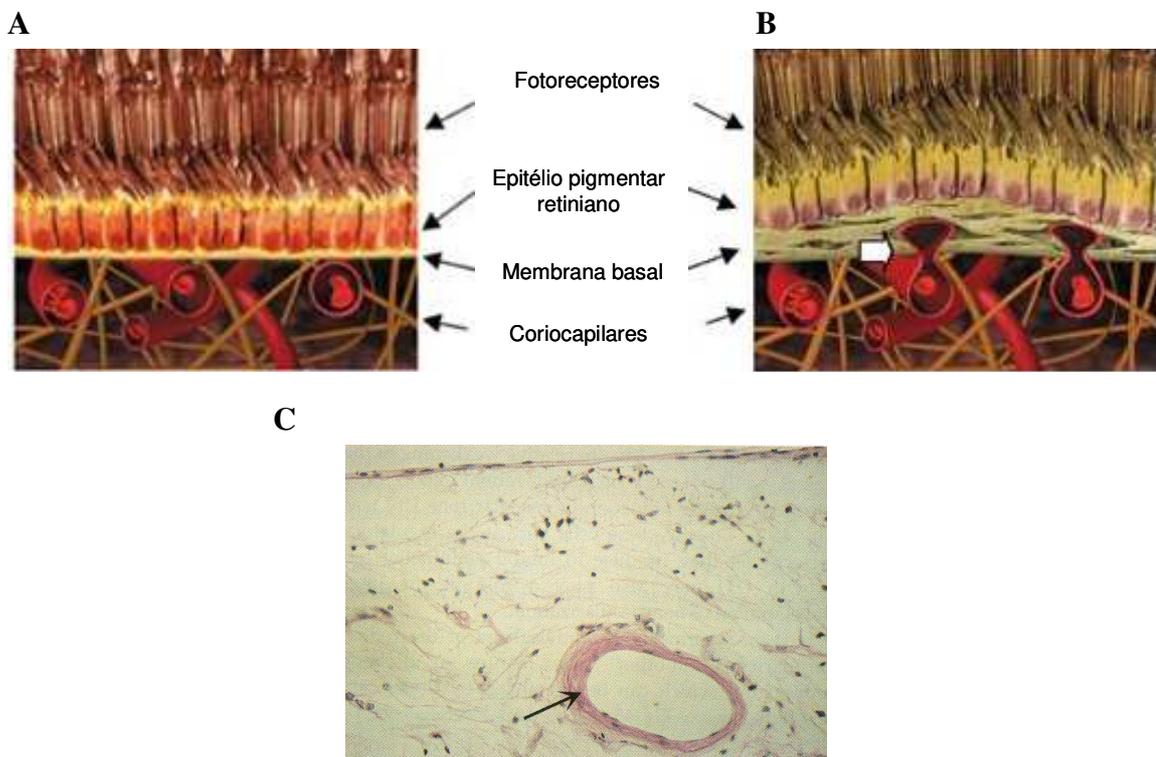


Figura 12. ¹Diagramas esquemáticos de corte transversal da retina externa normal (A) e com espessamento da membrana basal (B). Espessamento da membrana basal em corte histológico (C). (¹Novartis AG Ophthalmics).

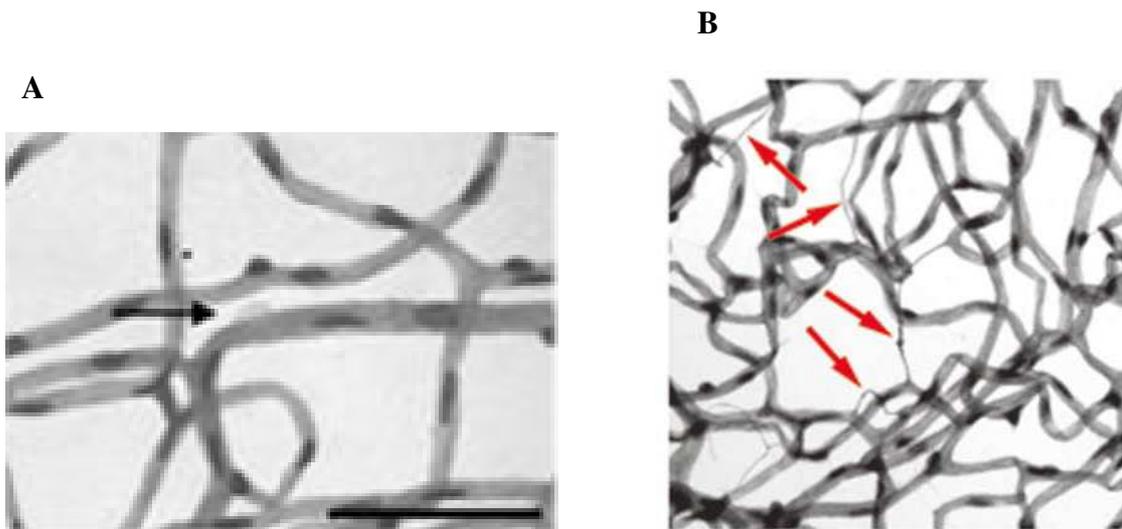


Figura 13. Fotos representativas de ¹perda de pericito (A) e ²capilares acelulares (B) retinianos (¹Cogan e cols., 1961; ²Geraldes e cols., 2009).

Clinicamente as alterações anatômicas da RD podem ser divididas em dois estágios principais, RD não-proliferativa (RDNP) e RD proliferativa (RDP). A RDNP é caracterizada por alterações intra-retinianas associadas ao aumento da permeabilidade capilar e à oclusão vascular que pode ou não ocorrer nesta fase. Nesta etapa, encontram-se microaneurismas, edema macular e exudatos duros (extravasamento de lipoproteínas). Este nível deve ser esperado em quase todos os pacientes com aproximadamente 25 anos de DM, e em muitos casos pode não haver evolução significativa.

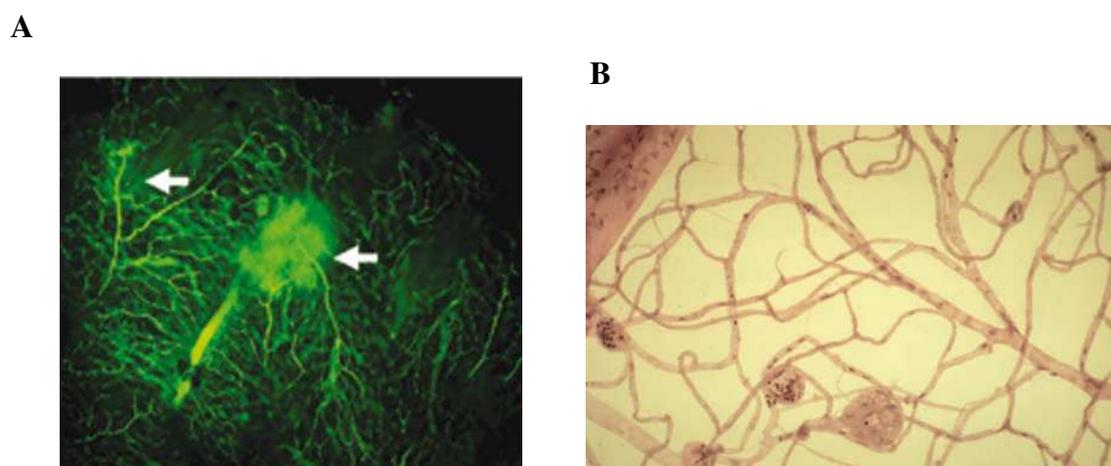


Figura 14. Foto representativa de ¹aumento da permeabilidade capilar (A) e microaneurismas (B). (¹Geraldes e cols., 2009).

A progressão da RDNP está associada à presença de extensas áreas de isquemia capilar caracterizada pelos exudatos algodonosos (redução do fluxo axoplasmático das células da camada de fibras nervosas); veias tortuosas e dilatadas, em formato de contas; hemorragias na superfície da retina (hemorragia em chama de vela) e pelas anormalidades microvasculares intra-retinianas. Este estágio pode ser considerado pré-proliferativo (Ferris, 1993).

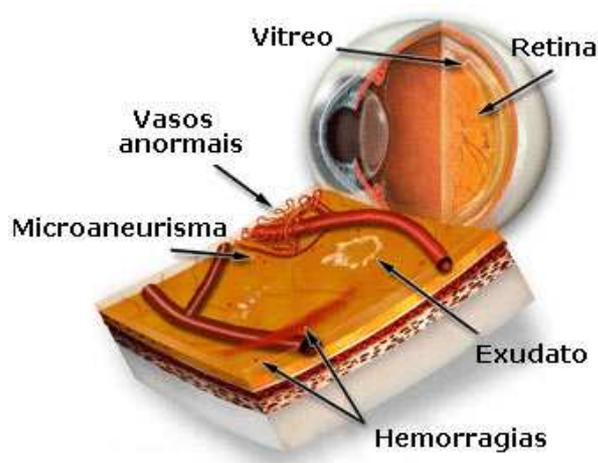


Figura 15. Alterações vasculares encontradas na progressão da RD.

Em resposta a essa intensa isquemia, ocorre a liberação de substâncias vasoativas, principalmente dos fatores de crescimento que estimulam o surgimento de neovasos (Paques e cols., 1997). A angiogênese, em situação fisiológica ou patológica, é um processo altamente coordenado, onde as células endoteliais, que normalmente não proliferam, são estimuladas a proliferar e invadem a matriz extracelular como cordões sólidos, e, posteriormente, canalizam-se, formando tubos e arcos vasculares. O principal fator angiogênico é o VEGF (vascular endothelial growth factor) é uma proteína produzida por células tumorais, monócitos/macrófagos e células endoteliais da retina, que se liga a receptores específicos presentes nas células endoteliais dos capilares retinianos. A hipóxia é o maior estímulo para o aumento da expressão do próprio VEGF e de seu receptor. Seu principal efeito é o aumento da permeabilidade capilar e a proliferação de células endoteliais. Além da proliferação, o VEGF induz alterações pró-coagulantes inflamatórias. A partir de então, uma série de investigações tem demonstrado o VEGF como fator essencial na patogênese da retinopatia e no edema macular diabéticos (Lopes de Faria e Lopes de Faria, 2007). Quando a neovascularização ocorre na interface vítrea da retina, a

RD é considerada proliferativa, RDP. Este é o evento mais importante na RD, pelo risco real de perda visual irreversível.

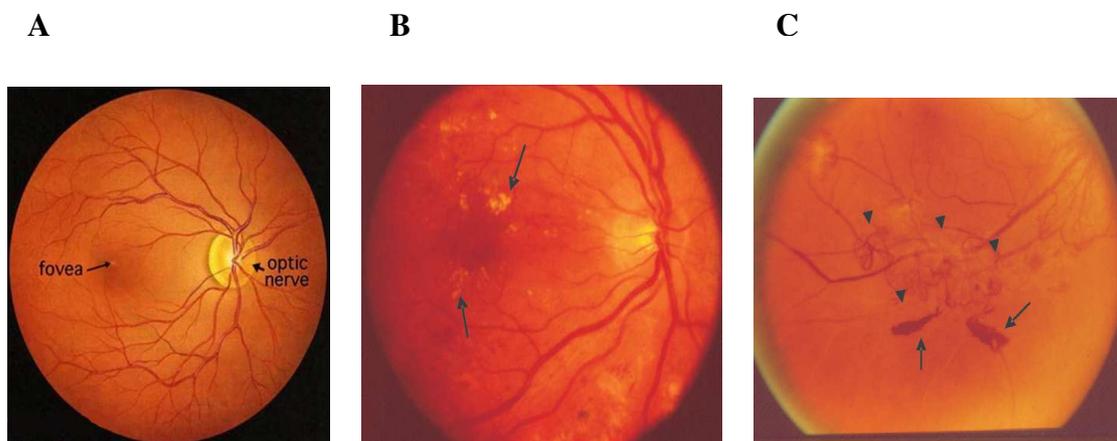


Figura 16. Fotografias de fundo-de-olho humano através de um oftalmoscópio. (A) Fundo-de-olho de paciente normal. (B) Paciente com RDNP que apresenta edema macular clinicamente significativo. Presença de exudatos duros na região macular (setas). (C) Paciente com RDP, presença de neovasos (setas pequenas) e hemorragia (setas grandes).

1.4.3 – Processos envolvidos nas alterações neurais e vasculares da retina diabética

A concomitante relação entre os elementos neuronais e gliais com a rede vascular desde a embriogênese permite inferir que as alterações neurogliais possam interferir na homeostase vascular. No DM, o desequilíbrio ou a apoptose das células neurogliais da retina foram postuladas a contribuir para a degeneração dos capilares da retina (Barber, 2004; Zheng e cols., 2007).

Em 1962, Bloodworth publicou uma observação sobre RD, que foi rapidamente esquecida. Baseado, em parte, nas conclusões de Wolter (1961), que demonstrou grave atrofia dos elementos neurais da retina, Bloodworth investigou mudanças neuropatológicas na retina em uma cirurgia de olho em paciente diabético *posmortem*. Ele escreveu a seguinte hipótese: “RD é uma complexa doença degenerativa de todos os elementos da retina, provavelmente devido a um defeito fundamental metabólico ou enzimático das células e não está relacionada ao abastecimento vascular”. Além disso, ele escreveu, “Pensamos que a ênfase colocada no capilar, é, no entanto, demasiado grande. Não há, por enquanto, provas concretas que mudanças capilares iniciem a RD”. Mais de 40 anos depois, ainda é

contestável e não se pode afirmar que as alterações capilares ou proliferação vascular anteceda a neurodegeneração na RD.

Estudos demonstram alterações funcionais presentes na retina de pacientes diabéticos sem qualquer alteração de fundo de olho através de estudos eletrofisiológicos como potencial visual evocado (Puvanendran e cols., 1983; Lopes de Faria e cols., 2001) e eletrorretinografia (Ghirlanda e cols., 1991), 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. A apoptose de células neurais foi observada pela técnica TUNEL em seções de retina de ratos com DM induzida por estreptozotocina. Neste estudo, o número de núcleos apoptóticos apresentaram-se elevados após 1 mês da indução do DM. Porém, a maior parte das células positivas para TUNEL não colocalizou com o marcador específico de células endoteliais, *Won Willebrand*, sugerindo que estas células não eram vasculares (Barber e cols., 1998). A avaliação da perda da camada de fibras nervosas da retina determinada pela polarimetria de varredura a laser foi significativa em pacientes com DM tipo 1 sem retinopatia (Lopes de Faria e cols., 2002). Células de Muller, células ganglionares, astrócitos e fotorreceptores são também afetados precocemente no desenvolvimento da RD, como demonstrado em estudos experimentais e em humanos (Barber e cols., 1998; Mizutani e cols., 1998). Outro aspecto neurodegenerativo da RD é o aumento da reatividade glial. A reatividade glial é manifestada pelo aumento da imunoreatividade do GFAP em astrócitos e em células de Muller. O GFAP é uma proteína glial produzida por insultos, como trauma, hiperglicemia, isquemia, entre outros. Como a glia mantém as funções de neurônios e células endoteliais, é possível que mudanças na reatividade glial afetem função e sobrevivência das células, vasculares e neuronais. Mudanças na expressão do GFAP ocorre em muitas doenças neurodegenerativas e são considerados indicadores sensíveis de lesões no sistema nervoso central.

As alterações de fatores vasoativos como endotelinas (ET) e aumento da síntese de proteína de matriz extracelular (ECM) são características de todas as complicações crônicas do diabetes. Na retina o aumento da produção de ET-1 resulta na alteração do fluxo sanguíneo, o que acarreta na produção de proteínas de ECM (Khan e cols., 2006). Estudos demonstram que a glicose aumenta a síntese de ET-1 e conseqüentemente os níveis de fibronectina (FN), mediada através da ativação de NFκB (Chen e cols., 2003). A FN é um componente chave do ECM e desempenha um importante papel em eventos celulares

(Yamada, 1983). Estruturalmente, o aumento da produção de proteína ECM pode manifestar-se como espessamento da membrana basal capilar (BM) (King e Brownlee, 1996). Este acúmulo de proteínas de ECM está associado à morte de células endoteliais e pericitos, consideradas características estruturais iniciais na patogênese da RD.

1.4.4 – Epidemiologia

O DM é a doença sistêmica que mais causa cegueira (Mazze e cols., 1985) e a RD é a principal causa de cegueira adquirida em adultos em idade produtiva nos países desenvolvidos (Sharma e cols., 2005). No ano de 2000, a RD foi responsável globalmente por 4,8% dos casos de cegueira (Resnikoff e cols., 2004). O impacto econômico anual nos EUA causado pela RD foi cerca de 629 dólares com gastos ambulatoriais por paciente com idade entre 40 a 64 anos (Prevent Blindness America, 2007). Aproximadamente 25 à 44% das pessoas com DM desenvolvem alguma forma de RD em algum momento da doença (Mitchell e Foran, 2008). A RD ocorre em cerca de 95% dos pacientes com DM tipo 1 e em mais de 60% dos pacientes com DM tipo 2 (Fong e cols., 2003).

O instituto nacional dos EUA (National Eye Institute) coletaram dados a partir de 8 populações de estudos bem conduzidos (Kempen e cols., 2004) de pessoas com 40 anos ou mais, com classificação de retinopatia consistente a partir de fotografias da retina. Os dados obtidos foram provenientes de cinco estados dos EUA, um estado da Índia Ocidental e dois estados Australianos (Blue Mountains Eye Study, BMES, and Melbourne Visual Impairment Project, MVIP). O total da prevalência da RD nas populações estudadas foi de 40% e a prevalência da forma mais grave da RD (edema macular ou RDP) foi de 8,2%. A prevalência de RD na população dos EUA foi de 3,4% (4,1 milhões de pessoas) e dos estágios mais avançados foi de 0,8% (900.000 pessoas). Para a população australiana, esses índices sugerem prevalência de 300.000 e 65.000 para RD e RDP ou edema macular respectivamente, em pessoas com idade superior a 40 anos.

Em pacientes com DM de início precoce (o que corresponde aos pacientes com DM tipo 1), a prevalência da RD aumenta com o tempo de duração do DM, sendo que após 15-20 anos praticamente todos os indivíduos apresentarão alguma forma de RD. Por outro lado, a forma proliferativa acomete apenas um subgrupo de aproximadamente 56%, indicando que

além da hiperglicemia algum outro fator seja importante para o seu desenvolvimento. No grupo de pacientes com DM de início tardio (o que corresponde aos pacientes com DM tipo 2), a RD também apresenta correlação com a duração da doença. A doença com duração de dois anos tem uma prevalência de 23%, porém, atinge 80% após 15 anos de duração. A prevalência já alta no início da doença deve-se à dificuldade de detectar o seu início, uma vez que os pacientes se mantêm assintomáticos por vários anos antes do diagnóstico. Cerca de 4% dos pacientes com DM tipo 2 já apresentam RD proliferativa na ocasião do diagnóstico (ETDRS, 1985).

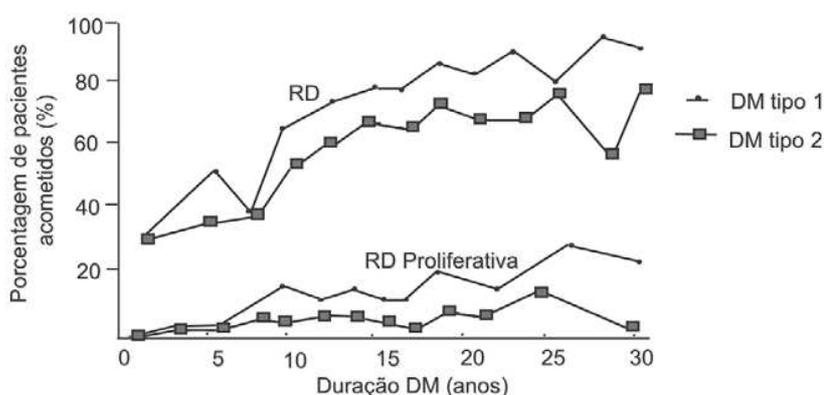


Figura 17. Prevalência de RD e RD proliferativa em pacientes com DM tipos 1 e 2 (ETDRS, 1985).

1.4.5 – Fatores de Risco

Alguns fatores de risco são descritos associados ao desenvolvimento e progressão da RD. Dentre eles destacam-se principalmente o controle glicêmico e a hipertensão arterial. Outros fatores também estão associados como a dislipidemia, nefropatia diabética, tabagismo, gravidez e a genética (Mitchell e Foran, 2008).

De acordo com os resultados do *Diabetes Control and Complication Trial* (DCCT), a hiperglicemia crônica é o fator causal mais importante para o desenvolvimento da microangiopatia que acomete em particular rins e olhos. Os níveis séricos elevados de glicose induzem a uma série de anormalidades bioquímicas e celulares na retina, que podem provocar as alterações vasculares encontradas na RD. Como exemplo, aumento na atividade da via dos polióis, glicação não-enzimática de proteínas, estresse oxidativo e ativação da

proteína kinase C pela síntese de diacilglicerol (Brownlee, 2001). Estas alterações microvasculares do tecido retiniano levam a alterações circulatórias como a perda do tônus vascular, alteração do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e conseqüentemente extravasamentos e edemas e, por fim, obstrução vascular que leva à neovascularização, com vasos frágeis que se rompem, levando a hemorragias e descolamento da retina. O controle glicêmico rigoroso reduz o desenvolvimento e progressão da RD em pacientes diabéticos tipo 1 (DCCT, 1993) e pacientes tipo 2 (UKPDS, 1998).

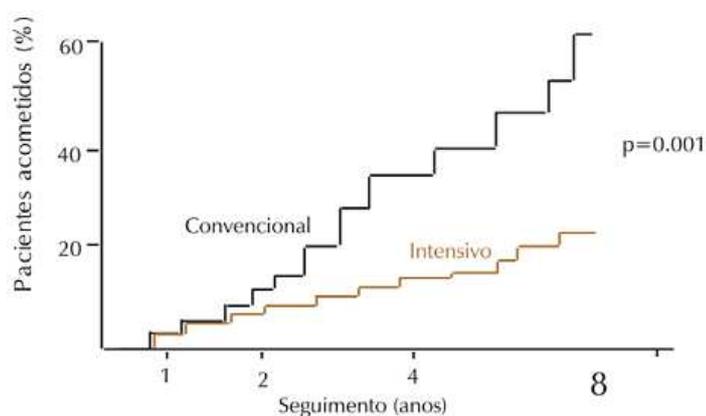


Figura 18. Efeito do tratamento intensivo na progressão da RD em pacientes DM tipo 1 (DCCT, 1993).

Estudos epidemiológicos demonstraram claramente a HA como fator de risco independente mais importante associado à RD, depois da hiperglicemia. A HA é comum em pacientes com DM tipo 2, com prevalência de 40-60% em indivíduos entre 45 e 75 anos de idade. A incidência de edema macular está associada à presença da hipertensão arterial, uma vez que a hipertensão arterial aumenta em 3,2 vezes a chance de o paciente desenvolver edema macular (Lopes de Faria e cols., 1999). No UKPDS, o controle da pressão arterial intensivo reduziu em 37% a chance de progressão da RD e em 47% a de perda visual em pacientes com DM tipo 2 (UKPDS, 1998), demonstrando a importância da hipertensão arterial no desenvolvimento e progressão da RD. Em um estudo realizado com pacientes DM tipo 1 (WESDR), após 14 anos de acompanhamento, estimou-se que a presença da hipertensão elevada esteve relacionada com o desenvolvimento e progressão da RD com a incidência de edema macular (Klein e cols., 1998). Foi observado que pacientes DM tipo 1 com HA apresentam 3 vezes mais chance de desenvolver RD proliferativa (Roy, 2000).

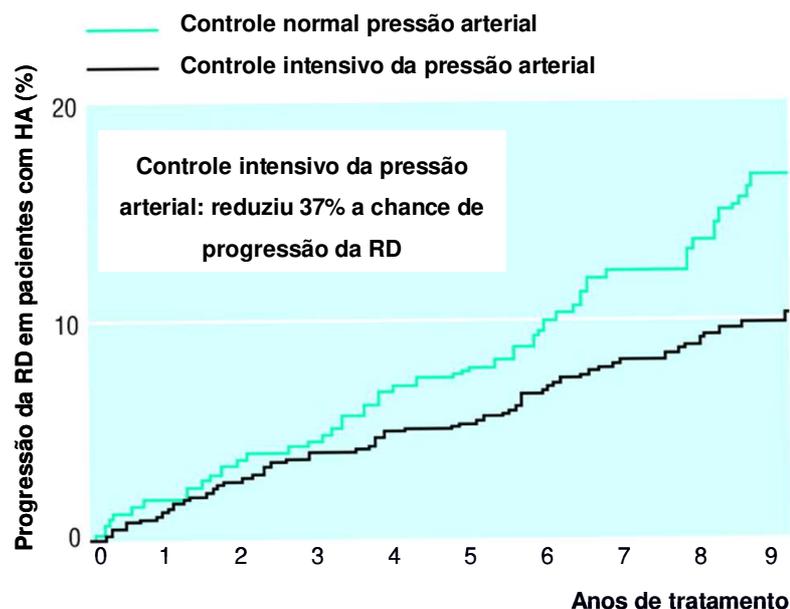


Figura 19. Tratamento intensivo da pressão arterial reduz a chance da progressão da RD em pacientes hipertensos e DM tipo 2 (UKPDS, 1998).

Estudos demonstram que além do controle da pressão arterial, a interferência do sistema renina-angiotensina (RAS) já foi bem demonstrado (Wilkinson-Berka, 2006) na retinopatia diabética. O RAS, também identificado como sistema renina-angiotensina-aldosterona é um conjunto de peptídeos, enzimas e receptores envolvidos em especial no controle do volume de líquido extracelular e na pressão arterial. Uma vez ativada a cascata deste sistema, surgem a angiotensina I e a angiotensina II, que circulam pelo sangue ativando suas estruturas-alvo: vasos sanguíneos (sobretudo arteríolas e veias sistêmicas), rins, coração, supra-renais e o sistema nervoso simpático. A lógica fundamental que preside o funcionamento do sistema é responder a uma instabilidade hemodinâmica e evitar a redução na perfusão tecidual sistêmica. Porém, estudos já observaram a presença de todos os componentes do sistema renina-angiotensina na retina (Danser e cols., 1989; Nagai e cols., 2007). Estudos clínicos realizados por Funatsu e colaboradores (2002) têm demonstrado o aumento nos níveis de angiotensina II em amostras de vítreo de pacientes diabéticos com retinopatia, comprovando que o sistema renina-angiotensina é ativado na retinopatia diabética. Além dos efeitos vasculares dos componentes do sistema renina-angiotensina, a disfunção neuronal envolvendo este sistema também foi descrito na retina diabética in vivo e in vitro (Kurihara e cols., 2008).

1.5 – Estresse oxidativo

1.5.1 – O Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e a defesa antioxidante. Uma substância é considerada pró-oxidante à medida que possa gerar espécies reativas ou ser capaz de induzir estresse oxidativo. E antioxidante é a substância que previne a oxidação do substrato, ou seja, evita quimicamente sua perda de elétrons (Halliwell e Whiteman, 2004). Este conceito clássico foi elaborado pelo pesquisador alemão Helmut Sies, sua difusão com uma balança desequilibrada relacionada a doenças “iluminou” a imaginação de muitos cientistas (Ohara, 2006). Mais recentemente, o estresse oxidativo foi definido como “um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, conduzindo à lesão celular” (Jones, 2006). O estresse oxidativo pode conduzir a lesões celulares e moleculares importantes, como oxidação das biomoléculas, DNA, proteínas e enzimas, mutação e morte celular (Halliwell e Whiteman, 2004).

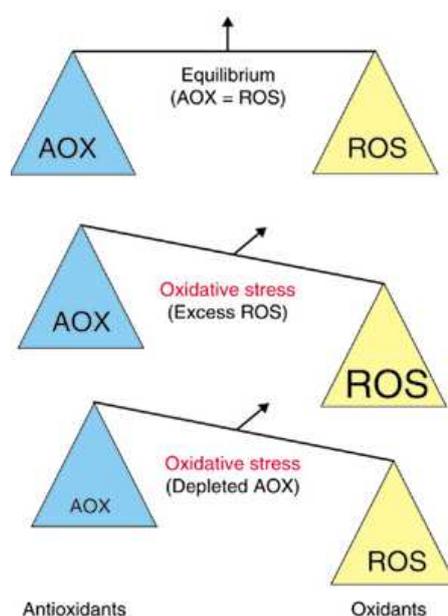


Figura 20. Balança ilustrativa do conceito de estresse oxidativo criada por Helmut Sies e atualmente definido como “um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, conduzindo à lesão celular”.

1.5.2 – Espécies reativas

O metabolismo do oxigênio é essencial para a manutenção da vida aeróbica, e homeostase do trabalho celular normal para o delicado balanço entre a formação e eliminação de “espécies reativas do oxigênio” (reactive oxygen species-ROS). Este termo foi criado entre 1970 e 1990, pois os primeiros radicais livres e oxidantes caracterizados *in vivo* ou em sistemas enzimáticos dependiam do oxigênio molecular: a respiração mitocondrial, a oxidação de lipídeos, o metabolismo de poluentes e medicamentos e a explosão respiratória dos fagócitos profissionais. Algumas das espécies então conhecidas eram radicalares (moléculas com um elétron desemparelhado em sua órbita externa), como o anion radical superóxido, o radical hidroxila e os radicais alquila e peroxila, derivados de lipídios ou de poluentes e medicamentos. Outras não eram radicalares, como o peróxido de hidrogênio, o oxigênio singlete (estado excitado do oxigênio molecular) e peróxidos orgânicos, derivados de lipídios ou de poluentes e medicamentos. Por este motivo utiliza-se o termo “espécies reativas”, ao invés de radicais livres (Ohara, 2006).

Além das espécies reativas do oxigênio, há as espécies reativas do nitrogênio e espécies reativas do cloro. Semelhante as espécies reativas do oxigênio, as espécies reativas do nitrogênio e espécies reativas do cloro pode ser um radical livre ou um não radical em estrutura. Pode-se citar como exemplo dentre as espécies reativas do nitrogênio, o óxido nítrico (NO^{\bullet}) que possui radical e o peroxinitrito (ONOO^-) que não possui radical; e com a espécie reativa do cloro, termo que inclui radical (átomo de cloro, Cl^{\bullet}) e não radical em estrutura (ácido hipocloroso, HOCl) (Halliwell, 2006). Uma lista das espécies reativas mais importantes no sistema biológico pode ser observada na tabela 1.

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

Radicais livres	Não-radicais
.1 Espécies reativas do oxigênio	
Superóxido, $O_2^{\bullet-}$	Peróxido de hidrogênio, H_2O_2
Hidroxila, OH^{\bullet}	Oxigênio singleto, $O^1\Delta g$
Peroxila, RO_2^{\bullet}	Peróxidos orgânicos, ROOH
Alcoxila, RO^{\bullet}	Peroxinitrito, ONOO ⁻
Carbonato, $CO_3^{\bullet-}$	Ácido peroxinitroso, ONOOH
.2 Espécies reativas do cloro	
Cloro atômico, Cl^{\bullet}	Ácido hipocloroso, HOCl
	Gás cloro, Cl_2
	Nitro-cloro-benzeno, NO_2Cl
<i>Espécies reativas do nitrogênio</i>	
Óxido nítrico, NO^{\bullet}	Ácido nitroso, HNO_2
Dióxido de nitrogênio, NO_2^{\bullet}	Cátion nitrosila, NO^+
	Ânion nitrosila, NO^-
	Tetraóxido dinitrogênio, N_2O_4
	Trióxido dinitrogênio, N_2O_3
	Peroxinitrito, ONOO ⁻
	Ácido peroxinitroso, ONOOH
	Peroxinitritos alcila, ROONO

1.5.3- Lesão tecidual oxidativa

Existem diversas vias para induzir lesão oxidativa nas biomoléculas. Uma das vias começa com a interação entre dois radicais livres facilmente encontrados, $O_2^{\bullet-}$ e NO^{\bullet} .



O produto da reação é o peroxinitrito, um forte agente oxidante e nitrante que pode diretamente causar lesões em proteínas, lipídios e DNA (Halliwell, 2006). A nitração dos resíduos de tirosina das proteínas gera nitrotirosina que é amplamente utilizada como um biomarcador de produção de peroxinitrito para estresse oxidativo e nitrosativo. A nitração das estruturas das proteínas, incluindo neurofilamentos e actina, pode comprometer a estrutura dos filamentos levando a conseqüências patológicas (Beckman e Koppenol, 1996).

Por outro lado, a nitração das moléculas de sinalização ou fatores de transcrição pode alterar significativamente a função fisiológica das proteínas afetadas (como discutido em uma carta por Biswas e Lopes de Faria, 2005).

Outra via de lesão tecidual oxidativa é a via do radical livre hidroxila (OH^\bullet), induzindo a peroxidação lipídica e a hidroxilação do DNA. O radical OH^\bullet é o mais reativo radical conhecido na química, o qual pode atacar e lesionar a maioria das moléculas encontradas nas células vivas (Halliwell, 1989). O DNA é normalmente o local para a lesão oxidativa (Cooke e cols., 2002). Dentre as bases do DNA, purinas (adenina e guanina) e pirimidinas (citosina e timina), a guanina é a mais propensa à oxidação. O radical OH^\bullet pode reagir com a estrutura cíclica da guanina do DNA formando o radical 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG). A principal fonte geradora de 8-OHdG é a mitocôndria (Beckman and Ames, 1998) e a quantificação deste radical pode indicar a extensão dos danos ao DNA (Wu e cols., 2004). Reparos imperfeitos dos danos no DNA podem levar a mutações, detenção do crescimento celular ou apoptose (Evans e cols., 2004). O radical OH^\bullet também pode reagir com lipídios da membrana levando à peroxidação lipídica. Dentre os efeitos globais da peroxidação lipídica estão diminuição da fluidez da membrana, aumento da permeabilidade da membrana, e danos às proteínas de membrana, inativando receptores, enzimas e canais iônicos (Halliwell, 2006).

1.5.4- Estresse Oxidativo na Hiperglicemia

A lesão tecidual pode ser consequência de ambas, hiperglicemia intra e extra celular. A primeira é importante particularmente em células nas quais a entrada da glicose se faz independentemente da insulina, como é o caso do nervo, o glomérulo, cristalino e retina. O aumento da glicose extracelular resulta na glicação não enzimática de proteínas e subsequente formação de produtos finais da glicação avançada (AGE) que interage com o receptor de AGE (RAGE) na membrana plasmática e promove a produção de ROS. O aumento intracelular de glicose conduz um aumento da atividade mitocondrial, NADPH oxidase, proteína kinase C (PKC) e promove um aumento do fluxo da via do polioli e como consequência a geração de ROS. O excesso de ROS poderá interferir em diversas vias de sinalização, ativar fatores de transcrição, aumentar fatores inflamatórios e acarretar no acúmulo de matriz extracelular. Células e consequentemente órgãos do rim, olhos e sistema

nervoso sofrem mudanças fenotípicas como resultado do ROS gerado pela hiperglicemia (Calcutt e cols., 2009).

1.5.5 – A indispensável discussão sobre a função do óxido nítrico

O final do século XX é marcado por uma revolução na Biologia, ocasionada pelo radical livre conhecido pelos químicos desde o século XIX, o pequeno, gasoso e poluente óxido nítrico (NO[•]). Atualmente sabe-se que o óxido nítrico (NO) é uma molécula de sinalização celular endógena envolvida na regulação de muitas funções fisiológicas e na mediação de uma variedade de processos fisiopatológicos (Ohara, 2006). O NO é o ativador endógeno da guanilato ciclase solúvel, resultando na formação de guanosina monofosfato cíclico (cGMP), que atua como segundo mensageiro em muitas células, incluindo nervos, músculo liso, monócitos e plaquetas. O NO e os compostos relacionados ao NO desempenham ambas as funções, proteção e citotoxicidade, dependendo do contexto celular e da natureza do grupo do NO. As diferentes ações do NO pode ser classificada em duas categorias: 1) dependente da cGMP, em baixas concentrações o qual desempenha funções fisiológicas como por exemplo a vasodilatação e 2) independente da cGMP, envolvida nas respostas fisiopatológicas, como a geração de espécies reativas do nitrogênio (Drew e Leeuwenburgh, 2002; Foster e cols., 2003). De uma forma geral o NO endógeno ou obtido através de doadores de NO podem exercer efeitos pleiotrópicos, tais como relaxamento muscular, proliferação celular, apoptose, liberação de neurotransmissores, neurotoxicidade e diferenciação.

O NO é sintetizado por três isoformas de óxido nítrico sintase (NOS), a forma induzida (i-NOS) e as constitutivas endotelial (e-NOS) e neuronal (n-NOS) a partir do seu substrato, L-arginina (Rodeberg e cols., 1995). Ambas isoformas constitutivas que são reguladas por íons de cálcio ligados à proteína calmodulina (proteína de baixo peso molecular, que funciona como co-fator), neuronal e endotelial produzem baixas concentrações (estimados na faixa de nM, 10⁻⁹M) de NO por curtos períodos. A forma induzida que não depende do complexo cálcio-calmodulina produz uma grande quantidade de NO por um longo período em resposta à estímulos isquêmicos, imunológicos e inflamatórios. Assim que esta enzima é expressa, ela sintetiza óxido nítrico continuamente,

ao que parece até o esgotamento do aminoácido arginina. Nesta o óxido nítrico atinge concentrações locais de ordem de μM (10^{-6}), estas altas concentrações podem gerar espécies mais oxidantes como o dióxido de nitrogênio ($\bullet\text{NO}_2$) (famoso poluente produzido pela reação do óxido nítrico com oxigênio molecular, que pode tanto oxidar como nitrar biomoléculas) e o peroxinitrito.

O NO derivado da e-NOS promove vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, inibição da aderência de leucócitos e da proliferação de células musculares lisas vasculares (Wong e Marsden, 1996). O processo de vasodilatação se dá pelo aumento do fluxo de cálcio para o interior da célula. O cálcio e a calmodulina irão ligar-se a óxido nítrico sintetase. Esta ligação irá ativá-la e ocorrerá a catálise da transformação da L-arginina em L-citrulina e NO. Será produzida uma pequena quantidade de NO, porém suficiente para difundir-se para a musculatura lisa. O NO não precisa de transportadores específicos e nem de canais específicos. Ao difundir-se para a musculatura lisa o NO irá ligar-se ao ferro do grupo prostético heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GC), e dessa forma a reação da guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (cGMP) irá acontecer. A cGMP é responsável pelo relaxamento da musculatura lisa e conseqüente aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos, levando ao aumento do fluxo sanguíneo e redução da pressão arterial (Moncada e Higgs, 1993).

A produção neuronal de NO é conduzida quando um neurônio ativado, libera um mensageiro químico que difunde para o neurônio vizinho e interage com receptores específicos, que ativam a célula, transmitindo, assim, o impulso nervoso. Como por exemplo o mensageiro químico glutamato que é liberado de vesículas no neurônio pré-sináptico e liga-se ao receptor N-metil-D-aspartico (NMDA) do neurônio adjacente. Esta ligação abre um canal no receptor, admitindo Ca^{2+} para o interior da célula, onde se liga a calmodulina que age como uma subunidade para muitas enzimas de Ca^{2+} . O complexo Ca^{2+} / calmodulina liga-se a forma da NOS encontrada nas células nervosas, nNOS. Esta ligação ativa a enzima, que catalisa a oxidação de L-arginina para L-citrulina e NO. O NO formado ativa então outra enzima, guanilato ciclase, pela ligação do ferro do grupo prostético heme da enzima. O NO difunde-se para o neurônio pré-sináptico para ativar a guanilato ciclase naquela célula. Dessa forma, o NO pode desempenhar um papel importante nos circuitos neurais envolvidos na memória. O NO aumenta a liberação de glutamato no neurônio pré-sináptico, estabilizando a transmissão sináptica (Moncada e Higgs, 1993).

A forma de NOS encontrada em macrófagos não requer Ca^{2+} para ativação. A iNOS é sintetizada como uma nova proteína em resposta a uma mistura de citocinas. A enzima é induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano e/ou citocinas sintetizadas em resposta ao LPS, notavelmente interferon-gama, cujo efeito antiviral é explicado por essa ação. Em resposta ao interferon-gama e ao fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), que atua de modo sinérgico com o interferon-alfa, seqüências do DNA do macrófago relativas a síntese da iNOS, são transcritas no núcleo para formar o RNA mensageiro, depois de processado, este mRNA é liberado para o citosol, onde será traduzido em proteína pelos ribossomos. Na presença de cofatores apropriados, a cadeia de proteína nascente enovela-se e monta a forma ativa da iNOS. A nova enzima produzida começa imediatamente a converter L-arginina em NO e L-citrulina (Rang e cols., 2001).

O NO difunde-se livremente através das membranas celulares, o que explica adequadamente suas ações parácrinas locais sobre o músculo liso vascular ou sobre os monócitos e plaquetas que aderem ao endotélio (Rang e cols., 2001).

Estudos têm demonstrado que o óxido nítrico é responsável pela neurotoxicidade, pelo menos em parte, da retina após a injúria causada pela isquemia e reperfusão (Neufeld e cols., 2002). A iNOS e o estresse nitrosativo tem sido implicado em doenças humanas incluindo resistência à insulina (Perreault e Marette, 2001), arteroesclerose (Detmers e cols., 2000), inflamação e neurodegeneração (Liberatore e cols., 1999). A maior parte das investigações demonstram que a iNOS está super regulada em células gliais da retina em I/R (Hangai e cols., 1996) e que também contribui posteriormente para a degeneração dos compartimentos vasculares (Zheng e cols., 2007). A quantidade do NO gerado por esta forma induzida é muito maior, aproximadamente 1.000 vezes, comparado ao gerado pelas formas constitutivas (Patel e cols., 2000).

Discute-se se existem mecanismos transportadores análogos em mamíferos, como proteínas contendo cisteína e/ou grupo sulfidril-SH, permitindo a atuação do NO fora do seu local de síntese. A S-nitrosilação de proteínas, ou seja, a transferência do íon nitrosonium (NO^+) ao grupo sulfidril da cisteína na cadeia protéica, tem sido amplamente estudado como um protótipo de modificações translacionais, redox-dependente e independente da cGMP (Stamler e cols., 2001), responsável por diversas ações do grupo NO em vários processos

biológicos (Hess e cols., 2001). Foram demonstradas aproximadamente mais de 100 proteínas S-nitrosiladas *in vitro*, em cultura de células e *in vivo*. E muitas destas proteínas, a S-nitrosilação está associada com as alterações funcionais. Recentemente a S-nitrosilação e denitrosilação tem sido reconhecida como um componente regulatório de tradução de sinal comparado com a fosforilação e defosforilação (Mannick e Schonhoff, 2002; Liu e cols., 2004). Estudo recente demonstrou que a S-nitrosilação do Drp 1, proteína responsável por regular o mecanismo de fusão e fissão mitocondrial, está aumentada no cérebro de pacientes com Alzheimer e que pode contribuir também para patologias de neurodegeneração (Cho e cols., 2009).

1.5.6 – O Sistema Antioxidante

Paralelo aos estudos dos radicais livres, estava claro para Rebeca Gerschman que os organismos possuíam enzimas cuja função era limitar os ROS. Ela também demonstrou que compostos radioprotetores eram “oxigênio-protetores”, ou como conhecemos atualmente, antioxidantes. A propriedade comum aos antioxidantes é a capacidade de interromper reações de óxido-redução (Ohara, 2006).

Mas, foi em 1969 que dois pesquisadores norte-americanos, Joe McCord e Irwin Fridovich demonstraram uma enzima capaz de catalisar a dismutação do ânion radical superóxido, e a denominaram superóxido dismutase (SOD). Dismutação é uma reação química na qual um mesmo radical livre é oxidado e reduzido. No caso do radical superóxido, um transfere elétron para o outro, de forma que o radical que perdeu elétron se transforma em oxigênio molecular, e o que recebeu, vira peróxido de hidrogênio. Além de caracterizar a Cu,Zn-SOD, McCord e Fridovich demonstraram que a enzima acelerava por várias ordens de grandeza a dismutação do radical superóxido, que já é rápida mesmo na ausência deste catalisador.

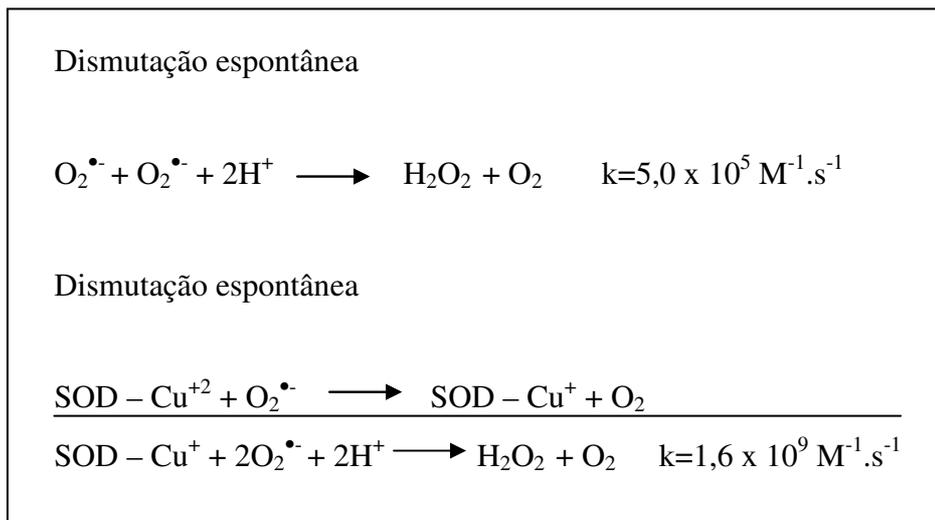


Figura 21. Dismutação do anion radical superóxido espontânea e catalisada pela enzima SOD-1, como proposto por McCord e Fridovich. A enzima SOD acelera em mais de mil vezes a dismutação do ânion radical superóxido, como mostra a comparação dos valores das constantes de velocidades das reações. Os valores mostrados são atualizados, e não os estimados por McCord e Fridovich em 1969 (Ohara, 2006).

Com a visão do século XXI sabe-se que as espécies reativas derivadas principalmente do oxigênio (ROS) e do nitrogênio (RNS) são moduladas pelas defesas antioxidantes não enzimáticas com baixo peso molecular (vitaminas A e E, beta-caroteno, ácido úrico) e enzimáticas (SOD, catalase, glutathione peroxidase e redutase). Elas proporcionam maior proteção contra o estresse oxidativo por neutralizar ou seqüestrar espécies reativas ou por quebrar reações em cadeia (Scandalios, 2005). Além disso, transferrina, ceruloplasmina e albumina também desempenham papel antioxidante por seqüestrar metais de transição, tais como ferro e cobre, os quais são íons que reagem rapidamente com H_2O_2 formando produto altamente tóxico, o radical hidroxila (OH^\bullet) por reação de Fenton (Halliwell, 1989).

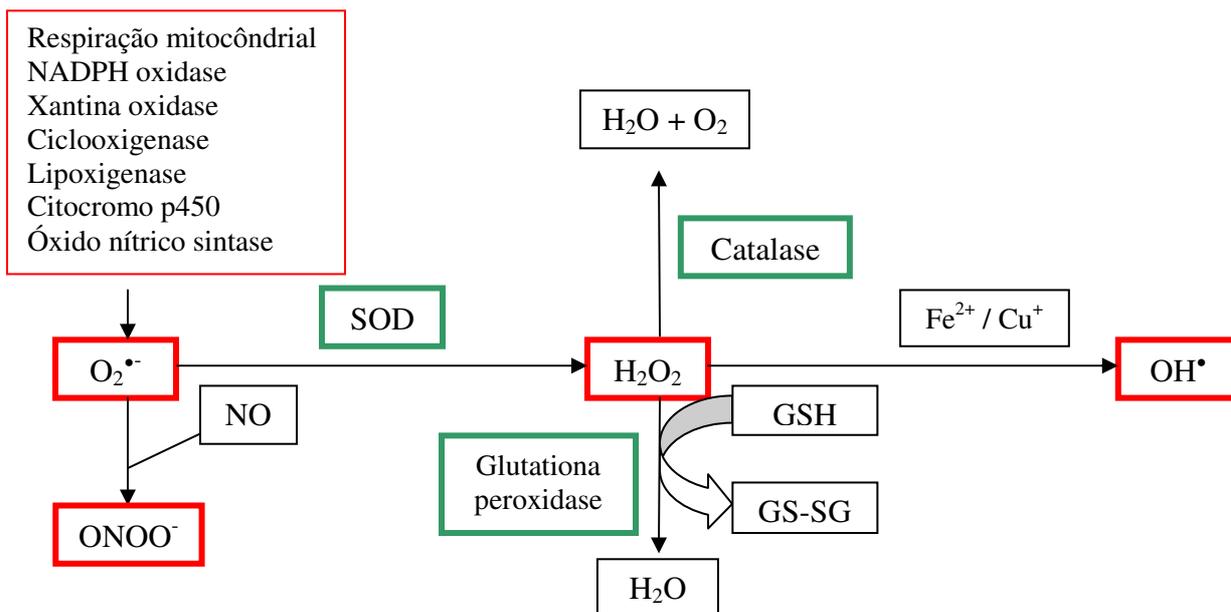


Figura 22. Maiores reações pró-oxidantes-antioxidantes relevantes no sistema biológico (adaptado de Schnachenberg, 2002). O superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é produzido de inúmeras ações surgidas de espécies reativas. $O_2^{\bullet-}$ reage rapidamente com o óxido nítrico (NO) para produzir peroxinitrito ($ONOO^-$) ou é catalisado pelo superóxido dismutase (SOD) para produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2). H_2O_2 pode ser neutralizado pela catalase ou pela glutaciona peroxidase. Contudo, na presença de metais de transição, como o ferro (Fe^{2+}) e o cobre (Cu^+), os radicais livres hidroxila (OH^{\bullet}), altamente tóxicos, podem ser produzidos por H_2O_2 via reação Fenton. Espécies reativas são mostradas nas caixas em vermelho e enzimas antioxidantes em caixas verdes. GSH, glutaciona reduzida; GS-SG, glutaciona oxidada.

Atualmente sabe-se que a SOD desempenha um importante papel na defesa das células contra os efeitos tóxicos do oxigênio e seus radicais livres. A SOD compete com o óxido nítrico (NO) pelo O_2^- , o qual inativa o NO para formar $ONOO^-$. Depois, pelo “seqüestro” de O_2^- , a SOD promove a atividade do NO. Foram descritas as isoformas Cu,Zn-SOD no espaço extracelular (SOD3), Mn-SOD na matriz mitocondrial (SOD-2) e a Cu,Zn-SOD no citossol e no espaço intermembranas da mitocondria (SOD1) (Beyer e cols., 1991) da SOD. Na retina, a SOD é conhecida como o primeiro passo de defesa antioxidante intracelular. Ela atua como a maior defesa contra a oxidação pelos radicais do superóxido na membrana dos fosfolipídios (Kowluru e cols., 1997).

Dentre os antioxidantes sintetizados pelo nosso organismo, destacam-se o tripeptídeo glutaciona (GSH) que atua em fluidos extracelulares. Este também é conhecido como um dos principais sistemas antioxidantes intracelular, pois está presente em todas as formas de

vida. O GSH é rapidamente oxidado em condições nas quais ocorra um aumento na produção celular de radicais livres, como por exemplo durante o desenvolvimento de uma infecção. A capacidade antioxidante do GSH é devida ao grupo sulfidrila do aminoácido cisteína, que se oxida facilmente e, portanto atua como um redutor celular. O produto de oxidação é o dissulfeto, GSSH. (Ohara, 2006). Nos humanos, protege a retina contra os efeitos tóxicos do ROS e ajuda na manutenção do potencial redox normal celular (Kowluru e cols., 1997).

Tabela 2. Defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (Ohara, 2006).

Enzimáticas (endógenas)	Não enzimáticas (endógenas)	Não enzimáticas (exógenas– dieta)
Superóxido Dismutase	GSH reduzida	Ácido ascórbico (vitamina C)
Catalases	Ácido úrico	α -tocoferol (vit. E)
GSH peroxidases	Albumina	β -caroteno
GSSG redutases		Polifenóis, flavonóides, etc.
Enzimas que repõem NADPH		
Peroxiredoxinas		
Tioredoxinas		
Enzimas de reparo		
Enzimas que sintetizam GSH		

1.5.7 – O potencial efeito antioxidante dos nitróxidos

Os nitróxidos compartilham um grupo de nitróxido reduzido ($\bullet\text{N-O}$) como membro de um anel de 5 ou 6 carbonos. Os mecanismos antioxidantes dos nitróxidos incluem a dismutação do $\text{O}_2\bullet$ para H_2O_2 por ação catalítica, inibição da reação de Fenton (reação do peróxido de hidrogênio com íons de metais de transição Fe^{++} com formação do radical hidroxil $\text{HO}\bullet$), terminação de reações em cadeia dos radicais pela recombinação do radical e a aceitação de elétrons das cadeias de transporte de elétrons mitocondrial. Por este motivo, o considerável potencial dos nitróxidos cíclicos relacionados como antioxidantes têm estimulado inúmeros estudos de suas reações com espécies reativas derivadas de oxigênio. Estudos propõem que nitróxidos atenuam a injúria tecidual em condições inflamatórias

devido principalmente a sua capacidade de reagir rapidamente com ambos, dióxido de nitrogênio e radical carbonato. Em consequência, os nitróxidos são oxidados ao cátion oxamônio correspondente, o qual, por sua vez, pode ser reciclado ao nitróxido através de reações com espécies precursoras, como peroxinitrito e peróxido de hidrogênio, ou com redutores celulares. Um possível mecanismo auxiliar de proteção é a regulação negativa da expressão da i-NOS. Em comparação, as reações de nitróxidos com oxidantes derivados do óxido nítrico têm sido investigadas menos frequentemente.

1.5.8- Estresse oxidativo e a Retinopatia Diabética

O estresse oxidativo, consequente da produção excessiva de ROS e pela supressão da remoção de ROS pelo sistema de defesa antioxidante, está implicada no desenvolvimento de muitas patologias, incluindo a doença de Alzheimer, o diabetes e as suas complicações (Kowluru e cols., 2007).

O estresse oxidativo é considerado a ligação entre os elevados níveis de glicose e as anormalidades metabólicas importantes na patogênese das complicações diabéticas, dentre elas o desenvolvimento e progressão da RD (Kowluru, 2001) com a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) e/ou diminuição dos sistemas antioxidantes, e disfunção mitocondrial (Sivitz e cols., 2010). Estes radicais livres lesam proteínas, lipídeos e ácido desoxirribonucléico, alterando entre outras, a função mitocondrial, mediador central da morte programada da célula (Budd e cols., 2000). 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).

Outro efeito do estresse oxidativo é a participação no ciclo celular induzindo a morte programada das células (apoptose) (Danial e Korsmeyer, 2004). A apoptose é um processo firmemente regulado de morte celular que permite a eliminação de células “não desejadas” (Nicholson e Thornberry, 2003). Entretanto, em certas condições, a apoptose inapropriada contribui na patogênese de câncer, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (Yuan e Yankner, 2000), e também está descrito nas fases iniciais da patogênese da RD, tanto em células vasculares (Joussen e cols., 2001) como em células neurais da retina

(Barber e cols., 1998).

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 parcela menor. Estudos do nosso grupo demonstraram que a mitocôndria contribui significativamente na produção de ânion superóxido (O_2^-) na retina (em torno de 60% da produção total) (Silva e cols., 2009). A produção de O_2^- mitocondrial ocorre através da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Em ambiente hiperglicêmico, fontes geradoras de energia derivadas da glicose aumentam a oferta de elétrons para o transporte mitocondrial. Como resultado, o gradiente de prótons em toda a membrana mitocondrial aumenta até um limite crítico. Neste ponto, a transferência de elétrons para o interior complexo III é bloqueada (Korshunov e cols., 1997), aumentando o nível de elétrons na coenzima Q que doa elétrons, um de cada vez para o oxigênio molecular, gerando assim superóxido (Brownlee, 2005). A produção de O_2^- mitocondrial inicia uma cascata de eventos com a geração de mais O_2^- , peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot), e peroxinitrito ($ONOO^-$), compostos instáveis que lesam lipídeos, proteínas e DNA celulares (Bergamini e cols., 2004).

O H_2O_2 é rapidamente convertido via catalase e glutathione peroxidase, porém com risco de gerar um radical altamente instável, OH^\cdot , o que significa lesão oxidativa da célula. Este radical reage rapidamente com gorduras insaturadas causando peroxidação lipídica (Sullivan e cols., 2000). Estudos demonstraram que os níveis de O_2^- são elevados na retina de ratos diabéticos e em células de retina incubadas com alta taxa de glicose (Du e cols., 2003). O conteúdo de H_2O_2 também está aumentado na retina de modelos experimentalmente diabéticos (Ellis e cols., 2000). A peroxidação lipídica e a lesão oxidativa do DNA (indicada pela presença do 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)) também estão elevadas na retina no DM (Kowluru, 2001). Os níveis de peroxinitrito também foram encontrados elevados na retina no DM de curta duração e permanece elevado até 14 meses de DM em ratos (Kowluru e cols., 2001).

Estudo recente realizado pelo nosso grupo demonstrou que em ratos hipertensos e experimentalmente diabéticos com 4 semanas de idade e 20 dias de duração do DM ocorre um aumento na nitração da tirosina e da lesão do DNA em comparação com os animais diabéticos normotensos. A citotoxicidade demonstrada foi secundária ao aumento da produção de superóxido e uma significativa diminuição nos níveis de glutathione reduzida na retina. Estes dados demonstram que a concomitância do DM e da hipertensão arterial

exacerba os efeitos oxidativos tóxicos na retina o que demonstra o prejuízo do sistema antioxidante (Pinto e cols., 2007).

Juntamente com o aumento das espécies reativas e seus produtos na retina de animais diabéticos, a atividade das enzimas responsáveis pela defesa antioxidante como SOD, glutathione redutase, glutathione peroxidase e catalase também estão diminuídas (Kowluru e cols., 1997; Pinto e cols., 2007). Assim como em modelos animais, pacientes diabéticos também possuem baixos níveis de antioxidantes não enzimáticos como vitamina C, vitamina E e β -caroteno no plasma (Ford e cols., 2003).

O aumento nas espécies reativas e diminuição na defesa antioxidante, como demonstraram os estudos citados acima, são observados tanto em modelos experimentais, quanto em pacientes diabéticos. Pacientes diabéticos tipo 2, possuem aumento da produção dos radicais livres, e diminuição dos mecanismos antioxidantes, o que têm sido associado às complicações microvasculares do DM, incluindo a RD (Dandona e cols., 1996). Portanto o aumento da produção de superóxido associado com diminuição do sistema antioxidante pode estar envolvido no mecanismo das complicações retinianas no DM.

1.6 – Poli (ADP-ribose) polimerase (PARP)

Poli ADP-ribose polimerases (PARPs) são enzimas nucleares que catalisam a transferência de múltiplos grupos ADP-ribose da nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NAD) para as proteínas alvo. Esta transferência é considerada uma modificação pós-translacional que recebe o nome de poli (ADPribosil)ação. A família da PARP é composta por 17 membros e cada um deles possuem diferentes funções e estruturas na célula. Além da regulação de sobrevivência e morte programada das células, a família da PARP está associada a outras funções biológicas como a regulação de transcrição, coesão do telômero e formação do fuso mitótico durante a divisão celular, tráfico intracelular e metabolismo energético (Schreiber e cols., 2006).

A NAD é composta por dois nucleotídeos juntos no grupo fosfato, sendo um nucleotídeo com base de adenina e outra contendo uma base de nicotinamida. É uma biomolécula versátil conhecida há décadas que possui a função de uma coenzima em

diversas reações de oxidorredução (Rongvaux e cols., 2003). NAD^+ também serve como um substrato em processos celulares em que a molécula de ADP-ribose é transferida ou para um receptor de aminoácidos, que é referido como mono ou poli (ADP-ribosil)ação (dependendo se uma ou mais molécula de uma fração é transferida) ou para um grupo acetil para gerar 2'-Oacetyl - ADP-ribose. Em ambos os casos, a NAD^+ resultante do consumo e a concomitante produção de derivados de ADP-ribose poderia se ligar ao NAD^+ e proporcionar estado de energia para vários aspectos da sinalização celular (Berger e cols., 2004).

A isoforma mais caracterizada e estudada é a PARP-1, responsável pela organização espacial e temporal do reparo do DNA. Em resposta à fragmentação do DNA, ela transfere unidades de ADP-ribose do NAD^+ para as proteínas nucleares. O NAD^+ é utilizado como substrato para catalisar a ligação covalente das unidades de ADP-ribose do grupo carboxílico- γ dos resíduos do aminoácido Glu de proteínas receptoras que normalmente estão associadas com transações do DNA (heteromodificação) ou da própria PARP-1 (automodificação). O polímero resultante da ADP-ribose (PAR) pode interagir de forma seletiva, com um número de alvos de proteínas que estão envolvidas na resposta celular aos danos no DNA e no metabolismo do DNA. Estes alvos contêm ligações de PAR que muitas vezes confunde-se com um domínio funcional, tais como uma proteína ou um domínio ligado ao DNA e isso explica como ligações de PAR podem alterar as propriedades funcionais dos alvos (Pleschke e cols., 2000).

A PARP-1 é também conhecida por desempenhar o papel fundamental em vários distúrbios agudos e crônicos de inflamação (Mabley e cols., 2001), doenças cardiovasculares, câncer e diabetes mellitus (Schreiber e cols., 2006). Em algumas situações, ela funciona como um co-ativador de fatores de transcrição como o NF- κ B resultando na síntese de mediadores pró-inflamatórios (Hassa e cols., 2003). Entre eles, está a iNOS, que produz óxido nítrico e, posteriormente, peroxinitritos e radicais hidroxila altamente reativos que, por sua vez, causam danos no material genético na célula-alvo. Em seguida, o resultado da ativação da PARP-1 irá induzir a morte celular independente da caspase, a qual envolve a liberação da proteína indutora de apoptose (AIF), flavoproteína, da mitocôndria (Yu e cols., 2002). Como as caspases não estão envolvidas neste processo, a PARP-1 se mantém intacta para ser ativada pelo DNA fragmentado, o que resulta na síntese excessiva de PAR, NAD^+ , esgotamento de ATP e, finalmente, morte celular.

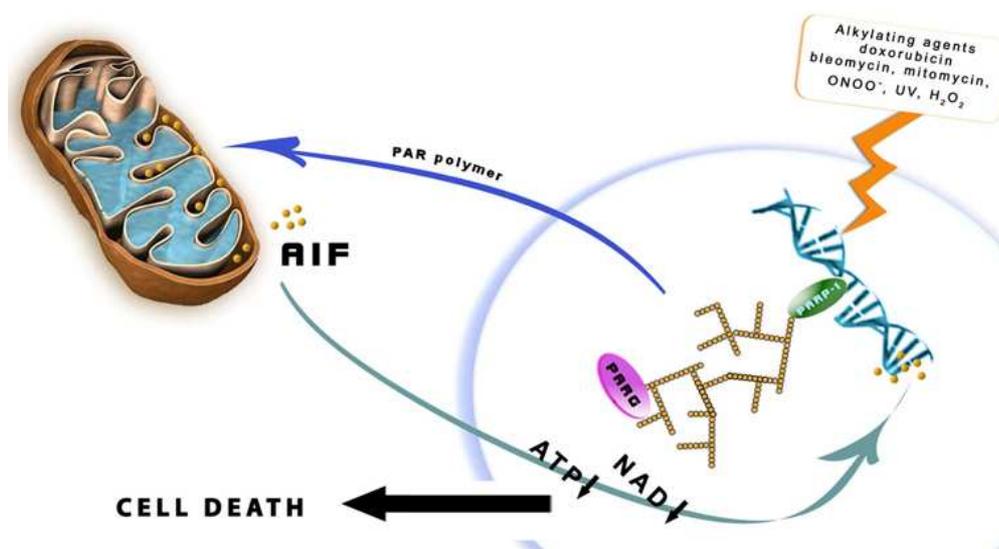


Figura 23. A intensa poli ADP-ribosilação resulta em níveis elevados de apoptose. Em situações de estresse oxidativo, a produção excessiva de PARP-1 aumenta o consumo de NAD⁺ celular que acarreta na depleção de NAD⁺ e ATP. A crise energética pode culminar na disfunção e morte celular. Esta apoptose pode ser caspase-independente e ser mediada pelo fator de indução de apoptose (AIF).

O desenvolvimento das complicações do DM está associado ao aumento do estresse oxidativo e nitrosativo o que pode danificar o DNA levando à ativação da PARP (Obrosova e cols., 2005). A super ativação desta enzima exacerba o estado oxidativo da célula através do seu consumo de NAD. Ela está associada a doenças relacionadas ao diabetes como disfunção endotelial e do miocárdio (Garcia Soriano e cols., 2001; Pacher e cols., 2002), neuropatia autonômica e periférica (Obrosova e cols., 2008) e nefropatia (Szabo e cols., 2006).

O papel da PARP nas complicações oculares dos diabéticos merece uma avaliação profunda, considerando que a PARP-1 é expressa abundantemente no cristalino (Tamada e cols., 2000) e na retina (Obrosova e cols., 2006). Sua ativação contribui para a formação de pericitos fantasmas e capilares acelulares, (Zheng e cols., 2004), aumento da adesão de leucócitos nas células endoteliais (Sugawara e cols., 2004) e formação de VEGF (Obrosova e cols., 2004) e angiogênese (Tentori e cols., 2007). Na RD, dentre as características iniciais, observa-se o aumento da produção de fatores vasoativos, como a endotelina 1 (ET-1) e o

aumento da síntese de proteínas de matriz extracelular (ECM) como a fibronectina (FN) FN (Xu e cols., 2008). Este aumento de fatores vasoativos pode ser explicado pela ativação do NFκB pela PARP (Hassa e cols., 2003). PARP modula a atividade NFκB através da histona acetiltransferase (HAT). A p300 é provavelmente a mais importante, pois desempenha papel fundamental na diferenciação e na regulação do crescimento de diversos fatores de transcrição (Goodman e Smolik, 2000). A expressão do mRNA da p300 é significativamente reduzida em células de murinos deficientes de PARP (Hassa e cols., 2003). A alta concentração de glicose faz com que a promove o aumento da regulação da p300 nas células endoteliais e no coração e na retina de animais diabéticos (Kaur e cols., 2006). A ativação epigenética do p300 pode afetar vários fatores de transcrição, como os fatores de transcrição da família MEF2 em miócitos cardíacos (McKinsey e cols., 2002). Em alguns sistemas, o aumento de proteínas do MEC está ligado à fatores de transcrição como o MEF2 (Wang e cols., 2004). Foi descrito que a ativação da PARP também está implicada na formação de catarata em ratos diabéticos (Drel e cols., 2009).

Estudos farmacológicos têm demonstrado os benefícios terapêuticos de várias classes de inibidores de PARP em diferentes modelos de inflamação, doença neurodegenerativas e vasculares, sendo que alguns destes inibidores entraram em estudos clínicos com humanos (Jagtap e Szabo, 2005). A inibição da PARP no diabetes também impede a manifestação da ativação glial (acúmulo de GFAP) e apoptose na retina neural (Drel e cols., 2009).

1.7 – TEMPOL

O TEMPOL (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidine-1-oxil) é um radical livre extremamente estável sintetizado na década de 1970 por cientistas russos. Devido à sua alta estabilidade é facilmente detectado e é comumente utilizado como uma sonda em espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).

Apresenta baixo peso molecular, metal-independente, mimético da enzima antioxidante SOD, com excelente permeabilidade celular. Desempenha funções semelhantes a outras enzimas, como a catalase, facilitando o metabolismo do peróxido de hidrogênio. Este composto está entre os mais potentes nitróxidos na proteção de células e tecidos contra danos causados pelo ROS (Krishna e cols., 1992, 1996a, 1998) e atenuam a injúria tecidual

em condições inflamatórias devido principalmente a sua capacidade de reagir rapidamente com ambos, dióxido de nitrogênio e radical carbonato. Em consequência, os nitróxidos são oxidados ao cátion oxamônio correspondente, o qual, por sua vez, pode ser reciclado ao nitróxido através de reações com espécies precursoras, como peroxinitrito e peróxido de hidrogênio, ou com redutores celulares em condições inflamatórias, os quais são caracterizados por um aumento da produção de óxido nítrico e derivados oxidantes.

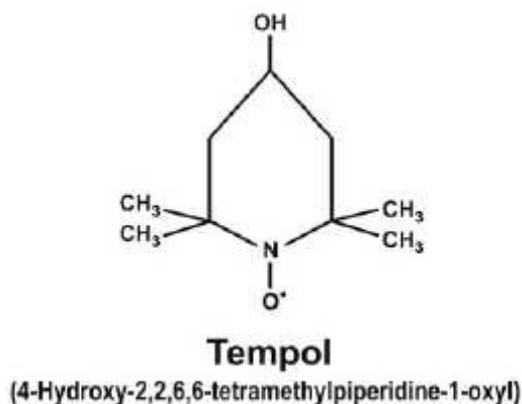


Figura 24. Estrutura molecular do TEMPOL (Wilcox e Pearlman, 2008).

O TEMPOL possui um importante papel atuando como hipotensor. Muitos estudam abordam a hipótese de que os efeitos antihipertensivos seja a restauração da ação do NO, cuja bioatividade encontra-se incompleta nos vasos sanguíneos e no rim durante a hipertensão (Wilcox, 2005; Wilcox e Pearlman, 2008). O TEMPOL provavelmente melhora os efeitos do NO• através da prevenção da bioinativação pelo O₂•⁻ (Rubanyi and Vanhoutte, 1986); aumento do estímulo de geração de NO endotelial através da “shear forces” (pressão mecânica causada pelo fluxo sanguíneo na parede do endotélio), pela interrupção da incorporação do NO na glutatona formando o S-nitrosoglutatona (Schrammel e cols., 2003) e pelo reacoplamento da eNOS através da melhora da disponibilidade da forma reduzida da tetrahydrobiopterina (BH4) (Cai e Harrison, 2000). Este efeito de “direcionar” o óxido nítrico para desempenhar papéis fisiológicos e não patológicos é dependente da cGMP. Autores propõem que TEMPOL melhora a sinalização do NO via cGMP em modelos de estresse oxidativo (Liu e cols., 2007b).

Estudos demonstraram a rapidez da permeabilidade do TEMPOL nas células e a ampla distribuição no organismo sendo capaz de reagir com o O_2^{\bullet} do citoplasma e da mitocôndria (Van der Poel e cols., 2006). Este composto também foi capaz de penetrar intacto na pele (Herrling e cols., 2002) onde esteve acumulado no compartimento de lipídeos no estrato córneo (Li e cols., 2001), ser distribuído rapidamente no humor aquoso (Zamir e cols., 1999) e ser difundido através da cartilagem para dentro do osso (Fischer e cols., 1995). Estudos extensos são necessários para demonstrar o difícil mecanismo de proteção do TEMPOL contra as espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio. Recentemente, demonstrou-se que o TEMPOL desvia a nitração da decomposição do peroxinitrito para espécies nitrosativas através da reação com os radicais derivados do peroxinitrito oxidado, o radical hidroxil e o ânion radical carbonato, para produzir o cátion oxamonium que oxida o peroxinitrito para oxigênio e óxido nítrico (Carrol e cols., 2000). Deste modo, os efeitos protetores do TEMPOL contra as lesões associadas à superprodução de óxido nítrico (Cuzzocrea e cols 2000) poderiam ser atribuídos à sua atividade de superóxido dismutase na prevenção da produção de peroxinitrito (Offer e cols 2000), na catálise da decomposição de peroxinitrito para trióxido de dinitrogênio (Bonini e cols 2001) ou ambos. Estudos têm demonstrado a importante ação conferida pelo TEMPOL na redução de ativação da PARP, como por exemplo observado em modelo animal de periodontite (Di Paola e cols., 2005).

Um estudo realizado por Chen et al. (2007) demonstrou que a associação do tratamento de TEMPOL + NAC reduziu a leucostase (fenômeno precoce na patogênese da RD) na retina de ratos com 2 semanas de DM induzido por estreptozotocina e na retina de ratos que receberam injeção intravítrea de ANG II (Chen e cols., 2007). Outro estudo demonstrou que o TEMPOL conferiu neuroproteção em retina de modelos experimentais de glaucoma, pois foi capaz de eliminar a nitração da tirosina, atenuar a peroxidação lipídica e reduzir o número de células em apoptose (El-Remessy e cols., 2003). Este efeito neuroprotetor também foi observado em compostos derivados da forma reduzida do TEMPOL-H (OT-551), os quais foram capazes de inibir a peroxidação lipídica resultando na melhora morfológica e funcional das células fotoreceptoras da retina em animais expostos à luz (Tanito e cols., 2007). Em cultura de células, a associação de TEMPOL com inibidor de caspase promoveu a redução da produção de ROS e aumentou em torno de 20% a sobrevivência de células ganglionares da retina (Tezel e Yang 2004). Este efeito observado

em células ganglionares foi observado em modelos animais tratados somente com TEMPOL ou a associação deste com sobrecarga de ferro (Thaler e cols. 2009). A forma reduzida, TEMPOL-H (OT-674) mostrou também ser um potente antioxidante contra os processos foto oxidativo gerado em cultura de células pigmentares de retina, o qual é considerado um grande fator de risco para o desenvolvimento de edema macular (Zhou e cols., 2008).

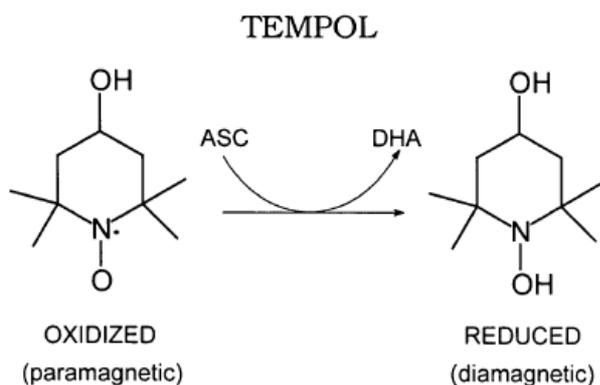


Figura 25. A redução da forma oxidada 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-n-oxyl (TEMPOL) para a forma reduzida (TEMPOL-H) pelo ácido ascórbico (Sasaki e cols., 1998).

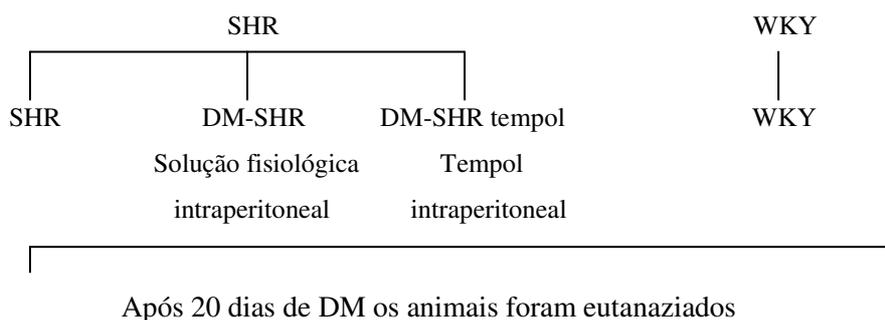
Devido ao fato de nenhum agente farmacológico seguro até o momento ter sido eficaz em prevenir, retardar ou reverter a RD e os tratamentos intervencionistas disponíveis serem a fotocoagulação à laser, a vitrectomia e as injeções intravítreas de algumas drogas, faz-se necessário o estudo de um possível fármaco capaz de proteger a retina de marcadores precoces da RD. Conhecendo o estresse oxidativo como uma via capaz de explicar as anormalidades bioquímicas presentes na RD, tem sido observado o grande desempenho dos antioxidantes em estudos com RD. Mediante a esta realidade, o objetivo deste trabalho foi estudar e investigar os efeitos do nitróxido TEMPOL na retina de um modelo animal espontaneamente hipertenso e experimentalmente diabético e compreender os possíveis mecanismos envolvidos na ação deste cristal laranja considerado um antioxidante não-clássico. A compreensão terapêutica obtida deste mimético acarretará em futuros estudos do uso tópico deste fármaco na RD.

3.1. Animais

Para este estudo foram utilizados ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos, wistar-kyoto (WKY) com 4 semanas de idade. Os animais SHR diabéticos (DM-SHR), após a confirmação da indução do DM, foram randomizados a receber (DM-SHR tempol) ou não tratamento intraperitoneal de TEMPOL (250 mg/Kg/dia), de acordo com publicações prévias (Biswas e Lopes de Faria, 2007). O grupo DM-SHR que não recebeu tratamento, injetou-se solução fisiológica (NaCl) para obter o mesmo “estresse”gerado pelas aplicações de injeções intraperitoneal. A duração do DM foi de 20 dias. O rato SHR, é o modelo mais estudado de hipertensão arterial observado em número de publicações (Pinto e cols., 1998). Esta linhagem foi obtida durante 1960 por Okamoto e colaboradores, em Kyoto, Japão, através de seleções de cruzamentos de ratos WKY com pressão elevada e que utilizou o WKY como controle do SHR (Okamoto, 1963). O desenvolvimento da hipertensão inicia em torno de 5 à 6 semanas de idade, atingindo as pressões sistólica entre 180 e 200 mmHg na fase adulta (Conrad, 1995). Os animais foram criados no biotério central da Unicamp a partir de matrizes importadas da Taconic (Germantow NY, EUA). 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 Institucional local para experimentação animal (CEEA/IB/UNICAMP, protocolo nº 1408-1). 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% (30 mg/Kg Hipnol®, Fontoveter, Brasil).

Desenho do estudo:

Animais com quatro semanas de idade (4 grupos):



3.2. Procedimentos

3.2.1. Peso dos Animais

Os animais foram pesados no início para os cálculos de estreptozotocina (STZ) e para o registro de peso inicial dos dados de parâmetros fisiológicos dos grupos estudados e no dia do sacrifício para comparação entre os grupos.

3.2.2. Medida da pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica foi determinada na cauda dos ratos, aquecidos a aproximadamente 36°C por aproximadamente 10 minutos, não anestesiados e acostumados ao procedimento, utilizando-se um sensor em um *cuff* na cauda dos ratos. Os valores foram registrados por um pletismógrafo (Narco Bio System, Houston, Tx, USA). Foram consideradas 4 medidas consecutivas semelhantes para a obtenção da média de cada animal.

3.2.3. Indução de *diabetes mellitus*

A indução do DM foi realizada através da injeção de STZ, 60 mg/Kg (Sigma, St Louis, MO, USA), na veia caudal, dissolvida em tampão citrato 0,5 M, pH 4,5. A STZ é um agente anti-bacteriano de largo espectro que foi isolado de *Streptomyces achromogenes* em 1959 (HERR e cols., 1960) e tem sido amplamente utilizado em pesquisas sobre o DM. A atividade diabetogênica ocorre pela necessidade do núcleo de glicose na molécula de STZ exercer uma função carreadora, promovendo o contato com a membrana da célula β , produtora de insulina (Rerup, 1970). Com isso, o transportador de glicose das células β , GLUT2, parece ser uma molécula alvo essencial da toxicidade da STZ sobre essas células, um evento que precede as reações químicas contra as células β (Wang e Gleichmann, 1998) quando submetidas a doses diárias pequenas de STZ. Se o modelo experimental for através de injeção de alta dose de STZ, como neste caso, ocorre metilação do DNA das células β e apoptose. Os animais dos grupos controles receberam injeção endovenosa de tampão citrato, seguindo o mesmo protocolo utilizado para o grupo diabético.

Após 48 horas da injeção de STZ, a confirmação da presença do DM foi realizada através da glicemia dos animais pelo método da glicose oxidase (Glicose PAP Liquiform, Labtest 1 e 2) e incluídos no estudo animais com glicemia acima de 15 mmol/L (270 mg/dl). Antes do sacrifício dos animais, a glicemia foi realizada novamente para confirmação do estado diabético.

3.2.4. Glicemia

A glicemia foi realizada após 3 horas de jejum dos animais. Os ratos foram anestesiados e o sangue periférico da cauda do animal foi coletado. Imediatamente, o sangue foi colocado em *eppendorf* heparinizado, centrifugado a 3.000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante, ou seja, o plasma foi utilizado para a determinação da glicemia através do método enzimático colorimétrico (Glicose PAP Liquiform, Labtest 1 e 2). Tubos de ensaio contendo 1 ml do reagente de cor receberam 10µl do padrão de glicose ou 10 µl de amostra e foram homogeneizados. Os tubos foram incubados em banho-maria à 37°C durante 15 minutos. Após esta etapa, a leitura foi realizada no espectrofotômetro em comprimento de onda de 500 nm. As amostras foram analisadas em duplicata e os padrões em triplicata. O valor para hiperglicemia foi considerado acima de 15 mmol/L (270 mg/dl).

3.2.5. Preparo do TEMPOL

Para este tratamento, utilizou o nitróxido TEMPOL, 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidine-1-oxil, mimético da superóxido dismutase (Calbiochem) com fórmula molecular de $C_9H_{18}NO_2$ e massa molar de 172,2. O tratamento com TEMPOL foi administrado através de injeção intraperitoneal (250mg/Kg equivalente a 1,45µmol/g). A droga e o animal foram pesados diariamente. O TEMPOL foi diluído em 400 µl de solução fisiológica (NaCl) e aplicado imediatamente nos animais.

3.2.6. Preparo dos globos oculares para estudos de imunohistoquímica

O mecanismo básico da imuno-histoquímica é o reconhecimento do antígeno a ser pesquisado por um anticorpo específico. A técnica usual utiliza um anticorpo secundário, que se liga ao anticorpo primário e é associado a um complexo de visualização (complexo avidina-biotina-enzima-cromógeno ou polímero com amplificação). O cromógeno mais utilizado é o DAB (diaminobenzidina) que confere cor marrom ao precipitado permanente. As áreas "positivas" coram-se de marrom e as "negativas" com o corante utilizado para contra-coloração, geralmente a hematoxilina (azul). Após a eutanásia dos animais, os olhos foram enucleados, fixados "overnight" em paraformaldeído 4 % e posteriormente transferidos para álcool 70%. À seguir, os globos oculares receberam tratamento com xilol e álcool e, foram incluídos em parafina. Os cortes foram seccionados transversalmente com 5 micrômetros de espessura e transferidos para uma lâmina tratada com a solução de poli-lisina (Sigma-Aldrich, EUA). Foram utilizados 8 cortes não consecutivos de retina de um olho para cada animal e foram analisados pelo menos 3 animais por grupo

3.2.7. Extração de proteína retiniana para ensaios de Western Blot

Western blot é um método em biologia molecular e bioquímica para detectar proteínas em um homogenato (células bem trituradas) ou um extrato de um tecido biológico. Essa técnica usa eletroforese em gel para separar as proteínas desnaturadas por massa. As proteínas são transferidas do gel para uma membrana (tipicamente de nitrocelulose), onde serão usados como sonda anticorpos específicos à proteína. Como resultado, é possível analisar a expressão da proteína em uma dada amostra e comparar os níveis entre os diversos grupos.

Para extração de proteína retiniana, as retinas foram isoladas do epitélio pigmentado da retina e transferidas para 300µl de tampão de homogeneização (Tris-HCL 30 mM, EGTA 10 mM, EDTA 5 mM, sacarose 250 mM e 1 mM DTT (DL-Dithiothreitol), pH 7.5 suplementado com 12 µl de coquetel de inibidores de protease (Complete®, Boehringer Mannheim, Germany). O homogeneizado foi submetido às ondas de ultra-som. Após centrifugação, 9000 RPM por 10 minutos à 4°C, uma alíquota foi separada para quantificação da proteína total pelo método de Bradford (Bradford, 1976). O restante 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.

3.3. Experimentos

3.3.1. Western blot para quantificação da expressão protéica de GFAP, FN, Cu-Zn SOD, PARP and iNOS em tecido retiniano

Primeiramente foram realizados ensaios para otimização dos métodos para cada proteína estudada. Amostras de 20, 50, 60 e 100 µg de proteína de retina para GFAP, FN e PARP, Cu-Zn SOD e iNOS respectivamente foram submetidas à eletroforese em gel de 10% (com exceção da PARP, 9%) com SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad). Em seguida, foi realizado bloqueio inespecífico com leite desnatado 5% ou BSA 1% (para i-NOS) em tampão TBS-T (10 mM Tris-base, 15 mM NaCl e Tween-20 a 1%). A seguir as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários: cabra policlonal anti-GFAP (1:100, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA), cabra policlonal anti-FN (1:1000, Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA), coelho policlonal anti-iNOS (1:500, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), coelho policlonal anti-Cu-Zn SOD (1:4000, Upstate, Cell Signaling Solutions, NY) ou camundongo monoclonal anti-PARP (1:1000, Trevigen, Gaithersburg, MD) e então incubadas com os respectivos anticorpos secundários conjugados com HRP. Os sinais foram visualizados através de quimioluminescência (SuperSignal™ CL-HRP Substrate System, Pierce, Rockfor, IL), de acordo com as instruções do fabricante, e posteriormente autoradiografadas. Para confirmação da uniformidade da concentração das proteínas, as membranas foram lavadas com tampão TBS-T, bloqueadas com leite 5 % e reblotadas com anticorpo de cabra policlonal anti β-actina (1:500; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) em BSA 1%, seguido pelo anticorpo anti cabra IgG conjugada com HRP (1:5000; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) em leite 5%. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria computadorizada (BIO-RAD Model GS 700 Imaging Densitometer). Foram realizados experimentos em triplicatas.

3.3.2. Imunohistoquímica para detecção de proteína acídica fibrilar glial (GFAP) na retina

O GFAP, subunidade dos filamentos intermediários do citoesqueleto celular, está presente no citoplasma de células gliais como os astrócitos. O aumento da imunoreatividade do GFAP nas células gliais da retina confirmam a neurodegeneração.

Os cortes foram submetidos à desparafinização com xilol, re-hidratação com passagens por concentrações decrescentes de etanol, recuperação antigênica em tampão citrato 10 mM pH 6,0 com aquecimento em microondas (2 ciclos de 5 min.) e posterior banho de gelo de 20 min. O bloqueio da peroxidase endógena com metanol e peróxido de hidrogênio e bloqueio das ligações inespecíficas com leite desnatado 1% em PBS (tampão fosfato) 1 hora; à seguir as lâminas foram incubadas com o anticorpo policlonal de cabra anti-GFAP (1:100, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) em BSA 1% à 4°C *overnight*. Após 3 lavagens de 5 minutos em PBS, aplicou-se o anticorpo secundário anti cabra IgG conjugado de biotina (1:200, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) foi aplicado por 1 hora em temperatura ambiente. Após as lavagens novamente com PBS, as lâminas foram incubadas com complexo avidina-biotina 1:50 (ABC) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) por 40 minutos seguido pela adição de diaminobenzidina tetrahydroclorido (DAB) (Sigma). Os cortes foram reidratados e montados com entellan; o controle negativo foi obtido omitindo-se o anticorpo primário. Esta imunolocalização foi realizada apenas para observar a intensidade da reação glial nas camadas da retina.

3.3.3. Imunohistoquímica para detecção de nitrotirosina (NT)

O peroxinitrito é um poderoso agente oxidante e nitrante que pode danificar diretamente proteína lipídeos e DNA (Halliwell, 2006). O peroxinitrito pode reagir com resíduos de tirosina presentes em proteínas formando a nitrotirosina. Portanto, a nitrotirosina pode ser usada como um biomarcador de estresse oxidativo e nitrosativo. O ensaio iniciou-se com os cortes na estufa a 60°C por 1 hora. Após esta primeira etapa de recuperação antigênica, o tecido foi desparafinizado com xilol, re-hidratado com passagens por concentrações decrescentes de etanol, recuperação antigênica em tampão citrato 10 mM pH 6,0 aquecido em microondas (2 ciclos de 2,5 min.) e posterior banho de gelo de 20 min. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com metanol e peróxido de hidrogênio e bloqueio das ligações inespecíficas com leite desnatado 1% em PBS (tampão fosfato) 1 hora;

à seguir as lâminas foram incubadas com o anticorpo policlonal de coelho anti-NT (1:200, Upstate Cell Signaling Solutions, Lake Placid, NY) em BSA 1% à 4°C *overnight*. Após 3 lavagens de 5 minutos em PBS, as lâminas receberam anticorpo secundário anti coelho IgG conjugado de biotina (1:200, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) por 1 hora em temperatura ambiente. Após as lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com complexo avidina-biotina 1:50 (ABC) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) por 40 minutos seguido pela adição de diaminobenzidina tetrahydroclorido (DAB) (Sigma). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina, desidratados e montados com entellan; o controle negativo foi obtido omitindo-se o anticorpo primário. As lâminas foram observadas em um microscópio Leica DMLS (Leica, Bensheim, Germany) sob o aumento de 1000x. As imagens da retina foram digitalizadas com câmera Samsung S1030 conectada ao microscópio. Foi considerada a porcentagem de intensidade por área de retina obtida através do software Bio Color Scanner™ Versão 226.

3.3.4. Imunohistoquímica para detecção de poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)

O tecido foi desparafinado com xilol, re-hidratado com passagens por concentrações decrescentes de etanol e a recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato 10 mM pH 6,0 com aquecimento em microondas (2 ciclos de 5 min.) e posterior banho de gelo durante 20 min. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com metanol e peróxido de hidrogênio durante 10 min. e o bloqueio das ligações inespecíficas com leite desnatado 1% em PBS (tampão fosfato) 1 hora; à seguir as lâminas foram incubadas com o anticorpo monoclonal de camundongo anti-poli (ADP) ribose (PAR) (1:1000, Trevigen, Gaithersburg, MD) em BSA 1% à 4°C *overnight*. Este anticorpo detecta a atividade da PARP através da ribosilação das proteínas. Após 3 lavagens de 5 minutos em PBS, o polímero marcado com fosfatase alcalina conjugado com anticorpo de anti camundongo IgG conjugado de biotina (1:200, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) foi aplicado por 1 hora em temperatura ambiente. Após as lavagens novamente com PBS, as lâminas foram incubadas com complexo avidina-biotina 1:50 (ABC) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) por 40 minutos seguido pela adição de diaminobenzidina tetrahydroclorido (DAB) (Sigma). Os cortes foram lavados em água destilada e posteriormente água corrente, reidratados e montados com entellan; o controle negativo foi obtido omitindo-se o anticorpo primário. As lâminas foram observadas em um microscópio Leica DMLS (Leica, Bensheim,

Germany) sob o aumento de 1000x. Imagens da retina foram digitalizadas com câmera Samsung S1030 conectada ao microscópio. Para análise quantitativa, foi considerada a porcentagem de positividade de células por área de retina utilizando o software Bio Color Scanner™ Versão 226.

3.3.5. Detecção do ânion superóxido

Como previamente descrito (Du e cols., 2003), a lucigenina (bis-N-metilacridínio nitrato) (Invitrogen Inc., Eugene, OR) é um composto que emite luz quando interage com o superóxido. A retina foi extraída e transferida para um tubo de polipropileno contendo 250 µl de tampão RPMI e incubada por 5 horas em incubadora de CO₂ à 5% de concentração do gás, à 37°C e em atmosfera umidificada a 95%. Após este período, foram adicionados 25 µM de lucigenina e realizadas 15 leituras com intervalos de 12 segundos no luminômetro (TD 20-E Luminometer Turner, USA) totalizando 3 minutos de leitura para cada amostra. A média destes valores foi normalizada pela concentração de proteína total quantificada por Bradford (Bradford, 1976). A produção de superóxido foi expressa em unidades relativas de luminescência URL/min/mg de proteína. A concentração de proteína foi quantificada pelo método de Bradford (1976). A fórmula para os cálculos de produção de superóxido pelo método quimioiluminescente da lucigenina está descrito abaixo:

$$\text{RLU: } 1000 \times \text{média das leituras} \\ [] \text{ prot.}(\mu\text{g}) \times 250\mu\text{l}$$

3.3.6. Quantificação dos níveis dos produtos finais do óxido nítrico (NO_x⁻) em tecido de retina

Diversos tipos celulares produzem óxido nítrico em níveis de picomolar para nanomolar. A determinação direta dos níveis de NO é difícil devido a sua curta meia-vida e às muitas reações nas quais participa (Walters e cols., 1987). Por este motivo, a análise dos produtos estáveis do NO, nitrito (NO₂) e nitrato (NO₃) são frequentemente analisados para determinação endógena de formação de NO.

A retina de 1 olho foi extraída e sonicada em 150 μ l de tampão de homogeneização com 6 μ l de inibidor de protease. Após esta etapa, o homogenato foi centrifugado a 9000 rpm, 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi separado, retirou-se uma alíquota para quantificação de proteína e o restante foi armazenado a -80°C. No dia da análise, as amostras foram centrifugadas novamente a 11.000 rpm à 4°C durante 15 minutos.

Os produtos do NO presentes no tecido da retina foram detectados através de um aparelho de quimioluminescência do Instituto de Química da Unicamp (Nitric Oxide Analyser - NOA, Sievers Instruments Inc, Boulder, Colorado, E.U.A.). Com uma seringa, alíquotas de 4 μ L de amostra foram adicionados a uma purga de câmara contendo cloreto de vanádio (VCl_3) (97 ° C) (Aldrich Chemical Company) em HCl 1N sob uma atmosfera de nitrogênio. A solução de VCl_3 reduz nitrito e nitrato para gás NO, o qual é detectado pelo NOA. O NO liberado das amostras, convertido em gás e conduzido ao NOA, reage com o ozônio para produzir um sinal de quimioluminescência. O espectro de luz é proporcional à concentração de NO, o qual é calculado a partir de uma curva padrão de concentrações de NO_3 conhecida. Cada amostra foi analisada em triplicata. O valor final obtido em μ mol/l de NO_x^- foi corrigido pela concentração de proteína.

3.3.7. Quantificação dos níveis de glutatona reduzida através de ensaio colorimétrico

Os níveis de glutatona reduzida foram avaliados pela metodologia de Beutler (Beutler e cols., 1963). As retinas foram extraídas e colocadas em eppendorf contendo 300 μ l de ácido tricloroacético 10% (TCA), 5mM EDTA e sonicadas. O homogenato foi centrifugado a 3000 RPM por 15 minutos a 4°C. As proteínas são desnaturadas pelo TCA e os aminoácidos ficam no sobrenadante. 200 μ l do sobrenadante foi colocado em 1 ml de Na_2HPO_4 e 125 μ l de ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) em tubo de ensaio. Uma curva foi feita com diferentes concentrações de solução padrão de glutatona reduzida adicionadas à 1 ml de Na_2HPO_4 e 125 μ l de DTNB em tubos de ensaio. Os tubos foram homogeneizados no vórtex e a leitura foi iniciada no espectrofotômetro a 412nm (Kowluru, 2001). A proteína total foi quantificada pelo método de Bradford. A expressão da glutatona reduzida de cada animal foi calculada segundo sua concentração pela concentração total da proteína.

3.3.8. Atividade da Cu-Zn superóxido dismutase (SOD)

Para este ensaio foi utilizado 1 retina. Após a extração, a retina foi lavada em PBS com heparina para remoção de eritrócitos e sonicada em 150µl de solução tampão HEPES 20mM pH 7,2 contendo 1mM EGTA, 210 mM manitol e 70mM. O homogenato de tecido foi centrifugado 1,500 x g por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi removido e armazenado a -80°C. Uma alíquota foi separada para quantificação de proteína.

A atividade da enzima de Cu-Zn SOD foi estimada usando o kit da Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Este kit utiliza um sal de tetrazólio para detectar o radical superóxido gerado pela xantina oxidase e hipoxantina. Uma unidade de SOD é definida com a quantidade de enzima suficiente para dismutar 50% do radical superóxido. O ensaio mede a atividade da Cu-Zn SOD no tecido. A curva padrão foi obtida utilizando concentrações conhecidos de SOD. A reação foi iniciada pela adição de 20 µl de xantina oxidase diluída. A leitura foi realizada no espectrofotômetro (Elx800, Bio-Tek Ins, E.U.A.) monitorado continuamente a absorbância de 450 nm. Os cálculos foram feitos de acordo com o fabricante e corrigidos pela concentração de proteína obtida pelo método de Bradford. Os valores finais foram obtidos em Unidade de SOD/mg de proteína.

3.3.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio-padrão. Análises de Variância (ANOVA) seguido do teste de Fisher foram utilizadas para comparação das diversas variáveis entre os grupos de animais estudados e identificação dos grupos diferentes. Todos os valores foram analisados com o uso do software estatístico StatView. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.1. Características fisiológicas dos animais estudados

Os animais do grupo SHR com 4 semanas de idade apresentaram menor peso inicial comparado aos animais do grupo WKY ($p < 0.0001$) e esta característica manteve-se até o final do estudo ($p < 0.0001$). Como esperado, o ganho ponderal no grupo DM-SHR foi menor em relação ao CT-SHR ($p < 0.0001$). Este ganho no grupo DM-SHR tratado com TEMPOL reduziu significativamente comparado ao grupo não tratado DM-SHR ($p = 0.03$). A pressão arterial sistólica (PAS) final nos grupos SHR foi significativamente maior em relação ao grupo WKY ($p = 0.004$) e não foi modificada com o tratamento. Os níveis de glicose apresentaram-se elevados nos ratos diabéticos comparados aos grupos não diabéticos ($p < 0.0001$) e não foi afetada pelo tratamento (tabela 3).

Tabela 3 - Características fisiológicas dos animais estudados

Grupos	Peso inicial (g)	Peso final (g)	•PAS (mmHg)	Glicemia (mmol/L)
WKY (n=28)	117,2 ± 21,1	288,5 ± 26,0	129,2 ± 18,3	9,6 ± 1,2
SHR (n=27)	70,4 ± 8,4*	196,0 ± 20,7 [†]	152,8 ± 11,1 ⁺	9,1 ± 2,0
DM-SHR (n=31)	69,9 ± 10,5*	125,4 ± 34,6 ^{†‡}	151,1 ± 21,4 ⁺	29,5 ± 4,0 [#]
DM-SHR TEMPOL (n=30)	68,3 ± 8,0*	107,4 ± 18,5 ^{†‡§}	152,6 ± 14,6 ⁺	29,9 ± 6,0 [#]

•PAS: Pressão arterial sistólica. * $p < 0,0001$ vs WKY; [†] $p < 0,0001$ vs WKY e [‡] $p < 0,0001$ vs SHR; [§] $p = 0,03$ vs DM-SHR; ⁺ $p = 0,003$ vs WKY; [#] $p < 0,0001$ vs SHR e WKY.

4.2. Observação da presença de marcadores precoces da retinopatia diabética

Primeiramente, avaliou-se a possível presença de marcadores precoces da retinopatia diabética na retina dos animais dos grupos estudados. Neste estudo foram considerados como marcadores, a expressão de proteína acídica fibrilar glial (GFAP) associada à neurodegeneração e a expressão de fibronectina (FN), observada no acúmulo de matriz extra celular. O nível de expressão do GFAP, avaliado por ensaio de western blot, aumentou no grupo CT-SHR comparado ao WKY ($p = 0.001$) e este aumento foi exacerbado no grupo DM-SHR em relação ao grupo WKY ($p = 0.0001$). O tratamento com TEMPOL preveniu o

aumento da expressão de GFAP e apresentou níveis similares ao grupo WKY ($p=0.7$). (Figure 26). Através da técnica de imunohistoquímica, observou-se um aumento da reação glial no grupo DM-SHR comparado aos ratos WKY e SHR. O tratamento restabeleceu esta reação aproximadamente aos níveis do CT-SHR (Figura 26).

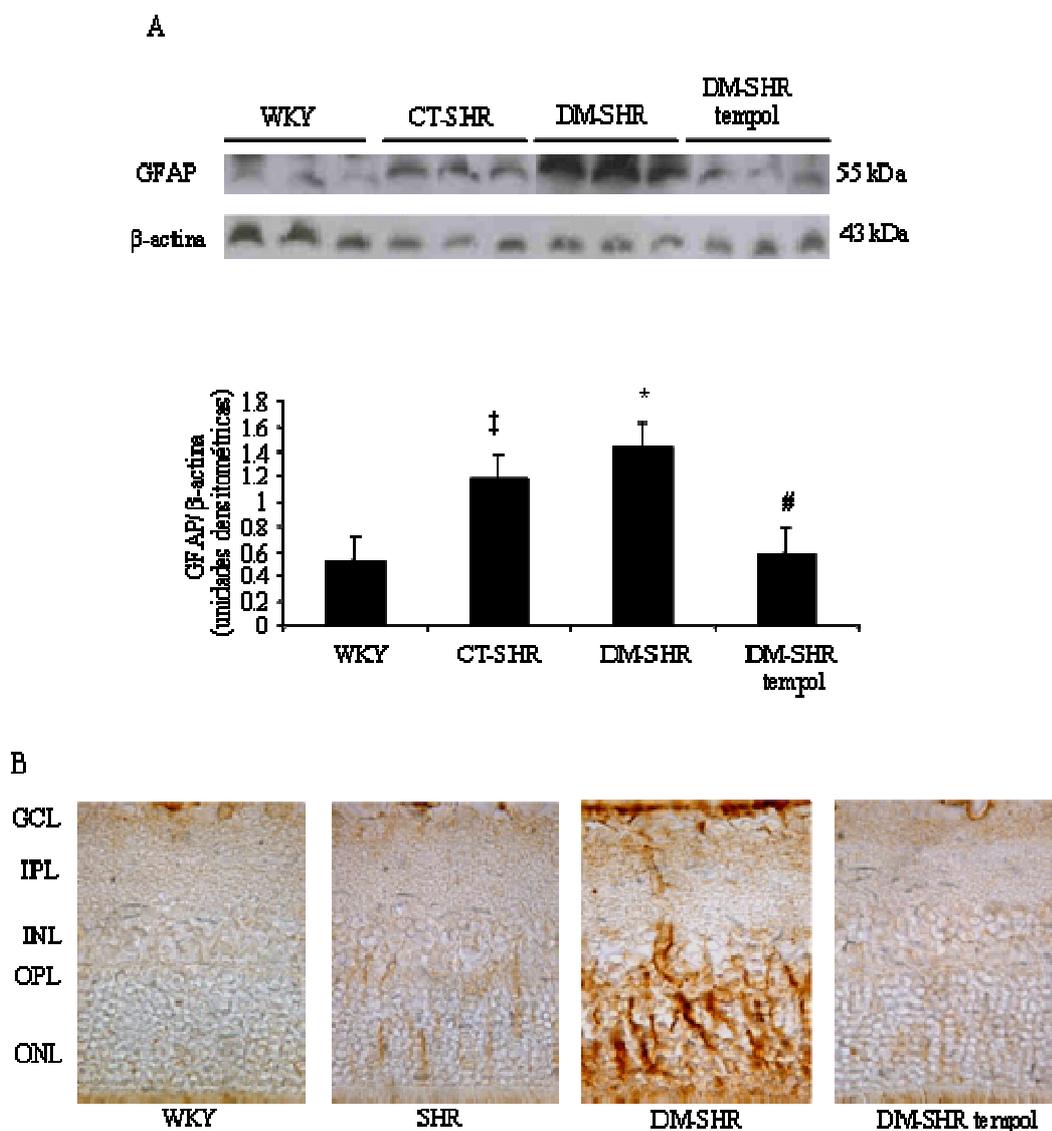


Figura 26. (A) Expressão de GFAP em extrato de retina. Os filmes representam ensaios de Western e as barras representam a média \pm desvio padrão (DP) da densitometria das bandas corrigidas pela β -actina e expressa em unidades arbitrárias. (B) Fotomicrografia representante da imunolocalização do GFAP em cortes de retina. A presença da intensidade da imunoreatividade do GFAP é indicado na cor marrom.

A expressão retiniana de FN aumentou no grupo DM-SHR quando comparado ao grupo WKY ($p=0.004$) e ao grupo CT-SHR ($p=0.02$). O tratamento com TEMPOL preveniu o aumento da expressão de FN encontrado no grupo DM-SHR ($p=0.02$) (figura 27).

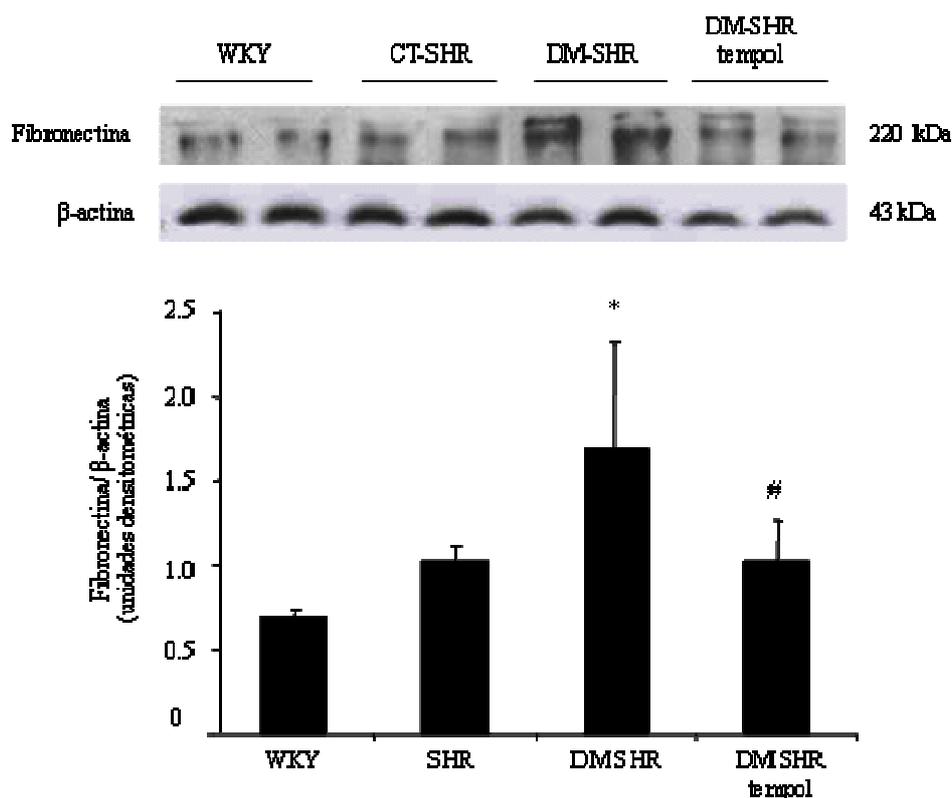


Figura 27. Expressão de FN em extrato de retina. Os filmes representam ensaios de Western e as barras representam a média \pm desvio padrão (DP) da densitometria das bandas corrigidas pela β -actina e expressa em unidades arbitrárias.

4.3. Avaliação dos sistemas oxidativo e antioxidante em tecido de retina

O equilíbrio das reações de redução-oxidação (também conhecido como reação redox) é necessário para a homeostase entre o sistema oxidante e o sistema antioxidante evitando a nitração de proteínas e a lesão oxidativa de lipídeos, proteínas e ácido nucléicos. Para a estimacão do status oxidativo no tecido retiniano, quantificou-se a producao dos ânions superóxido $O_2^{\bullet-}$ e óxido nítrico NO_x^{\bullet} . O status antioxidativo foi avaliado através das concentrações de GSH e expressao e atividade da Cu-Zn SOD.

A producao do ânion $O_2^{\bullet-}$ na retina, avaliada pelo método quimioluminescente da lucigenina, aumentou significativamente no grupo DM-SHR comparado ao grupo WKY ($p=0.05$) e o tratamento com TEMPOL restabeleceu esta producao exarcebada aos níveis normais dos grupos controles comparados ao DM-SHR ($p=0.01$) (figura 28).

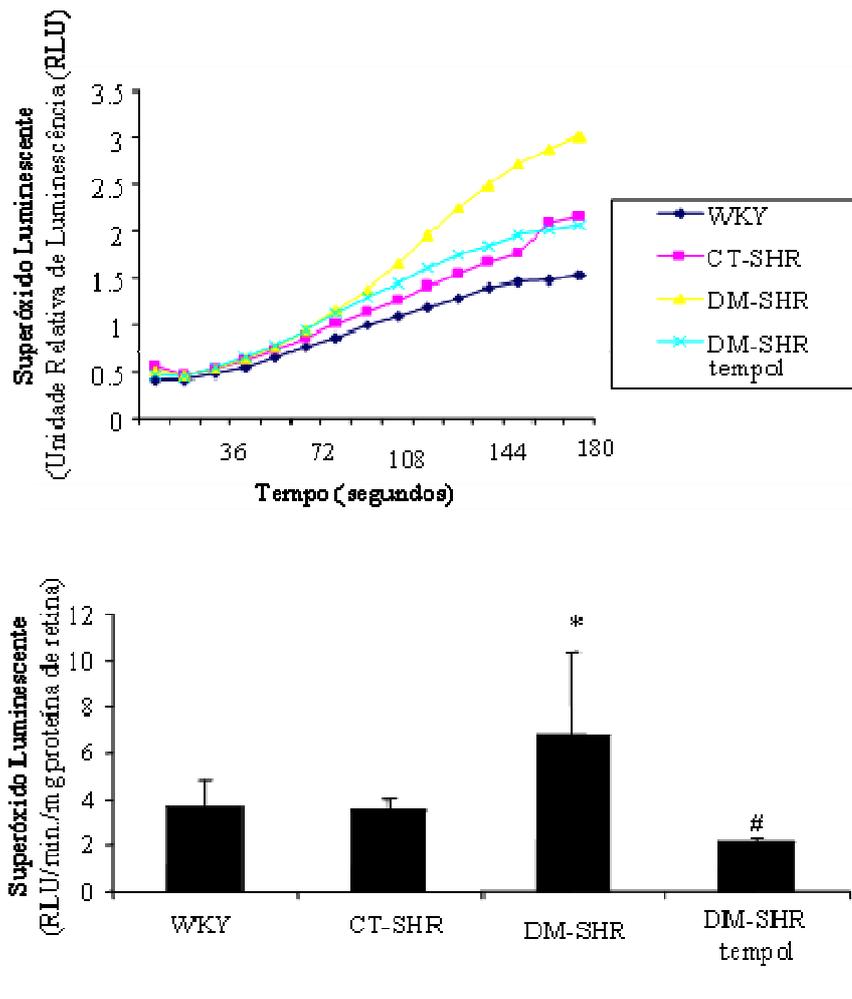


Figura 28. Produção de superóxido total em tecido de retina obtida pelo método da quimioluminescente da lucigenina. O gráfico representa a fotoemissão registrada a cada 12 segundos por 3 minutos. O pico de produção de superóxido foi observado após 3 minutos da adição de lucigenina. As barras representam a média \pm o DP.

Adicionalmente, a produção do ânion NO_x^{\bullet} , mensurado pelo NOA, apresentou-se elevado no grupo DM-SHR em relação aos grupos controles ($p=0.004$ versus WKY e $p=0.003$ versus SHR), no qual o tratamento com TEMPOL ($p=0.01$) preveniu este aumento de produção (Figura 29).

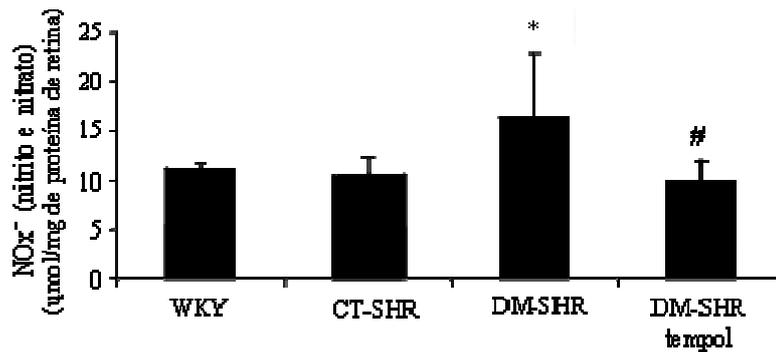


Figura 29. Quantificação de produtos estáveis da oxidação do NO, nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻) presentes no extrato de retina detectados pelo NOA.

A defesa antioxidante foi analisada através da expressão e atividade da Cu-Zn SOD e quantificação dos níveis de GSH em tecido de retina. Duas isoformas da SOD possuem o cofator metálico Cu-Zn em seu centro catalítico e estão localizados nos compartimentos citoplasmáticos intracelulares e extracelulares (Zelko e cols., 2002). A redução da expressão retiniana da Cu-Zn SOD foi observada no grupo DM-SHR comparado aos grupos WKY (p=0.0008) e CT-SHR (p=0.02). Similarmente, a atividade da Cu-Zn SOD diminuiu no grupo DM-SHR comparado ao grupo WKY e CT-SHR (p=0.002 e p=0.001 respectivamente). O tratamento com TEMPOL restaurou a expressão da Cu-Zn SOD no grupo DM-SHR comparado ao grupo DM-SHR não tratado (p=0.04) e a atividade no grupo DM-SHR comparado ao grupo DM-SHR (p=0.01) (Figura 30).

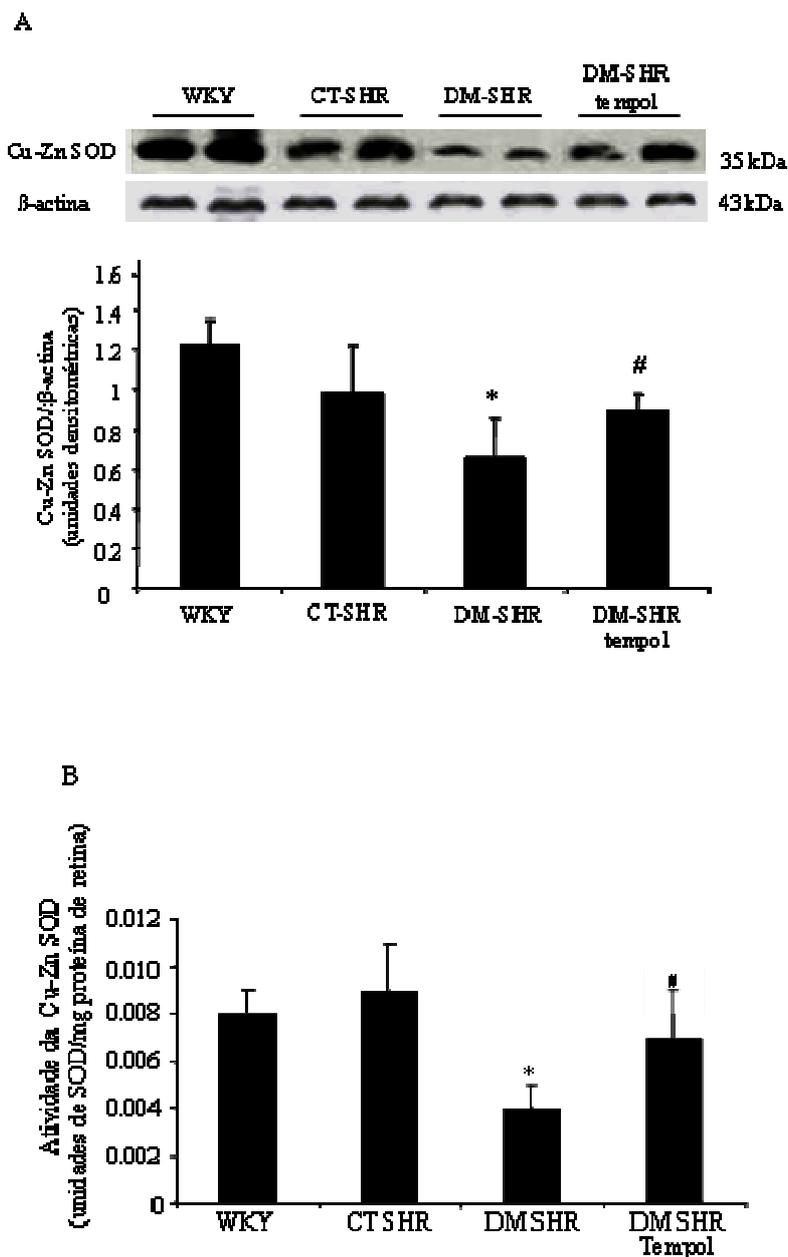


Figura 30. (A) Expressão de Cu-Zn SOD em extrato de retina. Os filmes representam ensaios de Western e as barras representam a média \pm desvio padrão (DP) da densitometria das bandas corrigidas pela β -actina e expressa em unidades arbitrárias. (B) Atividade da Cu-Zn SOD quantificada em extrato proteico de retina estimada pelo kit da Cayman Chemical.

Embora a presença de hipertensão ou do diabetes a curto prazo não tenha afetado os níveis de GSH na retina ($p = 0,4$), o tratamento com TEMPOL aumentou a concentração em cerca de 47% comparado aos outros grupos ($p = 0,01$). Este efeito pode ser explicado pelo metabolismo do peróxido de hidrogênio pela ação “mimética” da catalase conferida ao TEMPOL, a qual diminui a formação de radicais hidroxila, aumentando assim os níveis de GSH disponível no tecido da retina (Figura 31).

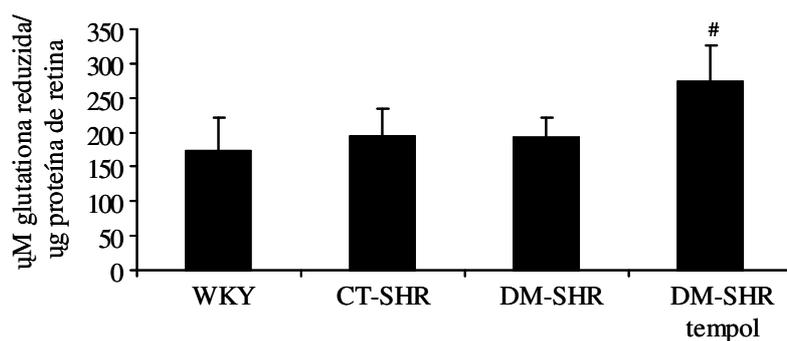


Figura 31. Concentração de glutathione reduzida (GSH) da retina dos ratos estudados.

4.4. Detecção da consequência do desbalanço entre sistema oxidativo e antioxidante no tecido retiniano

Como resultado da reação entre superóxido e óxido nítrico e diminuição da expressão e atividade da Cu-Zn SOD, avaliou-se a produção de peroxinitrito através do ensaio de imunohistoquímica para NT que esteve exacerbada na retina do grupo DM-SHR comparado aos grupos WKY e SHR ($p < 0.0001$ e $p = 0.0001$, respectivamente). Através do mecanismo de mimetizar a SOD, o TEMPOL competiu com o NO pelo O_2^- e o dismutou em peróxido de hidrogênio e oxigênio, resultando em uma diminuição dos níveis NT no grupo DM-SHR, similar ao observado no grupo SHR ($p = 0.6$) (Figure 32).

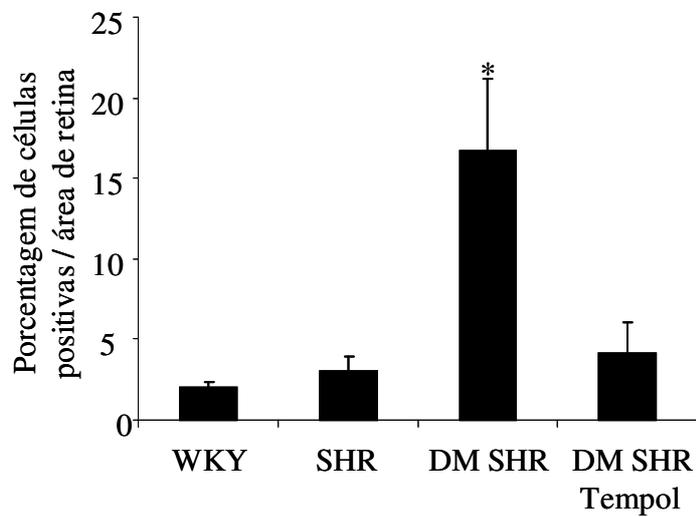
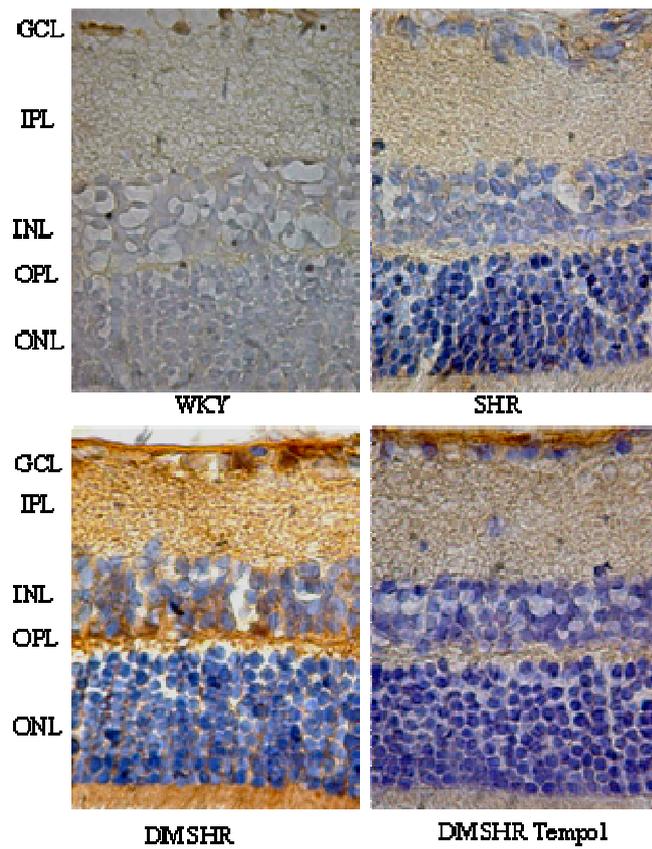


Figura 32. Fotomicrografia representativa da imunoreatividade da nitrotirosina (NT). A presença de NT é indicada na coloração marrom. As barras representam a média \pm DP da porcentagem de positividade/ mm^2 de retina.

4.5. Investigação da possível via envolvida no mecanismo de proteção conferida pelo TEMPOL

O aumento do estresse oxidativo e nitrosativo pode danificar o DNA levando à ativação da PARP. Neste estudo a atividade da PARP foi estimada pela detecção dos polímeros de poli (ADPribose) através do ensaio de Western blot e imunohistoquímica. O western blot revelou que a presença de hipertensão no CT-SHR aumentou o produto, PAR, gerada através da atividade da PARP em comparação aos ratos WKY normotensos ($p = 0,04$). A concomitância do diabetes e hipertensão exacerbou este aumento da atividade significativamente no grupo DM-SHR SHR ($p < 0,001$ e $p = 0,02$, comparado com WKY e SHR-CT, respectivamente). O tratamento com TEMPOL no DM-SHR restabeleceu aos níveis do grupo SHR ($p = 0,3$) (Figura 33). Como detectada por imunohistoquímica, a distribuição de células positivas contendo PAR foi homogênea entre as camadas das células ganglionares, nucleares interna e externa. A presença somente da hipertensão ou em concomitância com o diabetes revelou um aumento significativo de células positivas da retina em relação ao grupo WKY ($p = 0,01$ e $p = 0,006$, respectivamente). O tratamento durante 20 dias com o mimético da SOD, restabeleceu os níveis normais de proteínas ribosiladas ao grupo WKY ($p = 0,7$) (Figura 33).

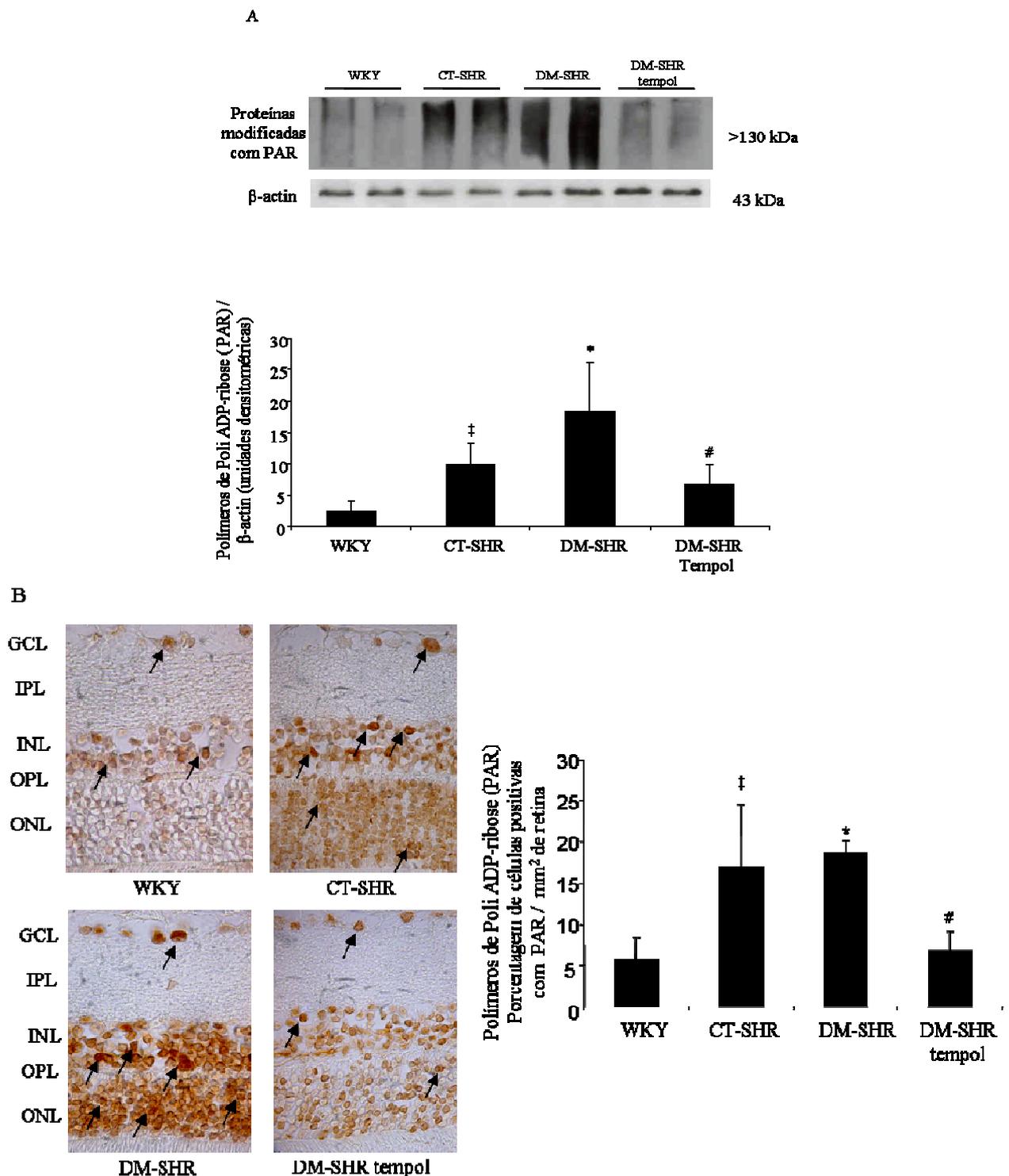


Figura 33. (A) A atividade da PARP estimada pela detecção dos produtos, polímeros de poli (ADP-ribose) (PAR), em extrato de retina. Os filmes representam os ensaios de Western blot e as barras representam a média \pm desvio padrão (DP) da densitometria das bandas corrigidas pela β -actina e expressa em unidades arbitrárias. (B) Fotomicrografia representativa da imunolocalização de PAR em cortes de retina. A presença da imunoreatividade de PAR é observada na coloração marrom mais intensa nos núcleos das células. As barras representam a média \pm DP da porcentagem de positividade de células/mm² de retina.

4.6. A expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS)

Estudos têm demonstrado que a i-NOS pode causar quebras no DNA e ativação subsequente da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), que foi recentemente implicado nas mudanças precoces na retina diabética (Zheng e cols., 2007). Por outro lado, a PARP-1 pode desempenhar o papel fundamental em vários distúrbios agudos e crônicos de inflamação (Mabley e cols., 2001) e funcionar como um co-ativador de fatores de transcrição do NF- κ B e AP-1 resultando na síntese de mediadores pró-inflamatórios (Hassa e cols., 2003) como a i-NOS, que produzirá mais óxido nítrico e, posteriormente, peroxinitritos e radicais hidroxila altamente reativos que, por sua vez, causarão danos no material genético na célula-alvo, ativando novamente a PARP.

A isoforma iNOS foi analisada no tecido retiniano através da técnica de western blot. Observou-se um aumento significativo da expressão da iNOS no grupo DM-SHR comparado ao grupo WKY ($p=0.04$) e o tratamento com TEMPOL restaurou aos níveis normais ($p=0.26$) (Figure 34).

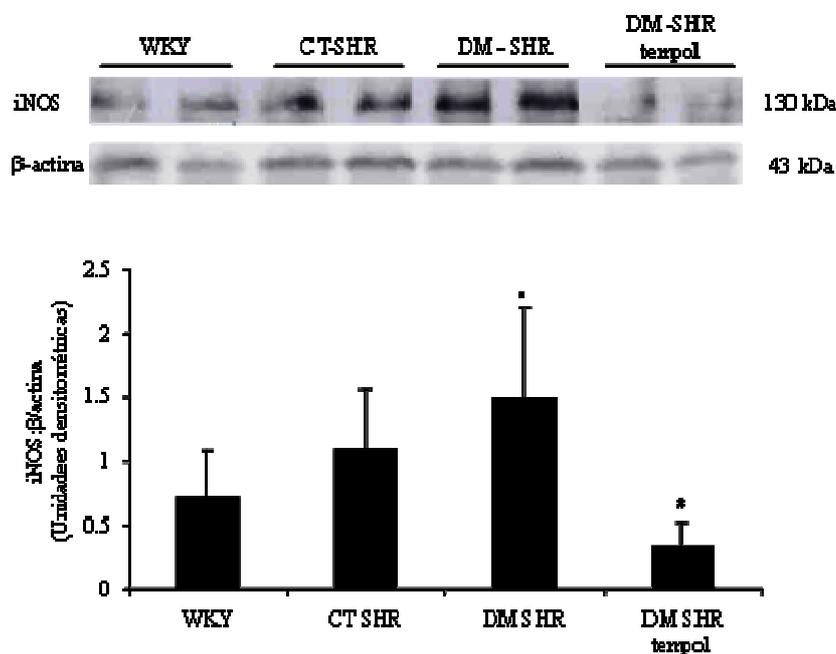


Figura 34. (A) Expressão da i-NOS em extrato de retina. Os filmes representam ensaios de Western e as barras representam a média \pm desvio padrão (DP) da densitometria das bandas corrigidas pela β -actina e expressa em unidades arbitrárias.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a administração sistêmica de TEMPOL restabeleceu os parâmetros oxidativos/nitrosativos, conteve a ativação exacerbada da atividade da PARP e diminuiu a super regulação da expressão da iNOS na retina dos ratos DM-SHR. Como conseqüência, os marcadores precoces da RD, representados pelo acúmulo de FN e aumento da expressão de GFAP, foram prevenidos nos ratos tratados com TEMPOL.

Depois da hiperglicemia, a HA é o fator de risco independente mais importante associado à RD (UKPDS 1998; WESDR, 1998) por este motivo optamos por estudar um modelo que combina diabetes e hipertensão com o objetivo de se obter lesões precoces caracterizadas na RD em um curto tempo de duração do DM. Nós avaliamos os marcadores precoces da RD com o objetivo de demonstrar a presença precoce da RD experimentalmente no modelo animal estudado. Escolhemos o GFAP e a FN como marcadores estruturais de neurodegeneração e lesão vascular, respectivamente.

O GFAP está bem estabelecido como um indicador de estresse retiniano. Estudos têm demonstrado o aumento da reação glial envolvendo as células de Müller na retina de vertebrados em resposta a retinopatia diabética (Mizutani e cols., 1998). O aumento da expressão do GFAP tem sido um evento precoce nas degenerações retinianas (DiLoreto e cols., 1995). Semelhante aos astrócitos do cérebro, as células de müller, sintetizam fatores que induzem a formação de “tight junctions” e, assim, conferem propriedades de barreira para os vasos da retina (Tout e cols., 1993). As células de Müller podem ser um alvo da hiperglicemia diabética e, uma possível causa para a disfunção de células neurais e vasculares na retina. Neste estudo, o aumento da expressão do GFAP aumentou no grupo SHR e foi ainda mais exacerbado no grupo SHR com a presença do diabetes. Um estudo realizado por Sabbatini e colaboradores demonstrou que o rato SHR com 14 semanas apresentou aumento da imunoreatividade do GFAP, fato este que demonstra a influência da hipertensão na RD (Sabbatini e cols., 2002). Embora nosso animal esteja na fase inicial do desenvolvimento da HA (5 à 6 semanas), nossos dados demonstram a lesão neural na retina provocada pela HA. Como esperado, a expressão desta reação neuroglial foi ainda mais acentuada no grupo SHR com a presença do DM.

O espessamento da membrana basal (BM) vascular é a anormalidade estrutural mais característica dos pequenos vasos sanguíneos na RD (Martinez-Hernandez e Amenta, 1983).

Foi previamente demonstrado que a hiperglicemia aumenta a expressão de componentes da BM, FN, colágeno tipo IV, e laminina (Cagliero e cols., 1988) contribuindo para o desenvolvimento do espessamento da BM vascular e do aumento da permeabilidade vascular da retina (Oshitari e cols., 2006). A FN é um dos maiores componentes de matriz extra celular e desempenha um importante papel nas adesões da matriz (Hynes, 1986). Além de ser produzida por células endoteliais, a FN celular também pode ser secretada por uma variedade de células, incluindo fibroblastos, células do músculo liso e também por células do epitélio pigmentar da retina e da glia (Oshato e cols., 1993). A concentração elevada dos níveis de FN circulante no plasma tem sido descrita no DM e é considerada um marcador específico de injúria de célula endotelial (Kanters e cols., 2001). Portanto os níveis de FN intraocular refletem o dano vascular do olho de pacientes diabéticos (Probst e cols., 2004). Como consequência, o acúmulo de FN no tecido da retina é uma característica clássica na patogênese precoce da RD. Nos resultados deste trabalho, o aumento da expressão de GFAP na retina foi detectada mais cedo do que o acúmulo de matriz extracelular (FN) no grupo SHR controle. Este fato sugere que a ativação glial pode preceder as alterações vasculares observadas na retina de ratos hipertensos.

Estudos anteriores demonstraram que na presença do DM, a PARP aumenta os fatores vasoativos, como a endotelina-1 e produção de proteína de ECM, e que a ribosilação da PARP está associada com o aumento do estresse oxidativo na retina (Xu e cols., 2008). Embora tenha sido descrita pela primeira vez há 40 anos atrás (Chambon e cols., 1963), sua importância aumentou quando descobriram a sua mediação na morte neuronal induzida pelo óxido nítrico (Zhang e cols., 1994). A geração de ROS danifica o DNA e desencadeia a hiperatividade da PARP-1 durante a isquemia. Na patogênese da RD, a isquemia causa mudanças estruturais e a quebra da barreira hematoretiniana (Kaur e cols., 2008). A hiperativação da PARP-1 provoca a morte celular devido ao acúmulo celular de polímeros de ADP-ribose da PARP-1 que causa a translocação do fator de indução de apoptose (AIF) a partir da mitocôndria para o núcleo e a ativação de uma via de apoptose independente da caspase (Yu e cols., 2002). Em modelos experimentais de isquemia cerebral, o uso de um inibidor da PARP-1, PJ34, preservou as junções endoteliais e diminuiu a expressão da molécula de adesão ICAM-1, limitando assim a infiltração de leucócitos para cérebro isquêmico (Zhang e cols., 2007).

O estresse oxidativo é o possível promotor de muitas alterações implicadas na patogênese da retinopatia diabética. Com isso, o uso de antioxidantes pode desempenhar uma grande defesa contra as anormalidades metabólicas e funcionais da RD. Os antioxidantes podem inibir a formação de ROS ou “sequestrar” os radicais livres, ou aumentar a capacidade da defesa dos antioxidantes enzimáticos (Kowluru e Chan, 2007). A administração a longo prazo de antioxidantes promovem melhoras na retina de ratos diabéticos, como a Nicanartina que inibiu a perda de pericito (Hammes e cols., 1997) e o ácido lipóico que atenuou a apoptose e diminuiu os níveis de 8-OHdG e (Kowluru e Odenbach, Diabetes 2004). Semelhante ao tempo de tratamento do nosso estudo, 3 semanas, o antioxidante ácido lipóico foi capaz de normalizar o desbalanço do sistema oxidante e antioxidante e melhorar a função da retina de ratos diabéticos (Johnsen e cols., 2008).

O tempol apresenta muitos benefícios comparados aos outros antioxidantes. Em contraste com os outros que geralmente são ativos contra apenas uma espécie de radicais, o tempol pode reagir com diversos radicais resultantes da geração de ROS/RNS. Ele possui um modo catalítico cíclico de ação que “reabastece” a sua capacidade antioxidante, comparado aos outros antioxidantes que acabam por esgotar a capacidade antioxidante. Além disso, por apresentar baixo peso molecular e ser permeável, tem sido utilizado para a remoção de O₂ intracelular e extracelular diferentes dos outros antioxidantes, que não penetram nas membranas celulares efetivamente. Com isso, não é viável a utilização exógena diretamente da SOD, pois a adição pode ser imunogênica, não penetrar facilmente nas células e, com exceção que ela se ligue a uma proteína ou polietileno glicol, apresenta uma meia vida metabólica de apenas alguns minutos (Boccù e cols., 1982). Estudos em animais demonstraram que o TEMPOL é livre de efeitos tóxicos graves. Apesar destes efeitos aparentemente benéficos em uma ampla gama de modelos animais, o TEMPOL ainda está em desenvolvimento para ser utilizado com uma droga humana (Wilcox e Pearlman, 2008). Matsumoto e colaboradores testaram os efeitos tóxicos de cinco nitróxidos e o TEMPOL foi o menos tóxico (Matsumoto e cols., 2004). Estas doses tóxicas ou letais do TEMPOL são aproximadamente 30 vezes superiores à dose terapêutica para redução da pressão arterial. Além disso, o TEMPOL não teve efeitos negativos sobre a mutação genética em hamster chinês (An e Hsie, 1992). A velocidade constante de reação para o TEMPOL com o O₂⁻, tem sido determinada em $3,4 \cdot 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Mitchell e cols., 1990) tornando-se um antioxidante muito mais eficaz do que as vitaminas, uma vez que a taxa constante de interação da SOD com o O₂⁻, é de cerca de $1,6 - 2,4 \cdot 10^9 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$, e da vitamina E com o O₂⁻, aproxima-se

0,59 mol L⁻¹ s⁻¹ (Mitchell e cols., 1990). O TEMPOL possui dois locais de reação com o ânion OH⁻ que pode ser derivado do ROS como o peroxinitrito. Em culturas de células, o TEMPOL age como um mimético da SOD e as protege contra o estresse oxidativo (Samuni e cols., 1991). Além disso, em culturas de células endoteliais coronárias, a exposição a condições de estresse oxidativo leva a um aumento dos produtos finais do NO, ou seja, nitrito e nitrato. A presença do TEMPOL reverteu estes efeitos (Vaziri e Ding, 2001).

Em modelos experimentais (Du e cols., 2002) e na retina de pacientes diabéticos (Abu e cols., 2001), assim como no fluido vítreo de pacientes diabéticos com RD proliferativa (Hernández e cols., 2002) foram relatados um aumento dos níveis dos produtos finais do NO e uma super regulação da iNOS. Semelhante a estes relatos, o presente estudo demonstrou que o tratamento com TEMPOL reduziu os produtos finais do NO e a produção de superóxido no tecido da retina dos ratos DM-SHR.

Estudos demonstram que TEMPOL pode agir através de diversas maneiras contra as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio além de sua atividade de mimético da superóxido dismutase, impedindo a reação de radicais derivados do peroxinitrito (Carrol e cols., 2000), facilitando o metabolismo do peróxido de hidrogênio pela ação semelhante a da catalase (Krishna e cols., 1996b), limitando a formação de radicais hidroxila tóxicos produzidos por reações de Fenton (Glebska e cols., 2001)), melhorando a bioatividade do NO durante a hipertensão (Wilcox 2005) e reduzindo a atividade da PARP (Di Paola e cols., 2005).

Neste nosso estudo, os dados sugerem que além de catalisar a dismutação do O₂⁻, o tratamento com o TEMPOL agiu como um “scavenger” dos radicais livres de O₂⁻, reduziu a geração dos produtos finais do óxido nítrico e aumentou a biossíntese da glutatona, restabelecendo o status oxidativo/nitrosativo da retina diabética. Da mesma forma, observou-se um aumento da expressão e atividade da Cu-Zn SOD na retina dos ratos diabéticos tratados com TEMPOL. Mais estudos serão necessários para compreender como a expressão e atividade da Cu-Zn SOD foi restabelecida pelo TEMPOL no tecido da retina. Estudos em cultura de células e em modelos animais de doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, câncer e inflamação, bem como diabetes, sugerem que a ativação da PARP é prevenida ou revertida por miméticos da superóxido dismutase (Virag e Szabo, 2002; Cuzzocrea e cols., 2004), “seqüestradores” de radicais hidroxila (Virag e Szabo, 2002; Zingarelli e cols., 2000) e catalisadores de decomposição do peroxinitrito (Obrosova e cols., 2005; Alvarez e cols.,

1994). Estudos experimentais oftalmológicos não muito recentes, demonstraram a associação entre o uso do tempol e a diminuição de quebra do DNA, depleção do NAD e ativação da PARP sendo eficaz na proteção contra a catarata (Reddan e cols., 1993) e glaucoma (Padgaonka e cols., J Glaucoma 1994). Em nosso estudo, o tempol diminuiu o produto da reação entre superóxido e óxido nítrico, peroxinitrito, observado pelo ensaio de imunohistoquímica para nitrotirosina. A diminuição de espécies reativas radicalares e não radicalares pelo Tempol previne o dano de proteínas, lipídeos e DNA. Nesta situação, enzimas reparadoras de DNA, como a PARP não será ativada e não haverá sinalização para fatores de transcrição e processo inflamatório. Embora o TEMPOL não seja um inibidor específico da PARP, a “inibição” da via da PARP pode ser um mecanismo envolvido nos efeitos benéficos conferidos pelo TEMPOL.

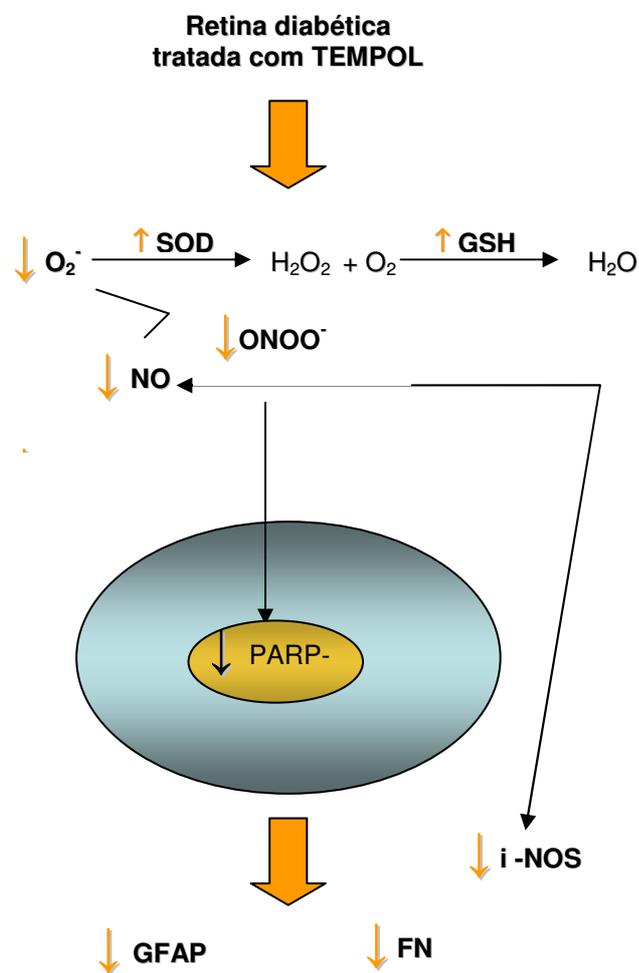


Figura 35. Esquema proposto para demonstrar os mecanismos envolvidos nos benefícios conferidos pelo TEMPOL no grupo DM-SHR nos parâmetros estudados.

Em conclusão, estes dados revelam que o TEMPOL possui um importante potencial terapêutico nas fases iniciais da RD. A administração do nitróxido TEMPOL restabeleceu o status redox e impediu o dano oxidativo/nitrosativo. Este efeito promoveu a redução da ativação exacerbada da PARP e diminuiu os níveis da expressão super regulada da iNOS nos ratos DM-SHR. Como consequência, os marcadores estruturais precoces da RD, GFAP e FN, foram prevenidos pelo TEMPOL. Os possíveis mecanismos de ação de TEMPOL para proteger a retina contra os marcadores precoces da RD sugere ser através da neutralização do desbalanço do sistema oxidante/antioxidante, o que acarretou na diminuição da ativação da via da PARP na retina dos animais hipertensos e diabéticos. Estes resultados fornecem uma base racional para o desenvolvimento com fins farmacológicos do TEMPOL na prevenção e tratamento da RD.

Os achados deste trabalho demonstram que o tratamento com o antioxidante tempol protege a retina das lesões precoces causadas pelo estresse oxidativo. Logo, a compreensão obtida deste estudo, e os mecanismos envolvidos, nos permitem inferir que é racional o estudo e o desenvolvimento do uso tópico do tempol. O segundo passo deste trabalho será o uso do colírio de tempol na retina de ratos diabéticos que desenvolverei como projeto de doutorado.

8-REFERÊNCIAS

- Abu El-Asrar AM, Desmet S, Meersschaert A, Dralands L, Missotten L, Geboes K. Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the retinas of human subjects with diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol.* 2001; 4: 551-556.
- Alder VA, Su EN, Yu DY, Cringle SJ, Yu PK. Diabetic retinopathy: early functional changes. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997; 24: 785-8.
- Alvarez-Gonzalez R, Pacheco-Rodriguez G, Mendoza-Alvarez H: Enzymology of ADP-ribose polymer synthesis. *Mol Cell Biochem.* 1994; 138: 33-37.
- An J, Hsie AW. Effects of an inhibitor and a mimic of superoxide dismutase on bleomycin mutagenesis in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res.* 1992; 270: 167-175.
- Ayres JE. Prevalence of arterial hypertension in Piracicaba city. *Arq Bras Cardiol.* 1991; 57: 33-36.
- 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.
- Barber AJ. Comments on "A new view of diabetic Retinopathy". *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004; 28: 747-748.
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996; 271: C1424-1437.
- Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 1998; 78: 547-581.
- Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A, Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Des.* 2004; 10: 1611-1626.
- Berger F, Ramirez-Hernandez MH, Ziegler M. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem. Sci.* 2004; 29: 111-118.
- Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 1963; 61: 882-888.
- Beyer Y, Imaly J, Fridovich I. Superoxide dismutases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1991; 40: 221-253.
- Biswas SK, Lopes de Faria JB. Does peroxynitrite sustain nuclear factor-kappaB? *Cardiovasc Res.* 2005; 67: 745-746.
- Bloodworth JM Jr. Diabetic retinopathy. *Diabetes* 1962; 11: 1-22.
- Boc c  E, Velo GP, Veronese FM. Pharmacokinetic properties of polyethylene glycol derivatized superoxide dismutase. *Pharmacol Res Commun.* 1982; 14: 113-120.

- Bonini MG, Augusto O. Carbon dioxide stimulates the production of thiyl, sulfinyl, and disulfide radical anion from thiol oxidation by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 9749-9754.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414: 813-820.
- Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54: 1615-1625.
- Budd SL, Tennesi L, Lishnak T, Lipton SA. Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 6161-6166.
- Burlando G, Sánchez RA, Ramos FH, Mogensen CE, Zanchetti A; Latin American Experts Group. Latin American consensus on diabetes mellitus and hypertension. *J Hypertens.* 2004; 22: 2229-2241.
- Cagliero E, Maiello M, Boeri D, Roy S, Lorenzi M. Increased expression of basement membrane components in human endothelial cells cultured in high glucose. *J Clin Invest.* 1988; 82: 735-738.
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000; 87: 840-844.
- Calcutt NA, Cooper ME, Kern TS, Schmidt AM. Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials. *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8: 417-429.
- Carroll RT, Galatsis P, Borosky S, Kopec KK, Kumar V, Althaus JS, et al. 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (tempol) inhibits peroxynitrite-mediated phenol nitration. *Chem Res Toxicol.* 2000; 13: 294-300.
- Chambon P, Weill JD, Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun.* 1963; 11: 39-43.
- Chen P, Guo AM, Edwards PA, et al. Role of NADPH oxidase and ANG II in diabetes-induced retinal leukostasis. *J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293:1619-1629.
- Chen S, Mukherjee S, Chakraborty C, Chakrabarti S. High glucose-induced, endothelin-dependent fibronectin synthesis is mediated via NF-kappa B and AP-1. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003; 284: C263-C272.
- Cho DH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, et al. S-Nitrosylation of Drp1 Mediates β -Amyloid-Related Mitochondrial Fission and Neuronal Injury. *Science* 2009; 324: 102-105.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. 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: 366-378.

Conrad, CH. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation* 1995; 91: 161–170.

Cooke MS, Lunec J, Evans MD. Progress in the analysis of urinary oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 1601-1614.

Cormack DH. Fundamentos de histologia. Guanabara Koogan; 1996. p.90-93.

Cuzzocrea, S, McDonald MC, Mazzon E, Siritwardena D, Constantino G, Fulia F, et al. Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a gerbil model of brain injury. *Brain Res.* 2000; 875, 96-106.

Cuzzocrea S, Genovese T, Mazzon E, Di Paola R, Muia C, Britti D, et al. Reduction in the development of cerulein-induced acute pancreatitis by treatment with M40401, a new selective superoxide dismutase mimetic. *Shock* 2004; 22: 254-261.

Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, et al. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet.* 1996; 347: 444-445.

Daniel NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116: 205-219.

Danser AH, van den Dorpel MA, Deinum J, Derkx FH, Franken AA, Peperkamp E, et al. Renin, prorenin, and immunoreactive renin in vitreous fluid from eyes with and without diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989; 68: 160– 167.

DCCT 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.

Detmers PA, Hernandez M, Mudgett J, Hassing H, Burton C, Mundt S, et al. Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol.* 2000; 165: 3430-3435.

Diabetes Atlas 2009, 4th edition. International Diabetes Federation. Disponível em: <http://www.diabetesatlas.org/content/diabetes>.

Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2009; 32: S62-S67.

DiLoreto DA Jr, Martzen MR, del Cerro C, Coleman PD, del Cerro M. Müller cell changes precede photoreceptor cell degeneration in the age-related retinal degeneration of the Fischer 344 rat. *Brain Res.* 1995; 698: 1–14.

- Di Paola R, Mazzon E, Zito D, Maiere D, Britti D, Genovese T, et al. Effects of Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 1062-1068.
- Drel VR, Xu W, Zhang J, Kador PF, Ali TK, Shin J, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition counteracts cataract formation and early retinal changes in streptozotocin-diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 50: 1778-1790.
- Drew B, Leeuwenburgh C. Aging and the role of reactive nitrogen species. *Ann NY Acad Sci*. 2002; 959: 66-81.
- Du Y, Miller CM, Kern TS. Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 1491-1499.
- Du Y, Smith MA, Miller CM, Kern TS. Diabetes induced nitrate stress in the retina, and correction by aminoguanidine. *Journal of Neurochemistry*. 2002; 80: 771–779.
- Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group (ETDRS). Photocoagulation of diabetic macular edema. *Arch Ophthalmol* 1985; 103: 1796-1809.
- Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2002. *Diabetes Care*. 2003; 26: 917-932.
- Ellis EA, Guberski DL, Somogyi-Mann M, et al. Increased H₂O₂, vascular endothelial growth factor and receptors in the retina of the BBZ/WOR diabetic rat. *Free Radical Biology and Medicine* 2000; 28: 91-101.
- El-Remessy AB, Khalil IE, Matragoon S, Abou-Mohamed G, Tsai NJ, Roon P et al. Neuroprotective effect of (-)Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity: involvement of peroxynitrite. *Am J Pathol* 2003; 163: 1997-2008.
- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*. 2004; 567: 1-61.
- Ferris III FL. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 1993; 16: 322-325.
- Fischer AE, Carpenter TA, Tyler JA, Hall LD. Visualisation of mass transport of small organic molecules and metal ions through articular cartilage by magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging* 1995; 13: 819–826.
- Follow-up Report on the Diagnosis of Diabetes Mellitus. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 3160–3167.
- Fong DS, Aiello LP, Ferris FL, Klein R. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2004; 27: 2540-2553.
- Ford ES, Mokdad AH, Giles WH, et al. The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes* 2003; 52: 2346-2352.

Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med.* 2003; 9: 160-168.

Freitas OC, Carvalho FR, Neves JM, et al. Prevalence of hypertension in the urban population of Catanduva, in the State of Sao Paulo, Brazil. *Arq Bras Cardiol* 2001; 77: 9-21.

Fuchs FD, Moreira LB, Moraes RS, Bredemeier M, Cardozo SC. Prevalence of systemic arterial hypertension and associated risk factors in the Porto Alegre metropolitan area. Populational-based study. *Arq Bras Cardiol.* 1994; 63: 473-479.

Funatsu H, Yamashita H, Nakanishi Y, Hori S. Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol.* 2002; 86: 311– 315.

Garcia Soriano F, Virag L, Jagtap P, Szabó E, Mabley JG, Liaudet L, et al. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly (ADP-ribose) polymerase activation. *Nat Med.* 2001; 7: 108 –113.

Geraldes P, Hiraoka-Yamamoto J, Matsumoto M, Clermont A, Leitges M, Marette A, et al. Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nat Med.* 2009; 15: 1298-1306.

Ghirlanda G, Di Leo MA, Caputo S, Falsini B, Porciatti V, Marietti G, et al. Detection of inner retina dysfunction by steady-state focal electroretinogram pattern and flicker in early IDDM. *Diabetes* 1991; 40: 1122-1127.

Goodman RH, Smolik S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 2000; 14: 1553–1577.

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? *Br 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.

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

Hammes HP, Bartmann A, Engel L, Wülfroth P. Antioxidant treatment of experimental diabetic retinopathy in rats with nicanartine. *Diabetologia.* 1997; 40: 629-634.

Hangai M, Yoshimura N, Hiroi K, Mandai M, Honda Y. Inducible nitric oxide synthase in retinal ischemia-reperfusion injury. *Exp Eye Res.* 1996; 63: 501-509.

Hassa PO, Buerki C, Lombardi C, Imhof R, Hottiger MO. Transcriptional coactivation of nuclear factor- κ B-dependent gene expression by p300 is regulated by poly (ADP)-ribose polymerase-1. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 45145–45153.

Heart Disease and Stroke Statistics — 2009 Update, American Heart Association. Disponível em <http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=3037327>.

- Heegand S. Morphology of the vitreoretinal bander region. *Acta Ophtalmol Scand* 1997; 222: 1-31.
- Herrling T, Fuchs J, and Groth N. Kinetic measurements using EPR imaging with a modulated field gradient. *J Magn Reson* 2002; 154: 6–14.
- Hernández C, Lecube A, Segura RM, Sararols L, Simó R. Nitric oxide and vascular endothelial growth factor concentrations are increased but not related in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabet Med.* 2002; 19: 655-660.
- Herr, R. R. et AL. Isolation and characterization of streptozotocin. *Antibiot Annu.* 236, 1960.
- Hess, DT, Matsumoto A, Nudelman R, Stamler, JS. Nat. S-nitrosylation: spectrum and specificity. *Cell Biol.* 2001; 3: E46–49.
- Hirschi KK, D'Amore PA. Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. *EXS* 1997; 79: 419-428.
- Hynes RO. Fibronectins. *Sci Am* 1986; 254: 42–51.
- Imesch PD, Bindley CD, Wallow IHL. Clinicopathologic correlation of intraretinal microvascular abnormalities. *Retina* 1997; 17: 321-329.
- International Diabetes Federation, 2009. Disponível em: <http://www.idf.org/latest-diabetes-figures-paint-grim-global-picture>.
- Ishibashi T, Inomata H. Ultrastructure of retinal vessels in diabetic patients. *Br J Ophthalmol.* 1993; 77: 574-578.
- Jagtap P, Szabo C. Poly (ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4: 421–440.
- Jain SK. Superoxide dismutase overexpression and cellular oxidative damage in diabetes. A commentary on "Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress". *Free Radic Biol Med.* 2006; 41: 1187-1190.
- Johnsen-Soriano S, Garcia-Pous M, Arnal E, Sancho-Tello M, Garcia-Delpech S, Miranda M, et al. Early lipoic acid intake protects retina of diabetic mice. *Free RadicRes.* 2008; 42: 613-617.
- Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8: 1865-1879.
- Joussen AM, Murata T, Tsujikawa A, Kirchhof B, Bursell SE, Adamis AP. Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina. *Am J Pathol.* 2001; 158: 147-152.
- Kaur H, Chen S, Xin X, Chiu J, Khan ZA, Chakrabarti S. Diabetes-induced extracellular matrix protein expression is mediated by transcription coactivator p300. *Diabetes* 2006; 55: 3104–3111.

- Kaur C, Foulds WS, Ling EA. Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: basic concepts, clinical features and management. *Prog Retin Eye Res.* 2008; 27: 622-647.
- Kanters SDJM, Banga JD, Algra A, et al. Plasma levels of cellular fibronectin in diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24: 323–327.
- Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet.* 2005; 365: 217-223.
- Kempner JH, O'Colmain BJ, Leske MC et al. The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Arch.Ophthalmol.* 2004; 122: 552-563.
- Khan ZA, Farhangkhoe H, Mahon JL, Bere L, Gonder JR, Chan BM, Uniyal S, Chakrabarti S. Endothelins: regulators of extracellular matrix protein production in diabetes. *Exp Biol Med* 2006; 231: 1022–1029.
- King GL, Brownlee M. The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996; 25: 255–270.
- Klaassen I, Hughes JM, Vogels IMC, Schalkwijk CG, Van Noorden CJF, Schlingemann RO. Altered expression of genes related to blood–retina barrier disruption in streptozotocin-induced diabetes. *Experimental Eye Research* 2009; 89: 4–15.
- Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol.* 1984; 102: 527-32.
- Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy: XVII. The 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes. *Ophthalmology.*1998; 105: 1801-1815.
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 1997; 416: 15-18.
- Kowluru RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res.* 2007; 2007: 43603.
- Kowluru RA, Kern TS, Engerman RL. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia. IV. Antioxidant defense system. *Free Radic Biol Med.* 1997; 22: 587-592.
- 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. Diabetes-induced elevations in retinal oxidative stress, protein kinase C and nitric oxide are interrelated. *Acta Diabetol.* 2001; 38: 179-185.

Krishna MC, DeGraff W, Hankovsky O, Sa´ r CP, Ka´ lai T, Jeko J, Russo A, and Mitchell JB (1998) Studies of structure-activity relationship of nitroxide free radicals and their precursors as modifiers against oxidative damage. *J Med Chem* 1998; 41: 3477–3492.

Krishna MC, Grahame DA, Samuni A, Mitchell JB, and Russo A. Oxoammonium cation intermediate in the nitroxide-catalyzed dismutation of superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5537–5541.

Krishna MC, Russo A, Mitchell JB, Goldstein S, Dafni H, and Samuni A. Do nitroxide antioxidants act as scavengers of O₂· or as SOD mimics? *J Biol Chem* 1996a 271: 26026–26031.

Kurihara T, Ozawa Y, Nagai N, Shinoda K, Noda K, Imamura Y, Tsubota K, Okano H, Oike Y, Ishida S. Angiotensin II type 1 receptor signaling contributes to synaptophysin degradation and neuronal dysfunction in the diabetic retina. *Diabetes* 2008; 57: 2191– 2198.

Lessa I. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica e da insuficiência cardíaca no Brasil. *Rev Bras Hipertens*, 2001; 8: 383–392.

Li CJ, Higashiyama K, Yoshimura Y, Nagai T, Takayama K, and Obata Y. Promoting mechanism of menthol derivative, 1-O-ethyl-3-buthylcyclohexanol, on the percutaneous absorption of ketoprofen. *Biol Pharm Bull* 2001; 24: 1044–1048.

Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med.* 1999; 5: 1403-1409.

Liu L, Yan Y, Zeng M., Zhang J, Hanes MA, Ahearn G, McMahon TJ, Dickfeld T, Marshall HE, Que LG, Stamler JS. Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell* 2004; 116: 617–628.

Liu S, Ma X, Gong M, Shi L, Lincoln T, and Wang S. Glucose down-regulation of cGMP-dependent protein kinase I expression in vascular smooth muscle cells involves NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2007b; 42: 852–863.

Livesey FJ, Cepko CL. Vertebrate neural cell-fate determination: Lessons from the retina. *Nature Reviews Neuroscience* 2001; 2: 109-118.

Lolio CA. Prevalence of arterial hypertension in Araraquara, Brazil. *Arq Brás Cardiol.* 1990; 55: 167-173.

Lopes de Faria JM, Jalkh AE, Trempe CL, McMeel J. Diabetic macular edema: risk factors and concomitants. *Acta Ophthalmol Scand.* 1999; 77: 170-175.

Lopes de Faria JM, Katsumi O, Cagliero E, Nathan D, Hirose T. Neurovisual abnormalities preceding the retinopathy in patients with long-term type 1 diabetes mellitus. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2001; 239: 643-648.

Lopes de Faria JM, Lopes de Faria JB. Parte 7 Hipotálamo e Hipófise. Capítulo livro 44.1 Retinopatia. Endocrinologia, 2007.

Lopes de Faria JM, Russ H, Costa VP. Retinal nerve fibre layer loss in patients with type 1 diabetes mellitus without retinopathy. *Br J Ophthalmol*. 2002; 86: 725-728.

Mabley, J. G. et al. Anti-inflammatory effects of a novel, potent inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase. *Inflamm. Res*. 2001; 50: 561–569.

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. *Diabetes Care* 1992; 15: 1509-1515.

Mannick JB, Schonhoff, CM. Arch. Nitrosylation: the next phosphorylation? *Biochem. Biophys*. 2002; 408: 1–6.

Mano, Reinaldo. Hipertensão Arterial Sistêmica. Manuais de Cardiologia. RJ, abr. 2009. Disponível em: <<http://www.manuaisdecardiologia.med.br/has/has.htm>>. Acesso em: (01/02/2010)

Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The basement membrane in pathology. *Lab Invest*. 1983; 48: 656-677.

Martins IS, Marucci M de F, Velasquez-Melendez G, Coelho LT, Cervato AM. Atherosclerotic cardiovascular disease, lipemic disorders, hypertension, obesity and diabetes mellitus in the population of a metropolitan area of southeastern Brazil. III – Hypertension. *Rev Saude Publica* 1997; 31: 466-471.

Matsumoto K, Krishna MC, Mitchell JB. Novel pharmacokinetic measurement using electron paramagnetic resonance spectroscopy and simulation of in vivo decay of various nitroxyl spin probes in mouse blood. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 310: 1076–1083.

Mazze RS, Sinnock P, Deeb L, Brimberry JL. An epidemiological model for diabetes mellitus in the United States: five major complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 1985; 1: 185-91.

McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 40–47.

Mitchell JB, Samuni A, Krishna MC, et al. Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics. *Biochemistry*. 1990; 29: 2802-2807.

Mitchell P, Foran S. Guidelines for the Management of Diabetic Retinopathy. The National Health and Medical Research Council (NHMRC). Australian Diabetes Society for the Department of Health and Ageing. 2008.

Mizutani M, Gerhardinger C, Lorenzi M. Müller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes* 1998; 47: 445-9.

Moncada S, Higgs A The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993; 329: 2002-12.

Nagai N, Izumi-Nagai K, Oike Y, Koto T, Satofuka S, Ozawa Y, Yamashiro K, Inoue M, Tsubota K, Umezawa K, Ishida S. Upregulation of diabetes-induced retinal inflammation by blocking the angiotensin II type 1 receptor or its downstream nuclear factor-kappaB pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 4342–4350.

Neufeld AH, Kawai S, Das S, Vora S, Gachie E, Connor JR, Manning PT. Loss of retinal ganglion cells following retinal ischemia: the role of inducible nitric oxide synthase. *Exp Eye Res.* 2002; 75: 521-528.

Nicholson DW, Thornberry NA. Apoptosis. Life and death decisions. *Science.* 2003; 299: 214-215.

Obrosova IG, Minchenko AG, Frank RN, Seigel GM, Zsengeller Z, Pacher P, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors counteract diabetes- and hypoxia-induced retinal vascular endothelial growth factor overexpression. *Int J Mol Med.* 2004; 14: 55–64.

Obrosova IG, Drel VR, Kumagai AK, Szabo C, Pacher P, Stevens MJ. Obrosova IG, Drel VR, Pacher P, et al. Oxidative-nitrosative stress and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in experimental diabetic neuropathy: the relation is revisited. *Diabetes* 2005; 54: 3435–3441.

Obrosova IG, Mabley JG, Zsengeller Z, Charniauskaia T, Abatan OI, Groves JT, et al. Role for nitrosative stress in diabetic neuropathy: evidence from studies with a peroxynitrite decomposition catalyst. *FASEB J* 2005; 19: 401–403.

Obrosova IG, Drel VR, Kumagai AK, Szabo C, Pacher P, Stevens MJ. Early diabetes-induced biochemical changes in the retina: comparison of rat and mouse models. *Diabetologia.* 2006; 49: 2525–2533.

Obrosova IG, Xu W, Lyzogubov VV, et al. PARP inhibition or gene deficiency counteracts intraepidermal nerve fiber loss and neuropathic pain in advanced diabetic neuropathy. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44: 972–981.

Offer, T., Russo, A., and Samuni, A. The pro-oxidative activity of SOD and nitroxide SOD mimics *FASEB J.* 2000; 14, 1215- 1223.

Ohara, A. *Radicals Livres Bons, Males e Naturais.* Oficina De Textos, 2006.

Okamoto AK. "Development of a strain of spontaneously hypertensive rat". *Jap Circ J* 1963; 27: 282–293.

Ohsato M, Shiga S, Kato H, Hayashi H, Oshima K. Immunohistochemical study of cellular fibronectin in preretinal membranes. *Retina* 1994; 14: 430–434.

Oshitari T, Polewski P, Chadda M, Li AF, Sato T, Roy S. Effect of combined antisense oligonucleotides against high-glucose- and diabetes- induced overexpression of extracellular matrix components and increased vascular permeability. *Diabetes.* 2006; 55: 86–92.

Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Mabley JG, Szabo E, Szabo C. The role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the development of myocardial and endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes.* 2002; 51: 514–521.

- Paques M, Massin P, Gaudric A. Growth factors and diabetic retinopathy. *Diabetes Metab.* 1997; 23: 152-30.
- Patel RP, Levonen A, Crawford JH, Darley-Usmar VM. Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2000; 47: 465-474.
- Perreault M, Marette A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med.* 2001; 7:1138-1143.
- Pinto CC, Silva KC, Biswas SK, Martins N, De Faria JB, De Faria JM. Arterial hypertension exacerbates oxidative stress in early diabetic retinopathy. *Free Radic Res* 2007; 41: 1151-1158.
- Pinto YM, Paul M, Ganten D. "Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering". *Cardiovasc Res.* 1998; 39: 77–88.
- Pleschke JM., Kleczkowska HE, Strohm M, Althaus FR. Poly (ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 40974–40980.
- Probst K, Fijnheer R, Schellekens P, Rothova A. Intraocular and plasma levels of cellular fibronectin in patients with uveitis and diabetes mellitus *Br J Ophthalmol.* 2004; 88: 667–672.
- Provis JM. Development of the Primate Retinal Vasculature. *Progress in Retinal and Eye Research* 2001; 20: 799-821.
- Puvanendran K, Devathasan G, Wong PK. Visual evoked responses in diabetes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1983; 46: 643-647.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Óxido Nitrico. In: *Farmacologia.* 4º edição. Guanabara Koogan, 2001, 176-163.
- Rego RA, Berardo FA, Rodrigues SS, Oliveira ZM, Oliverira MB, Vasconcellos C, et al. Risk factors for chronic noncommunicable diseases: a domiciliary survey in the municipality of Sao Paulo, SP (Brazil). Methodology and preliminary results. *Rev Saúde Pública* 1990; 24: 277-285.
- Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol. Rev.* 1970; 22: 485-518.
- Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull. World Health Organ.* 2004; 82: 844-851.
- Rodeberg DA, Chaet MS, Bass RC, Arkovitz MS, Garcia VF. Nitric oxide: an overview. *Am J Surg.* 1995; 170: 292-303.
- Rongvaux, A., Andris, F., Van Gool, F. & Leo, O. Reconstructing eukaryotic NAD metabolism. *Bioessays* 2003; 25: 683–690.

- Roy MS. Diabetic retinopathy in African Americans with type 1 diabetes: the New Jersey 725. II. Risk factors. *Arch Ophthalmol*, 2000; 118: 105-115.
- Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anion and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250: H822–H827.
- Sabbatini M, Tomassoni D, Di Tullio MA, Amenta F. Neuroprotective effect of treatment with calcium antagonists on hypertensive retina. *Clin Exp Hypertens*. 2002; 24: 727-740.
- Saint-Geniez M, D'Amore PA. Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *The International Journal of Developmental Biology* 2004; 48: 1045-1058.
- Samuni A, Winkelsberg D, Pinson A, Hahn SM, Mitchell JB, Russo A. Nitroxide stable radicals protect beating cardiomyocytes against oxidative damage. *J Clin Invest*. 1991; 87: 1526–1530.
- Sasaki H, Lin LR, Yokoyama T, Sevilla MD, Reddy VN, Giblin FJ. TEMPOL protects against lens DNA strand breaks and cataract in the x-rayed rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998; 39: 544-552.
- 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.
- Schrammel A, Gorren AC, Schmidt K, Pfeiffer S, Mayer B. S-nitrosation of glutathione by nitric oxide, peroxynitrite, and NO/O_2 . *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 1078–1088.
- Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly (ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7: 517-528
- Schroder S, Brad M, Schmid-Schonbein GW, Reim M, Schmid-Schonbein H. Microvascular network topology of the human retinal vessels. *Fortschr. Ophthalmol*. 1990; 87: 52-58.
- Sharma S, Oliver-Fernandez A, Liu W, Buchholz P, Walt J. The impact of diabetic retinopathy on health-related quality of life. *Curr Opin Ophthalmol*. 2005; 16: 155-159.
- Silva KC, Rosales MA, Biswas SK, Lopes de Faria JB, Lopes de Faria JM. Diabetic retinal neurodegeneration is associated with mitochondrial oxidative stress and is improved by an angiotensin receptor blocker in a model combining hypertension and diabetes. *Diabetes* 2009; 58: 1382-1390.
- Sivitz WI, Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12: 537-577.
- Stamler JS, Lamas S, Fang, FC. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 2001; 106: 675–683.

- Sugawara R, Hikichi T, Kitaya N, Mori F, Nagaoka T, Yoshida A, Szabo C. Peroxynitrite decomposition catalyst, FP15, and poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, PJ34, inhibit leukocyte entrapment in the retinal microcirculation of diabetic rats. *Curr Eye Res.* 2004; 29: 11–16.
- Sullivan PG, Geiger JD, Mattson MP, Scheff SW. Dietary supplement creatine protects against traumatic brain injury. *Ann Neurol.* 2000; 48: 723-729.
- Szabo C, Biser A, Benko R, Bottinger E, Susztak K. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors ameliorate nephropathy of type 2 diabetic *Leprdb/db* mice. *Diabetes* 2006; 55: 3004–3012.
- Tamada Y, Fukiage C, Nakamura Y, Azuma M, Kim YH, Shearer TR. Evidence for apoptosis in the selenite rat model of cataract. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 275: 300 –306.
- Tanito M, Li F, Elliott MH, Dittmar M, Anderson RE. Protective effect of TEMPOL derivatives against light-induced retinal damage in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48: 1900-1905.
- Tentori L, Lacal PM, Muzi A, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibition or PARP-1 gene deletion reduces angiogenesis. *Eur J Cancer.* 2007; 43: 2124–2133.
- Tezel G, Yang X. Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45: 4049-4059.
- Thaler S, Fiedorowicz M, Rejdak R, Choragiewicz TJ, Sulejczak D, Stopa P, et al. Neuroprotective effects of tempol on retinal ganglion cells in a partial optic nerve crush rat model with and without iron load. *Exp Eye Res.* 2009; 90: 254-260.
- The Economic Impact of Vision Problems 2007. Prevent Blindness America. Disponível em: http://www.preventblindness.org/research/Impact_of_Vision_Problems.pdf.
- The History of Diabetes. Canadian Diabetes Association 2005 – 2009. Disponível em: <http://www.diabetes.ca/about-diabetes/what/history/>
- Tout S, Chan-Ling T, Holländer H, Stone J. The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience* 1993; 55: 291–301.
- 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.
- Van der Poel C, Edwards JN, Macdonald WA, and Stephenson DG. Mitochondrial superoxide production in skeletal muscle fibers of the rat and decreased fiber excitability. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 292: C1353–C1360.
- Vasan RS, Beiser A, Seshadri S, Larson MG, Kannel WB, D'Agostino RB, Levy D. Residual lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: The Framingham Heart Study. *JAMA.* 2002; 287: 1003-1010.
- Vaziri ND, Ding Y. Effect of lead on nitric oxide synthase expression in coronary endothelial cells: role of superoxide. *Hypertension.* 2001; 37: 223–226.

Walters CL, Gillatt PN, Palmer RC, et al. A rapid method for the determination of nitrate and nitrite by chemiluminescence. *Food Add Contam* 1987; 4:133-140.

Wang X, Tang X, Gong X, Albanis E, Friedman SL, Mao Z. Regulation of hepatic stellate cell activation and growth by transcription factor myocyte enhancer factor 2. *Gastroenterology* 2004; 127: 1174–1188.

Wang Z, Gleichmann H. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 1998; 47: 50-56.

Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289: R913–R935.

Wilcox CS, Pearlman A. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacol Rev.* 2008; 60: 418-469.

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

Wilkinson-Berka JL. Angiotensin and diabetic retinopathy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38: 752-765.

Wolter, J.R. Diabetic retinopathy. *Am. J. Ophthalmol.* 1961; 51: 1123–1139.

Wong GKT, Marsden PA. Nitric oxide synthases: regulation in disease. *Nefrol Dial Transplant* 1996; 11: 215-220.

World Health Organization. The World Health Report 2002. Risks to Health 2002. Geneva: Health Organization.

Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta.* 2004; 339: 1-9.

Xu B, Chiu J, Feng B, Chen S, Chakrabarti S. PARP activation and the alteration of vasoactive factors and extracellular matrix protein in retina and kidney in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008; 24: 404-412.

Yamada KM. Cell surface interactions with extracellular materials. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 761–799.

Yu, SW. et al. Mediation of poly (ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis inducing factor. *Science* 2002; 297: 259-263.

Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature.* 2000; 407: 802-809.

Zamir E, Zhang R, Samuni A, Kogan M, and Pe'er J. Nitroxide stable radical suppresses autoimmune uveitis in rats. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 7–15.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 337-349.

Zhang J, Dawson VL, Dawson T, Snyder SH. Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science.* 1994; 263: 687–689.

Zhang Y, Park TS, Gidday JM. Hypoxic preconditioning protects human brain endothelium from ischemic apoptosis by Akt-dependent survivin activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292: H2573–H2581.

Zheng L, Du Y, Miller C, Gubitosi-Klug RA, Ball S, Berkowitz BA, et al. Critical role of inducible nitric oxide synthase in degeneration of retinal capillaries in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2007; 50: 1987-1996.

Zheng L, Gong B, Hatala DA, Kern TS. Retinal ischemia and reperfusion causes capillary degeneration: similarities to diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48: 361-367.

Zheng L, Szabo C, Kern TS. Poly(ADP-ribose) polymerase is involved in the development of diabetic retinopathy via regulation of nuclear factor- κ B. *Diabetes* 2004; 53: 2960–2967.

Zhou J, Jang YP, Chang S, Sparrow JR. OT-674 suppresses photooxidative processes initiated by an RPE lipofuscin fluorophore. *Photochem Photobiol.* 2008; 84: 75-80.

Zingarelli B, Scott GS, Hake P, Salzman AL, Szabo C: Effects of nitaraven on nitric oxide-related pathways and in shock and inflammation. *Shock* 2000; 13: 126 –134.

A decrease in retinal progenitor cells is associated with early features of diabetic retinopathy in a model that combines diabetes and hypertension

Jacqueline Mendonça Lopes de Faria, Kamila Cristina Silva, Patrícia Aline Boer, Tiago Correa Cavalcanti, Mariana Aparecida Brunini Rosales, Ana Luiza Ferrari, José Butori Lopes de Faria

Renal Pathophysiology Laboratory, Investigation in Diabetes Complications, Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

Purpose: Hyperglycemia and hypertension contribute to the development of diabetic retinopathy, and this may involve alterations in the normal retinal cell cycle. In this work, we examined the influence of diabetes and hypertension on retinal cell replication *in vivo* and the relationship between these changes and several early markers of diabetic retinopathy.

Methods: Diabetes was induced with streptozotocin in 4- and 12-week-old spontaneously hypertensive rats (SHR) and their Wistar Kyoto (WKY) controls. The rats were killed 15 days later. Retinal cells stained with bromodeoxyuridine (BrdU) were seen in rats of both ages.

Results: In 12-week-old rats, the number of BrdU-positive retinal cells was higher in SHR than in WKY rats. After 15 days of diabetes mellitus, there was a marked reduction in cell replication only in diabetic SHR ($p=0.007$). The BrdU-positive cells expressed neural, glial, or vascular progenitor markers. There was greater expression of p27^{Kip1} in the ganglion cell layer of both diabetic groups ($p=0.05$), whereas in the inner nuclear layer there was enhanced expression only in diabetic SHR ($p=0.02$). There was a marked increase in the retinal expression of fibronectin ($p=0.04$) and vascular endothelial growth factor ($p=0.02$) in diabetic SHR that was accompanied by blood-retinal barrier breakdown ($p=0.01$).

Discussion: Concomitant diabetes and hypertension attenuated the proliferation of retinal cells, and it is associated with an increase in p27^{Kip1} expression, fibronectin accumulation, and blood-retinal barrier breakdown. The replicative retinal cells displayed characteristics of progenitor cells.

Diabetic retinopathy is a progressive neurologic disease that is characterized by neuronal degeneration and extensive vascular changes. However, our knowledge of the mechanisms leading to neuronal cell loss and vascular dysfunction in diabetic retinopathy is still incomplete. We do know cells other than endothelial cells and pericytes are affected by hyperglycemia in diabetes [1,2]. Clinical studies [3-8] have shown that hyperglycemia causes neural dysfunction in the retina before the onset of diabetic microvasculopathy.

The development of retinal disease varies among patients with diabetes. Although hypertension may be an important contributor, the precise mechanism by which hypertension can exacerbate diabetic retinopathy remains to be established. Diabetic individuals frequently have concomitant retinopathy and nephropathy, and it has been suggested that similar mechanisms may be involved in these two long-term complications of diabetes [9]. Inhibitors of cyclin-dependent kinases (Cdk) such as p27^{Kip1}, a negative cell cycle regulator,

are involved in the development of diabetic nephropathy, with associated mesangial hypertrophy and extracellular matrix accumulation [10-13]. In addition, genetic hypertension potentiates the cell-cycle abnormalities induced by renal hyperglycemia [14]. These findings suggest that cell cycle regulators are altered by the diabetic milieu and that such alterations contribute to the pathogenesis of diabetic microvascular complications.

The early phase of diabetic retinopathy involves microangiopathy characterized by a diffuse increase in vascular permeability and capillary basement membrane thickening [15-18]. Fibronectin, a component of the basement membrane, is overexpressed in the retina of diabetic adults [15]. Experimental studies have indicated that this accumulation of fibronectin in retinal tissue is simply an epiphenomenon of the diabetic state, but may be operative in sight-threatening diabetic retinopathy. Indeed, the downregulation of fibronectin production in galactose-fed rats partly prevented retinal basement membrane thickening and reduced pericyte and endothelial cell loss [19].

The developing and postnatal vertebrate retina contains neural progenitor cells that divide, generate neurospheres, and undergo neuronal and glial differentiation [20-23]. These cells can be identified by their ability to proliferate based on the incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU), and by the

Correspondence to: Jacqueline M. Lopes de Faria, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6111,13083-970, Campinas, SP, Brazil; Phone: +55-19-3521-7499; FAX: +55-19-3521-7366; email: jmlfaria@fcm.unicamp.br

expression of progenitor markers such as nestin, membrane receptor tyrosine kinase, also designated vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1), and paired box gene 6 (Pax6) [24-27]. p27^{Kip1} has recently been implicated in the molecular mechanism that controls the decision of multipotent central nervous system progenitors to withdraw from the cell cycle and to maintain the differentiated state of the postmitotic cell [28]. In the retina, p27^{Kip1} is expressed in a pattern coincident with the onset of the differentiation of most retinal cell types, and in vitro the accumulation of p27^{Kip1} in retinal cells correlates with cell cycle withdrawal and differentiation, thereby inhibiting progenitor cell proliferation [28].

These observations prompted us to search for potential progenitor cells in adult rat retina. We also wanted to assess the impact of hypertension and short-term diabetes on the number of retinal BrdU positive cells and to examine the relationship between these cells and the well known abnormalities associated with the early stages of diabetic retinopathy. We have identified a small population of potential progenitor cells characterized by BrdU positivity that colocalize with nestin, protein kinase C- α (PKC- α), Flk-1, and glial fibrillary acidic protein (GFAP) antigens. Furthermore, the higher number of 84 proliferating cells in the retina of adult spontaneously hypertensive rats compared with normotensive rats was 85 significantly reduced in diabetic SHR rats. These findings were associated with enhanced expression of p27^{Kip1} and with the classic abnormalities of diabetic retina—i.e., fibronectin accumulation, increased expression of retinal vascular endothelial growth factor (VEGF), and blood-retinal barrier breakdown.

METHODS

The experiments were done in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The protocol for this study complies with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (CEEA/IB/UNICAMP, protocol no. 1408-1). This study used spontaneously hypertensive rats (SHR) and their genetically normotensive counterparts, Wistar Kyoto rats (WKY), which were derived from animals supplied by Taconic (Germantown, NY) and bred in our animal facility. The rats were housed at a constant temperature (24 °C) on a 12 h:12 h light-dark cycle with access to food and tap water ad libitum. The rats were weighed on the day before the induction of diabetes and before they were euthanized.

Experimental diabetes was induced in 4- and 12-week-old hypertensive male SHR and WKY rats, who had been allowed to fast overnight. Each animal was given a single intravenous injection of 50 mg/kg streptozotocin (STZ; Sigma, St. Louis, MO), dissolved in sodium citrate buffer, pH 4.5, within 5 min of its preparation. Control rats received only vehicle (500 μ l citrate buffer). Blood 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 euthanasia. Values \geq 15 mmol/l were indicative of diabetes. Systolic blood pressure was obtained by tail-cuff plethysmography (Physiograph[®] MK-III-S; Narco Bio-System, Houston, TX) in unanesthetized, warmed rats. Three to five determinations were made per rat. Readings were taken on the day before the induction of diabetes and before rats were euthanized. Rats were habituated with the procedure for measurement before taking the blood pressure readings.

Fifteen days after the induction of diabetes, retinal capillary permeability was assessed, and the rats were euthanized with an overdose (twice the anesthetic dose) of anesthesia. The eye globes and retinas were collected for immunohistochemistry, immunofluorescence, and western blot analyses. We have previously described early inflammatory and oxidative changes in retina from diabetic SHR rats after 20 days of diabetes mellitus [29,30]. The aim of the present work was to examine the alterations in cellular proliferation and apoptosis that precede the changes we have mentioned, and to investigate the relationship between these changes and the well established abnormalities associated with the early stages of diabetic retinopathy.

Detection of proliferating cells in vivo: Retinal cell replication was evaluated based on the incorporation of BrdU (Calbiochem, La Jolla, CA), a thymidine analog that incorporates into DNA in the S phase [14,31]. Briefly, the rats were given an intraperitoneal injection of 100 mg/kg BrdU, dissolved in saline, 1 h before they were euthanized. An equal number of control rats received saline alone. The rats were euthanized with an intraperitoneal injection of 30 mg/kg sodium pentobarbital (Hipnol, Fontoveter, Itapira, SP, Brazil). Their eyes were enucleated, and 130 a portion of the gastrointestinal tract (positive control for BrdU staining) were excised. The eye globe and the GI tract were 131 fixed in buffered formalin, and embedded in paraffin-embedded, or placed in OCT 132 cryoprotector (Tissue-Tech, Sakura, CA) and snap frozen in liquid nitrogen for subsequent sectioning in a cryostat. Next, 4 μ m-thick consecutive sections were mounted on silane-coated slides for immunofluorescence.

Immunohistochemistry for BrdU and p27^{Kip1}: Detection of BrdU and p27^{Kip1} was performed by dewaxing slides of eye sections, rehydrating them, and placing in 2 N HCl at 31 °C for 20 min and in 0.005% trypsin in phosphate-buffered saline (PBS) at 37 °C for 2 min for antigen retrieval. After this pretreatment, the slides were placed in 1% nonfat milk in PBS for 1 h to block nonspecific sites. The sections were then incubated with a 1:50 dilution of mouse antihuman antibodies for BrdU (Dako, Glostrup, Denmark) or a 1:100 dilution of mouse monoclonal anti-p27^{Kip1} antibody (Transduction Laboratories, Lexington, KY) for 1.5 h at room temperature. The slides of eye sections were washed in, a biotinylated

secondary antimouse IgG antibody (Vector, Burlingame, CA) was applied and allowed to sit for 1 h. Endogenous peroxidase was blocked by incubating the slides in 3% H₂O₂ for 5 min. To detect p27^{Kip1}, we performed microwave post-fixation of slides immersed in 0.01 M citrate buffer, pH 6.0 using a domestic oven (Panasonic Junior, Sao Paulo, SP, Brazil) operated at 700 W. The slides were incubated with an avidin-biotin complex (ABC) reagent (Vector) for 30 min followed by the addition of diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma) as a substrate-chromogen solution. Next, the slides were counterstained with hematoxylin before they were dehydrated and mounted in Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). Positive controls for BrdU staining consisted of sections of the gastrointestinal tract of each rat. Negative controls for the reaction consisted of omitting the primary antibody.

Quantitative analysis of BrdU positivity was done by an observer unaware of the slide identification. The results were expressed as the total number of positive cells counted in eight random retinal sections from the right eye of each rat. For p27^{Kip1}, the results were expressed as a percentage of positive cells in the ganglion cell and inner nuclear layers, using the following scale: 0 (no positivity), 0.5 (up to 10% positivity), 1 (11%–25% positivity), 1.5 (26%–40% positivity), 2 (41%–53% positivity), 2.5 (54%–66% positivity), 3 (67%–80% positivity), and 4 (>80% positivity) [29]. The intervening distance between retinal sections was approximately 24 µm.

Immunocolocalization by immunofluorescence: The slides were fixed with acetone for 3 min at room temperature, after which they were washed with PBS, pH 7.4, and blocked in PBS containing 5% bovine serum albumin (BSA) for 2 h at room temperature. The sections were then incubated with the appropriate primary antibody to identify glial, endothelial, and neuronal cells (1:10 goat polyclonal anti-GFAP antibody; Santa Cruz Biochemical, Santa Cruz, CA; 1:100 mouse monoclonal anti-FLK-1 antibody; Santa Cruz; 1:10 mouse antineurin antibody; BD PharMingen™, Franklin Lakes, NJ; and 1:10 mouse monoclonal anti PKC- α antibody; Abcam, Inc., Cambridge, MA) for 5 h at room temperature. After they were washed with PBS, the sections were incubated with secondary antibody (donkey antigoat IgG-FITC or goat antimouse IgG-FITC) as appropriate for 1 h at room temperature. The slides were then washed with PBS and incubated with 1:10 sheep polyclonal anti-BrdU antibody (Abcam, Inc.) overnight at 4 °C, followed by another wash with PBS and incubation with rabbit polyclonal antibody to 1:1,000 sheep IgG-rhodamine (1.5 mg of IgG; Abcam) for 1 h at room temperature. Finally, the sections were rinsed with PBS then coverslipped with Vectashield antifading medium containing 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI) to stain nuclei (Vector). The sections were examined under a confocal laser scanning microscope (CLSM, LSM510 Zeiss, Jena, Germany) with appropriate emission filters for FITC and rhodamine. Digital images were captured using specific

software (LSM; Zeiss). The negative controls consisted of omitting the primary antibody.

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick-end labeling: To determine whether retinal cell apoptosis was influenced by age, diabetes or rat strain, the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL) method for detecting DNA breaks in situ [32] was applied to retinal tissue from the same rats used for BrdU immunostaining. [14,32]. Sections (4 µm thick) were deparaffinized, boiled in 0.01 M citric acid, pH 6.0, and incubated with 9.3 µg/ml proteinase K (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) for 15 min at room temperature. Endogenous peroxidase was quenched, and sections were rinsed in One-Phor-All buffer (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pH 7.2, and incubated with diluted 1:50 TdT (Amersham Pharmacia) and diluted 1:50 biotinylated-dUTP (Gibco, Grand Island, NY) in TdT buffer (100 mM TRIS, 1 mM dithiothreitol, 50% of glycerol, 0.1% sodium azide, 0.01%, Brij®35 [Polyoxyethyleneglycol dodecyl ether], pH 7.2) for 60 min at room temperature. Labeled nuclei were detected with ABC Vectastain (Vector) in PBS and DAB, chloride, and hydrogen peroxide and counterstained with hematoxylin. As a positive control, some slides were treated with 20 Kunitz units/ml DNase (Sigma). The quantitative analysis for TUNEL-positive cells was done by an observer with no knowledge of the studied groups. Results were expressed as the number of positive cells per retinal section in at least eight random retinal sections from the right eye of each animal. The distance between sections was approximately 24 µm.

Isolation of retina: The eyes were enucleated, and the retinas were dissected and isolated from the retinal pigmented epithelium. The retinas were lysed directly on ice in 300 µl of a buffer containing 2% SDS and 60 mM Tris-HCl (pH 6.8) supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Complete®, containing irreversible and reversible protease inhibitors such as antipain, aprotinin, bestatin, chymostatin, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), leupeptin, pepstatin and phosphoramidon; Boehringer-Mannheim). The lysed retinas were centrifuged. The supernatants were transferred to new tubes, and the protein concentrations were measured by the Bradford method [33], using BSA as the standard.

Western blotting for fibronectin, GFAP, and VEGF: For western blotting, 30 µg (for GFAP), 50 µg (for fibronectin), and 100 µg (for VEGF) of total retinal protein in 5% glycerol/0.03% bromophenol blue/10 mM dithiothreitol was loaded onto 8%–15% SDS polyacrylamide gels. Molecular weight markers (Rainbow; Amersham Pharmacia) were used as standards. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA) in transfer buffer consisting of 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 380 mM glycine, 0.1% SDS, and 20% methanol. Nonspecific binding

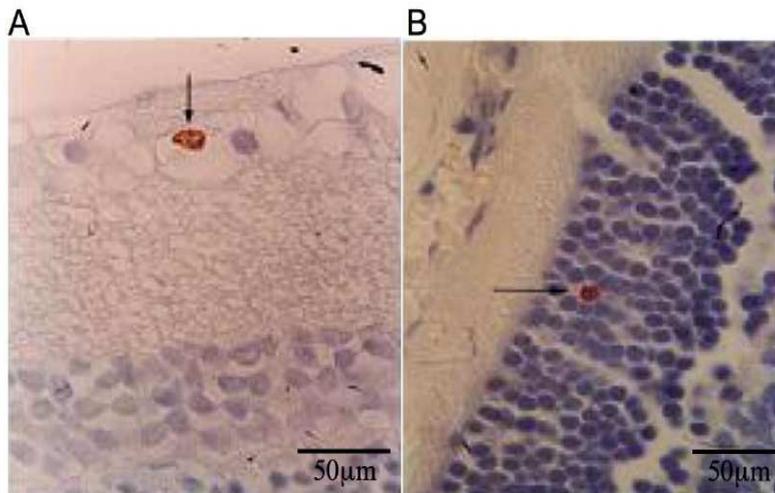


Figure 1. Immunohistochemistry for BrDU in retinal slides from studied rats. The BrDU positive cells, although rare, are localized in ganglion cell layer (A) and in inner nuclear layer (B). The scale bar represents 50 µm.

TABLE I. GENERAL CHARACTERISTICS OF THE STUDIED RATS

Parameter	Younger rat groups				Adult rat groups			
	CT-WKY	DM-WKY	CT-SHR	DM-SHR	CT-WKY	DM-WKY	CT-SHR	DM-SHR
N	20	24	25	24	22	26	29	26
Final body weight (g)	198±21	139±23†	134±15	105±12†	406± 54	293±43†	267±42	189±25†
Systolic blood pressure (mmHg)	140 ±7‡	142 ±5‡	118±13	120±13	174±14‡	174±18‡	117±12	115±14
Glycemia (mmol/l)	6.9±0.3	30.4±2.5§	7.1±0.5	28.6±4§	6.2±1.3	25.6±5.2§	5.8±1.6	25.3±4.2§

The following abbreviations are in effect: CT-WKY: control WKY; DM-WKY: diabetic WKY; CT-SHR: control SHR; DM-SHR: diabetic SHR; SBP: systolic blood pressure; * p<0.005 versus respectively WKY groups, †p<0.003 versus control groups, ‡p=0.0001 versus WKY groups, §p<0.0001 versus control groups.

was blocked by incubating the membranes overnight at 4 °C in 5% nonfat milk, or at 4 °C in PBS containing 1% gelatin with 0.1% Tween 20 (Fisher Chemicals, Fairlawn, NJ) for VEGF. The membranes were then incubated for 1 h at room temperature with primary antibodies: 1:1,000 goat monoclonal anti-fibronectin antibody (Calbiochem, San Diego, CA), 1:100 polyclonal goat-GFAP antibody (Santa Cruz, Santa Cruz, CA), and 1:5000 rabbit polyclonal IgG anti-VEGF antibody (Santa Cruz). The blots were subsequently washed in Tris-buffered saline with Tween and incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (New England Biolabs, Beverly, MA). Immunoreactive bands were visualized with the enhanced 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 Bio Rad (Hercules, CA). Western blots were repeated 3–5 times; qualitatively similar results were obtained each time. Equal loading and transfer was ensured by reprobing the membranes for β-actin.

Quantitative measurement of retinal capillary permeability using Evans blue dye: Briefly [34], the rats (SHR and WKY) were anesthetized with an intraperitoneal injection of 30 mg/kg sodium pentobarbital, and the left femoral vein and right femoral artery were cannulated with 0.28 mm internal diameter polyethylene tubing (Becton Dickinson, Sparks, MD) filled with heparinized saline (400 units heparin/ml saline). Next, 45 mg/kg Evans blue dye was injected through the femoral vein over a period of 10 s. The blue color of the rats confirmed the uptake and distribution of the dye. Two minutes after the injection of the dye, 0.2 ml of blood was drawn from the femoral artery to determine the initial Evans blue plasma concentration. Subsequently, 0.1 ml of blood was drawn from the femoral artery at 15 min intervals for up to 2 h postinjection to obtain the time-averaged Evans blue plasma concentration. Exactly 2 h after infusion, needle was inserted into the left ventricle and the rats were perfused for 2 minutes at 37°C with 0.05 M, pH 3.5, citrate-buffered paraformaldehyde at a physiological pressure of 120 mm Hg.

Immediately after perfusion, both eyes were enucleated and bisected at the equator. These animals were euthanized with an injection of overdose of pentobarbital. The retinas

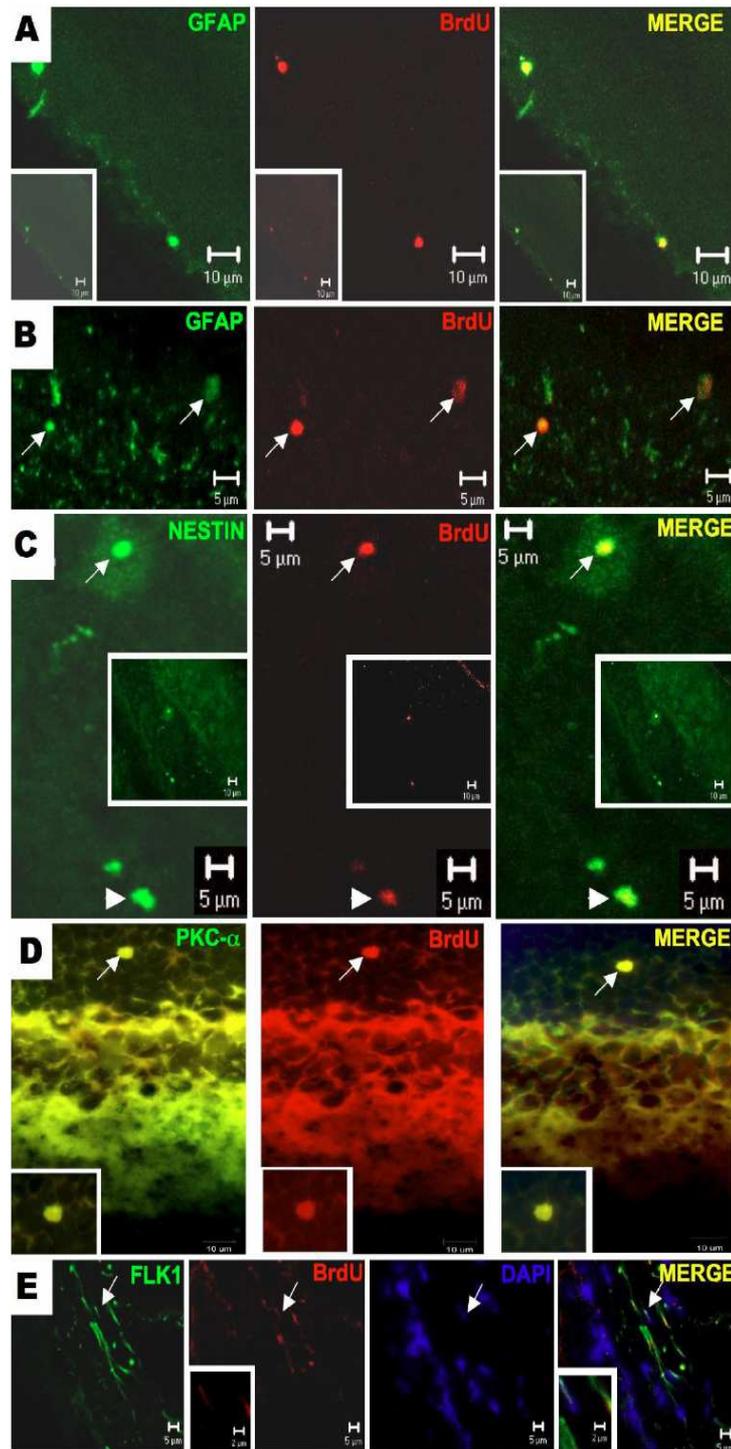


Figure 2. Immunofluorescence assay for double labeling of BrdU positive cells in retinal sections against glial, neuron and endothelial markers. In panel A, it is shown a retinal section showing two cells labeled for glial fibrillar acidic protein (GFAP) and BrdU in the ganglion cell layer. In B, there are the presence of two BrdU-positive cells in outer nuclear layer of the retina co-stained with GFAP antibody. In this slide (C), the BrdU positive cell is stained for nestin in the inner nuclear (long arrows) and ganglion cell (short arrows) layers of the retina. For identification of amacrine/bipolar origin of BrdU positive cell in the retina, an immunofluorescence for PKC- α antigen was performed. There is a BrdU positive cell that also stained for PKC- α in the outer nuclear (D). In panel E, elongated endothelial cells were identified expressing both Flk-1 and BrdU, localized in the inner nuclear layer of the retina

were carefully dissected under an operating microscope and weighed. They were then dried in a Speed-Vac for approximately 5 h. The Evans blue dye was extracted from the tissue by incubating each retina in 120 μ l formamide (Sigma) for 18 h at 70 °C followed by centrifugation at 27,000x g for 45 min in a Beckman TLX rotor at 4 °C. The absorbance of 60 μ l aliquots of the supernatant was measured spectrophotometrically in triplicate at $A_{620\text{ nm}}$ at 5 s intervals. The absorbances were corrected for background readings, and the dye content of the extracts was calculated from a standard curve of Evans blue in formamide. Blood-retinal barrier breakdown was calculated using the following equation:

$$\frac{(\mu\text{g of Evans blue}) \times (\text{time-averaged } \mu\text{g of Evans blue})}{(\text{retinal wet weight in g}) \times (\mu\text{l of plasma} \times \text{h of circulation})}$$

The results were expressed as $\mu\text{l of plasma} \times \text{retinal wet wt}^{-1} (\text{g}) \times \text{h}^{-1}$.

Statistical analysis: The results were expressed as the mean \pm standard deviation or standard error of measurement as indicated. Comparisons between groups were done using ANOVA followed by Fisher's protected least-significant difference test. All comparisons were done using the StatView statistics software for Macintosh, with a value of $p < 0.05$ indicating significance.

RESULTS

SHR rats are normotensive when they are 4 weeks old, but are fully hypertensive by the time they are 12 weeks old. We used both age groups because they allowed us to assess the contribution of the genetics of hypertension (4-week-old rats) and the influence of genetics plus hypertension per se (12-week-old rats) on retinal abnormalities. As previously demonstrated by our group and others, the systolic blood pressure (SBP) in 4-week-old SHR was significantly higher than in WKY, although still within the normal range (Table 1). The SBP of 12-week-old SHR was significantly higher ($p = 0.0001$) than that of age-matched WKY (Table 1). Bodyweight was lower, and blood glucose levels were higher in diabetic rats than in their respective controls at both ages ($p = 0.0001$; Table 1).

Cells with progenitor characteristics in adult rat retina: BrdU-positive-stained cells were rare but clearly identifiable in retinal sections of adult rats (Figure 1A,B). The proliferating retinal cells of adult rats were characterized further by using specific cell markers, including GFAP, the tyrosine-kinase receptor Flk1, the intermediate filament protein nestin, and PKC- α . BrdU and GFAP colocalized in cells of the ganglion cell layer, suggesting that they may represent glial cells in proliferation (Figure 2A,B). Other BrdU-positive cells were also colabeled with nestin (Figure 2C), an intermediate filament structural protein expressed in primitive neural tissue. The detection of this protein in the inner nuclear and ganglion cell layers suggested the presence of neural progenitor cells. Figure 2D shows a PKC- α -positive

cell in the outer nuclear layer that was also positive for BrdU. In this case, cellular maturation involved a bipolar–amacrine neural cell. The elongated BrdU-positive cells in the inner nuclear layer reacted strongly with antibody against Flk-1 (Figure 2E), a surface receptor protein characteristic of endothelial cells in cell cycle progression. These findings indicate that adult rat retina contains different populations of replicating cells with characteristics of glial or endothelial cells. The detection of cells that coexpressed BrdU and nestin or PKC- α suggests that subpopulations of replicating cells may differentiate into neural cell subtypes.

Diabetes decreases the number of progenitor cells only in retina from 12-week-old SHR: The total number of BrdU-positive retinal cells in 12-week-old rats was significantly higher in hypertensive SHR than in normotensive WKY (9.5 ± 4.0 versus 1.2 ± 0.4 positive retinal cells; $p = 0.01$). After 15 days of diabetes mellitus, there was a significant decrease in the number of these cells only in SHR (0.2 ± 0.2 positive retinal cells; $p = 0.007$; Figure 3). In contrast, in 4-week-old SHR and WKY rats, the number of proliferating cells was similar in all groups (4.5 ± 0.5 for control WKY versus 2.8 ± 0.4 for diabetic WKY versus 3.4 ± 0.4 for control SHR versus 4.0 ± 0.5 for diabetic SHR BrdU-positive cells ($p > 0.05$).

TUNEL staining is unaltered by rat strain, animal age, or short-term diabetes: The number of TUNEL-positive retinal cells in 4-week-old rats (SHR and WKY) was 3.2 ± 2.8

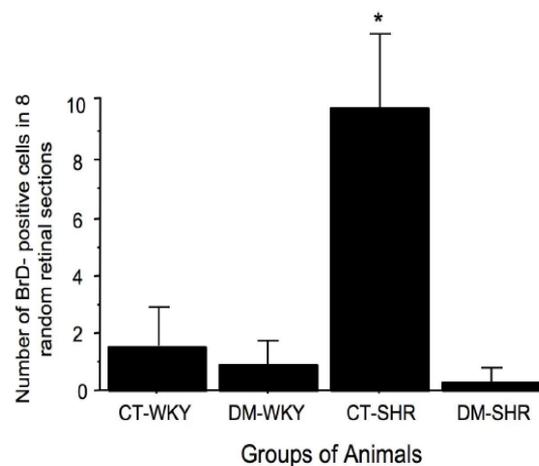


Figure 3. Total number of BrdU-positive cells counted in eight random retinal sections from 12-week-old rats. See Methods for further details. The results are expressed as the mean \pm SEM; asterisk (*) is $p = 0.02$ versus CT-spontaneously hypertensive rats (SHR). The number of BrdU positive cells present in retina from WKY rats is very low and do not change according to experiment condition (presence of experimental diabetes); by contrast in SHR rats, it is observed a higher number of these BrdU cells in retina and the induction of diabetes dramatically reduced this number abbreviations used are as follows: control WKY (CT-WKY), diabetic WKY (DM-WKY), control SHR (CT-SHR), and diabetic SHR (DM-SHR).

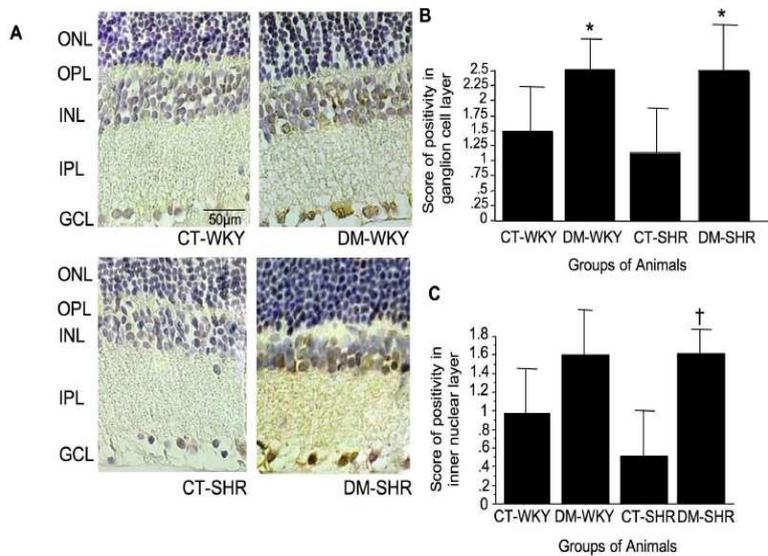


Figure 4. Retinal expression of p27^{Kip1} in retina evaluated through immunohistochemistry assay. In (A), we can see a representative immunohistochemical staining for p27^{Kip1} in retina of control and diabetic Wistar Kyoto (WKY) rats and spontaneously hypertensive rats (SHR). The brownish color represents staining for p27^{Kip1}, and the blue color represents the staining of retinal tissue with hematoxylin. Original magnification 1000x, the bar in the figure represents a scale of 50µm. The graphs represents the score of positivity of p27^{Kip1} in retinal slides expressed by mean±SD in ganglion cell (B) and inner nuclear (C) layers. Asterisk (*) is p=0.05 versus CT-WKY and CT-SHR, and dagger (†) is p=0.02 versus CT-SHR.

positive cells per retinal section in control WKY rats. This number did not differ significantly from the 2.0±2.7 positive cells per retinal section seen in diabetic WKY rats or the 2.0±2.0 and 0.9±0.8 positive cells per retinal section seen in control and diabetic SHR, respectively. The rates of apoptosis in retinal tissue in 12-week-old rats were also similar among the groups (1.2±1.3 for control WKY versus 1.9±2.7 for diabetic WKY versus 1.6±1.7 control SHR versus 1.1±0.1 for diabetic positive cells/retinal section, p<0.05). Hence, in eight retinal sections, the number of TUNEL-positive cells was 9.6 for control WKY, 15.2 for diabetic WKY, 12.8 for control SHR, and 8.8 for diabetic SHR.

Since diabetes and hypertension influenced the number of BrdU-positive cells only in 12-week-old rats, all subsequent experiments were done only 12-week-old rats.

To investigate a potential role for cell cycle regulatory proteins in the reduction in BrdU-positive retinal cells in 12-week-old diabetic SHR, we examined the expression of p27^{Kip1}. Immunohistochemistry revealed a heterogeneous distribution for p27^{Kip1} in the retinal cell layers, with greater positivity in the ganglion cell layer (Figure 4A). There was a significant increase in p27^{Kip1} protein positivity in this layer in diabetic rats (1.5±1 in control WKY versus 2.5±0.5 in diabetic WKY, and 1.5±1.5 in control SHR versus 2.5±1 in diabetic SHR positive score, p=0.05; Figure 4B). Interestingly, there was a significant increase in p27^{Kip1} protein in the inner nuclear layer only in diabetic SHR rats (0.7±0.6 versus 1.6±0.4 positive score for control versus diabetic SHR, p=0.02; Figure 4C). The increase in p27^{Kip1} expression in diabetic WKY, was not significant (0.9±0.5 and 1.6±0.5 positive score for normal and diabetic WKY; Figure 4C). The accumulation of p27^{Kip1} in retinal tissue is

accompanied by increased fibronectin expression in diabetic hypertensive rats.

To identify factors potentially involved in the pathogenesis of diabetic retinopathy, we examined the retinal expression of fibronectin, an extracellular matrix component associated with functional properties of the inner blood-retinal barrier. Western blot analysis of total retinal lysates revealed a significant increase in fibronectin expression in diabetic SHR compared with control SHR (p=0.04) or diabetic (p=0.03) and control WKY (p=0.009; Figure 5). The enhanced expression of p27^{Kip1} and fibronectin reflected a generalized response to hyperglycemia in target organs such as the kidney. This is the first demonstration of an association between increased expression of p27^{Kip1} and fibronectin accumulation in retinal tissue, and could contribute to thickening of the retinal capillary basement membrane seen in diabetic retina.

The expression of retinal GFAP is unaltered in SHR or WKY rats: The retinal expression of GFAP in total retinal lysates, as evaluated by western blotting, was used as an indicator of glial cell reactivity. This expression did not differ between 345 control SHR (5.2±1.4 arbitrary units) and WKY rats (4.5±0.5 arbitrary units), nor was it significantly altered by 15 days of diabetes mellitus (4.5±0.5 for diabetic WKY and 4.4±0.8 arbitrary units for diabetic SHR; Figure 6)

VEGF expression is enhanced in diabetic SHR after 15 days of diabetes mellitus: There was a significant increase in the retinal expression of VEGF only in diabetic SHR (0.9±0.1 arbitrary units versus 1.1±0.1 arbitrary units for diabetic WKY and 0.8±0.1 arbitrary units for control SHR and 1.3±0.2 arbitrary units for diabetic SHR, p=0.02) (Figure 7).

Blood-retinal barrier breakdown occurs only in diabetic hypertensive rats: The extent of blood-retinal barrier breakdown, estimated by the extravasation of Evans blue dye,

was similar in control and diabetic WKY rats (11.4 ± 1.5 for control WKY and $10.3 \pm 1.3 \mu\text{g plasma} \times \text{g retinal wet wt}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ for diabetic WKY; $n=5$ rats). In contrast, there was a significant increase in retinal capillary permeability in diabetic SHR compared with control SHR (8.6 ± 0.7 for control SHR and 17.4 ± 4.6 for diabetic SHR $\mu\text{g plasma} \times \text{retinal wet wt}^{-1} \times \text{h}^{-1}$; $p=0.01$, $n=5$ rats; Figure 8).

DISCUSSION

The results of this study show that the adult rat retina contains a small number of BrdU-positive cells that also express glial, neural, and endothelial progenitor cell markers. The number of these cells was higher in hypertensive rats but was markedly reduced by the concomitant presence of hypertension and diabetes. The greater expression of the Cdk inhibitor, p27^{Kip1}, probably accounts for the reduction in the number of proliferating cells in diabetic retina. Additionally, diabetic hypertensive rats with a reduction in the number of BrdU-positive cells and enhanced p27^{Kip1} expression also displayed classic characteristics of early diabetic retinal disease: enhanced fibronectin and VEGF expression and greater blood-retinal barrier breakdown. These observations—i.e., cell cycle withdrawal and enhanced production of extracellular matrix and VEGF expression—could provide a basis for a new understanding of the mechanisms involved in the pathogenesis of diabetic retinopathy.

It is known that SHR rats display innate abnormal endothelial function associated with eNOS compensatory

activity and increased nitric oxide production [35]. Evidence is accumulating that implicates oxygen free radical formation and N-methyl-D-aspartate (NMDA)-receptor-mediated toxicity in the pathophysiology of ischemic retinal injury [36,37]. These two mechanisms are linked by nitric oxide. NMDA-receptor activation generates nitric oxide, which reacts with superoxide to form toxic species such as peroxynitrite. Neuropeptide Y (NPY) is a 36 amino acid peptide widely present in the central nervous system including the retina. NPY was recently found to stimulate retinal neural cell proliferation mediated through nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate (GMP) and extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 pathways [38]. These results suggest that the increased retinal cell proliferation observed in SHR rats may be due to activation of NPY through nitric oxide-cyclic GMP and ERK 1/2 pathways. Previous data from other cell types of SHR also demonstrated that mesangial cells have a higher proliferation rate in vitro than control WKY mesangial cells [39], suggesting that the genetics of hypertension may contribute to this phenotype.

The changes described for diabetic hypertensive SHR were not associated with the toxicity of streptozotocin for two reasons: 1) they occurred in the retina of diabetic hypertensive SHR but not in normotensive diabetic WKY rats; and 2) they were absent in diabetic WKY and SHR rats rendered diabetic at four weeks of age. These changes are also not attributable to differences in metabolic control, because the blood glucose levels were similar in both diabetic groups.

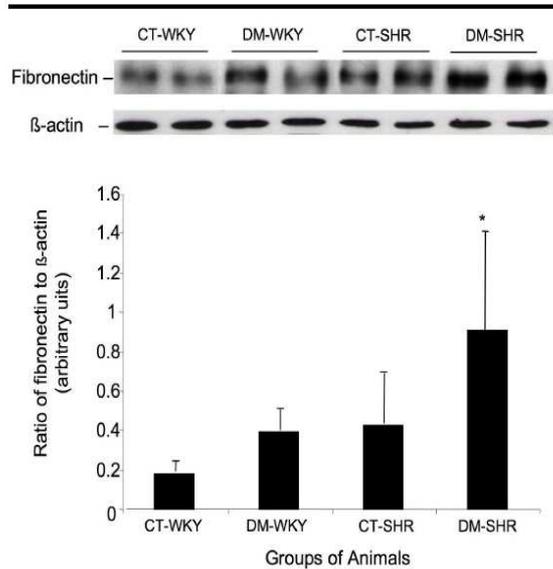


Figure 5. Western blot assay to access the retinal expression of fibronectin. A: The membranes were incubated with antibody against glial fibrillar acidic protein in total retinal lysates. B: Band densities (ratio of fibronectin to beta actin) expressed in arbitrary densitometric units. The columns are the mean±SD of five independent experiments.

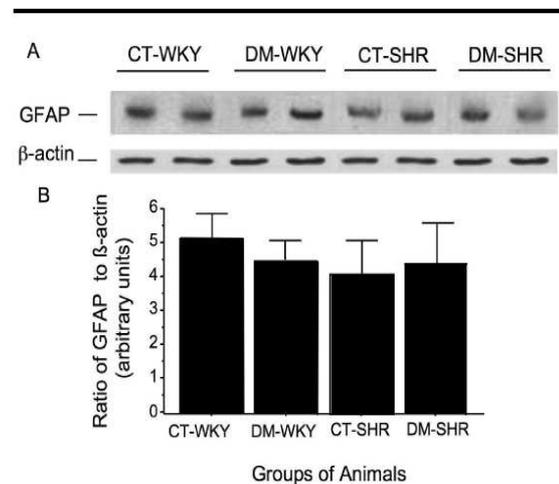


Figure 6. Retinal expression of glial fibrillar acidic protein assayed by western blot. A: The membranes were incubated with antibody against glial fibrillar acidic protein (GFAP) in total retinal lysates. The columns represent the band densities (ratio of GFAP to beta-actin) expressed in arbitrary densitometric units. Mean±SD of five independent experiments. B: Band densities (ratio of GFAP to beta-actin) expressed in arbitrary densitometric units. The used symbols are CT-WKY for control WKY, DM-WKY for diabetic WKY, CT-SHR for control SHR and DM-SHR for diabetic SHR.

The presence of neuronal progenitor cells in human retina has recently been demonstrated. It was suggested that these cells may potentially replace neurons and photoreceptors [40]. The BrdU-positive retinal cells seen in the present study were not completely characterized. However, their proliferative capacity and their colocalization with antigens of neural, glial, and endothelial origin suggest multipotent properties—i.e., they may represent progenitor cells.

Not all dividing cells in the retina are progenitors. Numerous studies have sought to identify neural progenitor cells. The intermediate filament protein nestin has a widespread, early expression in the developing retina and central nervous system and is one of the best-characterized protein markers for immature neural cells [41,42]. The coexpression of nestin with other developmental markers, such as the incorporation of BrdU (such as that seen in the present study) strongly suggests that the cells involved are immature. In addition to nestin, we also observed immunostaining for PKC- α (a bipolar–amacrine cell marker) in BrdU-positive cells in the retina. The coexpression of BrdU and nestin or BrdU and PKC- α was also seen.

The cyclin kinase inhibitor p27^{Kip1} may be involved in reducing the number of proliferating retinal cells. Levine et al. [28] suggested that p27^{Kip1} is part of the molecular mechanism that controls the decision of multipotency central nervous system progenitor cells to withdraw from the cell cycle. These authors also proposed that postmitotic Müller glia have a novel, intrinsic requirement for p27^{Kip1} to maintain their differentiated state. The heterogeneous distribution of p27^{Kip1} seen in retinal tissue, with greater expression in the inner nuclear layer only in diabetic SHR, may contribute to the different number of replicating cells in this group. Further clarification of the other mechanisms involved in what prompts a replicating retinal cell to withdraw or continue in the cycle when in the presence of diabetes and hypertension is beyond the scope of this study and requires a new experimental design.

In the present study, we did not detect an enhanced apoptotic rate in retina from normotensive diabetic WKY and hypertensive diabetic SHR rats, as reported by others. Thus, for example, Gastinger et al. [43] reported a significant increase in the apoptotic rate in retina from diabetic rats, based on the number of TUNEL-positive nuclei seen in whole-mounted retinas from Sprague-Dawley rats after two weeks of streptozotocin-induced diabetes. The discrepancy between our findings and the latter study may be related to differences in rat strain and in the use of whole-mounted retina compared to retinal cross-sections. In our study, the retinas of diabetic=WKY and SHR rats after 12 weeks of diabetes showed a significant increase in the number of TUNEL-

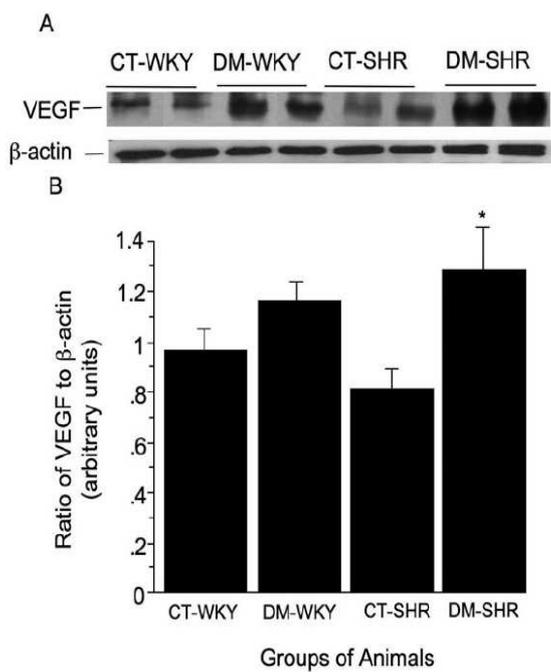


Figure 7. Retinal expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) was accessed by western blot assay. In A, the membranes were incubated with antibody against VEGF in total retinal lysates. B: The graph display the band densities (ratio of VEGF to β actin) expressed in arbitrary densitometric units. The columns are the mean \pm SD of four experiments. The used symbols are CT-WKY for control WKY, DM-WKY for diabetic WKY, CT-SHR for control SHR and DM-SHR for diabetic SHR. Asterisk (*) is $p=0.02$ versus other groups.

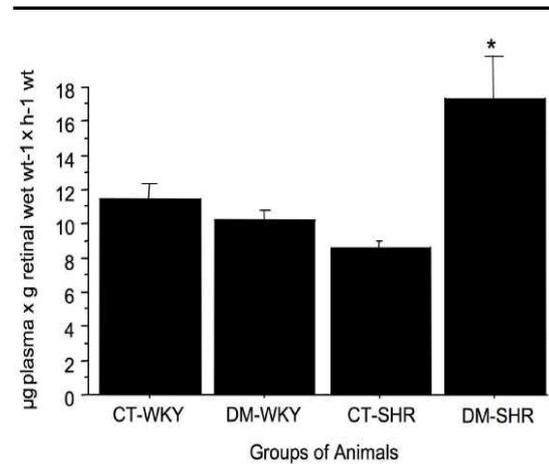


Figure 8. Retinal capillary permeability assessed by the Evans blue method in control and diabetic spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar Kyoto (WKY) rats. The permeability was expressed in μ l of plasma \times g retinal wet wt⁻¹ \times h⁻¹ wt. The results are expressed as the mean \pm SD. The following abbreviations are in effect: control WKY (CT-WKY), diabetic WKY (DM-WKY), control SHR (CT-SHR), and diabetic SHR (DM-SHR).

positive cells in the diabetic groups, particularly in diabetic SHR rats ($p=0.0003$; unpublished).

Increased extracellular matrix protein production leading to structural abnormalities is a hallmark of diabetic microangiopathy and has been demonstrated in all target organs of diabetic complications, including retina, kidney, and heart [44,45]. Enhanced extracellular matrix protein synthesis is instrumental in thickening of the basement membrane [16, 46]. Fibronectin is a major extracellular matrix component but its overproduction may decrease the motility and replication of many cells [46]. As revealed in the present study, retinal tissue from diabetic WKY rats and nondiabetic SHR showed enhanced fibronectin expression in total retinal lysates, although this expression was not significantly different from that in control WKY rats.

The accumulation of fibronectin in retinal tissue is a classic finding encountered early in the pathogenesis of diabetic retinal disease and in the microcirculation in models of hypertension [47-49]. Several studies have described the accumulation of extracellular matrix in target organs of hypertensive rats. In stroke-prone SHR there is enhanced accumulation of extracellular matrix proteins in the cerebral vasculature [47,48]. Agabiti-Rosei demonstrated that structural and functional changes in the microcirculation during arterial hypertension, e.g., remodeling of the extracellular matrix and accumulation of collagen and fibronectin, were associated with several neurohumoral and hormonal factors [49]. Hence, the similar extracellular protein accumulation seen here between diabetic WKY rats and nondiabetic SHR may be the result of either diabetes or hypertension alone.

The induction of diabetes in SHR leads to a reduction in renal cell replication with concomitant overexpression of p27^{Kip1} [14]. p27^{Kip1}-deficient mice do not develop the classic features of diabetic nephropathy such as renal hypertrophy, glomerular expression of fibronectin, and albuminuria, all of which are marked in wild-type mice [50]. This finding suggests that modulation of p27^{Kip1} function may ameliorate diabetic nephropathy. The effect of a reduction in p27^{Kip1} expression on diabetic retinopathy remains to be elucidated.

In conclusion, the combination of genetic hypertension and experimental diabetes markedly reduced retinal cell proliferation. This reduction was associated with enhanced p27^{Kip1}, fibronectin, and VEGF retinal expressions and greater blood-retinal barrier breakdown. Additional studies are required to clarify the mechanisms by which these cellular changes contribute to the structural abnormalities associated with the early pathogenesis of diabetic retinopathy.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sérgio Magalhães, Elisa B. M. Peixoto, and Flávia F. Mesquita for technical assistance and Stephen Hyslop for editing the manuscript. This work was supported by Fundação

de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; grant nos. 04/00455-9 and 05/58189-5).

REFERENCES

- Asnaghi V, Gerhardinger C, Hoehn T, Adeboje A, Lorenzi M. A role for the polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat. *Diabetes* 2003; 52:506-11. [PMID: 12540628]
- 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; 102:783-91. [PMID: 9710447]
- Hyvarinen L, Laurinen P, Rovamo J. Contrast sensitivity in evaluation of visual impairment due to diabetes. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1983; 61:94-101. [PMID: 6858649]
- Bresnick GH, Korth K, Groo A, Palta M. Electroretinographic oscillatory potentials predict progression of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1984; 102:1307-11. [PMID: 6383303]
- Ghirlanda G, Di Leo MA, Caputo S, Falsini B, Porciatti V, Marietti G, Greco AV. Detection of inner retina dysfunction by steady-state focal electroretinogram pattern and flicker in early IDDM. *Diabetes* 1991; 40:1122-7. [PMID: 1936619]
- Hardy KJ, Lipton J, Scase MO, Foster DH, Scarpello JH. Detection of colour vision abnormalities in uncomplicated type 1 diabetic patients with angiographically normal retinas. *Br J Ophthalmol* 1992; 76:461-4. [PMID: 1390526]
- Dosso AA, Bonvin ER, Morel Y, Golay A, Assal JP, Leuenberger PM. Risk factors associated with contrast sensitivity loss in diabetic patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996; 234:300-5. [PMID: 8740250]
- Lopes de Faria JM, Katsumi O, Cagliero E, Nathan D, Hirose T. Neurovisual abnormalities preceding the retinopathy in patients with long-term type 1 diabetes mellitus. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001; 239:643-8. [PMID: 11688662]
- Stephenson JM, Fuller JH, Viberti G-C, Sjolie A-K, Navales R. the EURODIAB IDDM Complications Study Group. Blood pressure, retinopathy and urinary albumin excretion in IDDM: The EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia* 1995; 38:599-603. [PMID: 7489844]
- Wolf G, Schroeder R, Ziyadeh FN, Thaiss F, Zahner G, Stahl RA. High glucose stimulates expression of p27^{Kip1} in cultured mouse mesangial cells: relationship to hypertrophy. *Am J Physiol* 1997; 273:F348-56. [PMID: 9321907]
- Kuan CJ, Al-Douhaji M, Shankland S. The cyclin kinase inhibitor p21^{WAF1, Cip1} is increased in experimental diabetic nephropathy: potential role in glomerular hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:986-93. [PMID: 9621281]
- Al-Douhaji M, Brugarolas J, Brown PAJ, Stehman-Breen CO, Alpers CE, Shankland SJ. The cyclin kinase inhibitor p21^{WAF1/CIP1} is required for glomerular hypertrophy in experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1999; 56:1691-9. [PMID: 10571777]
- Hannken T, Schroeder R, Zahner G, Stahl RAK, Wolf G. Reactive oxygen species stimulate p44/42 mitogen-activated protein kinase and induce p27^{Kip1}: role in angiotensin II-mediated hypertrophy of proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:1387-97. [PMID: 10906152]

14. Silveira LA, Bacchi CE, Pinto GA, Lopes de Faria JB. The genetics of hypertension modifies the renal cell replication response induced by experimental diabetes. *Diabetes* 2002; 51:1529-34. [PMID: 11978652]
15. Roy S, Cagliero E, Lorenzi M. Fibronectin overexpression in retinal microvessels of patients with diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37:258-66. [PMID: 8603829]
16. Cai J, Boulton M. The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye* 2002; 16:242-60. [PMID: 12032713]
17. Garner A. Histopathology of diabetic retinopathy in man. *Eye* 1993; 7:250-3. [PMID: 7607344]
18. Lorenzi M, Gerhardinger C. Early cellular and molecular changes induced by diabetes in the retina. *Diabetologia* 2001; 44:791-804. [PMID: 11508263]
19. Roy S, Sato T, Paryani G, Kao R. Downregulation of fibronectin overexpression reduces basement membrane thickening and vascular lesions in retinas of galactose-fed rats. *Diabetes* 2003; 52:1229-34. [PMID: 12716757]
20. Ahmad I, Dooley CM, Thoreson WB, Rogers JA, Afiat S. In vitro analysis of a mammalian retinal progenitor that gives rise to neurons and glia. *Brain Res* 1999; 831:1-10. [PMID: 10411978]
21. Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, van der Kooy D. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 2000; 287:2032-6. [PMID: 10720333]
22. Fischer AJ, Reh TA. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol* 2000; 220:197-210. [PMID: 10753510]
23. Ahmad I, Tang L, Pham H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270:517-21. [PMID: 10753656]
24. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990; 60:585-95. [PMID: 1689217]
25. Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 1993; 118:489-98. [PMID: 8223275]
26. Liu IS, Chen JD, Ploder L, Vidgen D, van der Kooy D, Kalnins VI, McInnes RR. Developmental expression of a novel murine homeobox gene (Chx10): evidence for roles in determination of the neuroretina and inner nuclear layer. *Neuron* 1994; 13:377-93. [PMID: 7914735]
27. Hitchcock PF, Macdonald RE, VanDeRyt JT, Wilson SW. Antibodies against Pax6 immunostain amacrine and ganglion cells and neuronal progenitors, but not rod precursors, in the normal and regenerating retina of the goldfish. *J Neurobiol* 1996; 29:399-413. [PMID: 8907167]
28. Levine EM, Close J, Fero M, Ostrovsky A, Reh TA. p27(Kip1) regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina. *Dev Biol* 2000; 219:299-314. [PMID: 10694424]
29. Pinto CC, Silva KC, Biswas SK, Martins N, De Faria JB, De Faria JM. Arterial hypertension exacerbates oxidative stress in early diabetic retinopathy. *Free Radic Res* 2007; 41:1151-8. [PMID: 17886037]
30. Silva KC, Pinto CC, Biswas SK, Lopes de Faria JB, Lopes de Faria JM. Hypertension increases retinal inflammation in experimental diabetes: a possible mechanism for aggravation of diabetic retinopathy by hypertension. *Curr Eye Res* 2007; 32:533-41. [PMID: 17612969]
31. Harms G, Goor H, Koudstaal J, Ley L, Hardonk MJ. Immunohistochemical demonstration of DNA-incorporated 5-bromodeoxyuridine in frozen and plastic embedded sections. *Histochemistry* 1986; 85:139-43. [PMID: 3528077]
32. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119:493-501. [PMID: 1400587]
33. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54. [PMID: 942051]
34. Xu Q, Qaum T, Adamis AP. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:789-94. [PMID: 11222542]
35. Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31:1248-54. [PMID: 9622137]
36. Yoon YH, Marmor MF. Dextromethorphan protects retina against ischemic injury in vivo. *Arch Ophthalmol* 1989; 107:409-11. [PMID: 2923566]
37. Cao W, Zaharia M, Drumheller A, Casanova C, Lafond G, Brunette JR, Jolicoeur FB. Effects of dextromethorphan on ischemia induced electroretinogram changes in rabbit. *Curr Eye Res* 1994; 13:97-102. [PMID: 8194364]
38. Alvaro AR, Martins J, Araújo IM, Rosmaninho-Salgado J, Ambrósio AF, Cavadas C. Neuropeptide Y stimulates retinal neural cell proliferation - involvement of nitric oxide. *J Neurochem*. 2008 [PMID: 18331583]
39. Lopes de Faria JB, Zoukhri D, Lorenzi M. Mesangial cell abnormalities in spontaneously hypertensive rats before the onset of hypertension. *Kidney Int* 1997; 52:387-92. [PMID: 9263994]
40. Mayer EJ, Carter DA, Ren Y, Hughes EH, Rice CM, Halfpenny CA, Scolding NJ, Dick AD. Neural progenitor cells from postmortem adult human retina. *Br J Ophthalmol* 2005; 89:102-6. [PMID: 15615756]
41. Yang J, Bian W, Gao X, Chen L, Jing N. Nestin expression during mouse eye and lens development. *Mech Dev* 2000; 94:287-91. [PMID: 10842089]
42. Krugliakova EP, Khovriakov AV, Shikhanov NP, McKhann GM II, Vael I, Krugliakov PP, Sosunov AA. Nestin-expressing cells in the human hippocampus. *Morfologiya* 2004; 126:19-25. [PMID: 15839245]
43. Gastinger MJ, Singh RS, Barber AJ. Loss of cholinergic and dopaminergic amacrine cells in streptozotocin-diabetic rat and Ins2Akita-diabetic mouse retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:3143-50. [PMID: 16799061]
44. Chakrabarti S, Cukiernik M, Hileeto D, Evans T, Chen S. Role of vasoactive factors in the pathogenesis of early changes in diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Res Rev* 2000; 16:393-407. [PMID: 11114100]
45. King GL, Brownlee M. The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996; 25:255-70. [PMID: 8799700]
46. Evans T, Deng DX, Chen S, Chakrabarti S. Endothelin receptor blockade prevents augmented extracellular matrix component

- mRNA expression and capillary basement membrane thickening in the retina of diabetic and galactose-fed rats. *Diabetes* 2000; 49:662-6. [PMID: 10871206]
47. Nag S, Kilty DW. Cerebrovascular changes in chronic hypertension. Protective effects of enalapril in rats. *Stroke* 1997; 28:1028-34. [PMID: 9158646]
48. Liebetrau M, Burggraf D, Büscher C, Linz W, Hamann GF. Ramipril prevents extracellular matrix accumulation in cerebral microvessels. *Neurol Res* 2005; 27:477-82. [PMID: 16025600]
49. Agabiti-Rosei E. Structural and functional changes of the microcirculation in hypertension: influence of pharmacological therapy. *Drugs* 2003; 63:19-29. [PMID: 12708883]
50. Awazu M, Omori S, Ishikura K, Hida M, Fujita H. The lack of cyclin kinase inhibitor p27(Kip1) ameliorates progression of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:699-708. [PMID: 12595506]

The print version of this article was created on 15 September 2008. This reflects all typographical corrections and errata to the article through that date. Details of any changes may be found in the online version of the article.

1691

Diabetic Retinal Neurodegeneration Is Associated With Mitochondrial Oxidative Stress and Is Improved by an Angiotensin Receptor Blocker in a Model Combining Hypertension and Diabetes

Kamila C. Silva, Mariana A.B. Rosales, Subrata K. Biswas, Jose B. Lopes de Faria, and Jacqueline M. Lopes de Faria

OBJECTIVE—Diabetic retinopathy displays the features of a neurodegenerative disease. Oxidative stress is involved in the pathogenesis of diabetic retinopathy. This investigation sought to determine whether hypertension exacerbates the oxidative stress, neurodegeneration, and mitochondrial dysfunction that exists in diabetic retinopathy and whether these changes could be minimized by the angiotensin II type 1 (AT₁) receptor blocker (ARB) losartan.

RESEARCH DESIGN AND METHODS—Diabetes was induced in spontaneously hypertensive rats (SHRs) and normotensive Wistar-Kyoto (WKY) rats. The diabetic SHRs were assigned to receive or not receive losartan.

RESULTS—The level of apoptosis in the retina was higher in diabetic WKY rats than in the control group, and higher levels were found in diabetic SHRs. The apoptotic cells expressed neural and glial markers. The retinal glial reaction was more evident in diabetic WKY rats and was markedly accentuated in diabetic SHRs. Superoxide production in retinal tissue increased in diabetic WKY rats, and a greater increase occurred in diabetic SHRs. Glutathione levels decreased only in diabetic SHRs. As a consequence, the levels of nitrotyrosine and 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine, markers of oxidative stress, were elevated in diabetic groups, mainly in diabetic SHRs. Mitochondrial integrity was dramatically affected in the diabetic groups. The ARB treatment reestablished all of the above-mentioned parameters.

CONCLUSIONS—These findings suggest that concomitance of hypertension and diabetes exacerbates oxidative stress, neurodegeneration, and mitochondrial dysfunction in the retinal cells. These data provide the first evidence of AT₁ blockage as a neuroprotective treatment of diabetic retinopathy by reestablishing oxidative redox and the mitochondrial function. *Diabetes* 58:1382–1390, 2009

Diabetic retinopathy is a vision-threatening disease presenting neurodegenerative features associated with extensive vascular changes. At present, there is no established neuroprotective treatment that avoids visual disturbance in patients with diabetes. Earlier studies have focused on improving glycemic control for prevention and treatment of diabetic retinopathy (1,2). However, with the publication of EURODIAB EUCLID (Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes) (3) and U.K. Prospective Diabetes Study results (1), controlling blood pressure and, specifically, interference in the renin-angiotensin system have emerged as important strategies for treating diabetic retinopathy. More recently, DIRECT (Diabetic Retinopathy Candesartan Trial), a randomized double-blind placebo-controlled study with type 1 or type 2 diabetic patients into daily placebo or 32 mg candesartan groups, an angiotensin II receptor blocker (4,5), showed the importance of the renin-angiotensin system in diabetic retinopathy. In patients with type 1 diabetes, candesartan had a mild effect on reducing the incidence of retinopathy by 18%, and in post hoc analyses, candesartan reduced the incidence of retinopathy by three or more steps by 35%. In patients with type 2 diabetes, treatment with candesartan decreased the progression of retinopathy by 34% in participants with early retinopathy. These data showed that the potential benefits of the angiotensin II type 1 (AT₁) receptor blocker (ARB) candesartan might be seen in early stages of diabetic retinopathy.

Previous studies had demonstrated the presence of all renin-angiotensin system components in the retina (6,7). Clinical studies by Funatsu et al. (8) have showed increased angiotensin II levels in vitreous specimens of diabetic patients with retinopathy, demonstrating that the renin-angiotensin system is activated in diabetic retinopathy. Besides the vascular effects of renin-angiotensin system components, a mechanism of neuronal dysfunction involving this system was described in the diabetic retina in vivo and in vitro through phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, downregulating synaptophysin, the major synaptic vesicle protein (9).

Diabetes increases oxidative stress, which plays a key regulatory role in the development of its complications (10,11). Reactive oxygen species (ROS) generated by high glucose are considered a causal link between elevated glucose and the pathways of development of diabetic complications (12). In the retina, mitochondrial dysfunction

From the Renal Pathophysiology Laboratory, Investigation on Complications of Diabetes, Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Jacqueline M. Lopes de Faria, jmlfaria@fcm.unicamp.br. Received 4 February 2009 and accepted 4 March 2009. Published ahead of print at <http://diabetes.diabetesjournals.org> on 16 March 2009. DOI: 10.2337/db09-0166.

K.C.S. and M.A.B.R. contributed equally to this work. © 2009 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

TABLE 1
Physiological parameters evaluated monthly in each of the studied groups

	<i>n</i>	Weeks	Body weight (g)	SBP (mmHg)	Glycemia (mmol/l)
Control WKY rats	27	0	372 ± 29	125 ± 4	8.9 ± 1.2
Diabetic WKY rats	30	0	368 ± 37	126 ± 6	35 ± 5.8*
Control SHR	26	0	252 ± 22†	188 ± 15‡	8.6 ± 1.0
Diabetic SHR	31	0	248 ± 15†	189 ± 13‡	36.2 ± 5.7*
Diabetic SHR with losartan	25	0	253 ± 14†	189 ± 11‡	36.4 ± 5.8*
Control WKY rats	27	4	419 ± 26	126 ± 8	10.1 ± 1.5
Diabetic WKY rats	30	4	351 ± 19§	123 ± 2	37 ± 5.4*
Control SHR	26	4	299 ± 44	190 ± 11‡	9.7 ± 1.8
Diabetic SHR	31	4	235 ± 47§	191 ± 9‡	36.8 ± 5.9*
Diabetic SHR with losartan	25	4	247 ± 36§	136 ± 6	37.2 ± 5.2*
Control WKY rats	27	8	489 ± 33	126 ± 1	9.9 ± 1.8
Diabetic WKY rats	30	8	357 ± 25§	121 ± 4	37 ± 7.1*
Control SHR	26	8	325 ± 33	192 ± 13‡	10.1 ± 1.4
Diabetic SHR	31	8	229 ± 30§	194 ± 15‡	37.9 ± 6.0*
Diabetic SHR with losartan	25	8	238 ± 27§	135 ± 8	37.9 ± 6.1*
Control WKY rats	27	12	519 ± 40	124 ± 6	10.8 ± 1.7
Diabetic WKY rats	30	12	372 ± 52§	121 ± 6	38.0 ± 6.2*
Control SHR	26	12	334 ± 25	194 ± 17‡	10.3 ± 1.5
Diabetic SHR	31	12	210 ± 27§	197 ± 20‡	38.7 ± 6.1*
Diabetic SHR with losartan	25	12	223 ± 28§	135 ± 7	37.8 ± 6.3*

**P* < 0.0001 vs. respective control groups; †*P* < 0.0001 vs. WKY group; ‡*P* < 0.0001 vs. WKY groups and diabetic SHR treated with the ARB losartan; §*P* < 0.0001 vs. respective control groups.

tion is present in hyperglycemic conditions and is an important source of superoxide production (12,13). Recently, our group has demonstrated that there is an increase in superoxide retinal production in diabetic spontaneously hypertensive rats (SHR) concomitant with a decrease in reduced GSH, an important antioxidant system present in the retina (14). As a consequence, extensive retinal oxidative damage, evaluated by retinal tyrosine nitration and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), was observed (14).

Oxidative stress may lead to cell death (15) via apoptotic means, and it is widely known that apoptosis of retinal cells is a consummated phenomenon in diabetic retinopathy. Retinal capillary cells undergo accelerated apoptosis, which precedes the detection of any histopathological changes characteristic of diabetic retinopathy (16). The retinal vascular changes present in the retina from diabetic models were well documented (17,18), but some investigators have demonstrated profound retinal abnormalities, evaluated by electroretinography, and potential visual changes evoked before the onset of the first vascular change is detectable in the diabetic retina (19,20). In this regard, it has been recently reported that both apoptosis and glial activation, two characteristic features of retinal neurodegeneration, are present in the retinas of diabetic donors free of microvascular abnormalities according to the ophthalmoscopic examinations performed in the preceding 2 years (21,22). In view of the good evidence suggesting that the protective benefits of renin-angiotensin system inhibition extend beyond blood pressure control, the aim of the current study was to determine whether hypertension exacerbates oxidative stress-induced neuronal damage in the diabetic retina and whether treatment with the ARB losartan abrogates retinal neurodegeneration in diabetic hypertensive rats.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

The protocol complies with the guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and the Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research (ARVO), and it was approved by the local committee for ethics in animal research (CEEA/IB/Unicamp). The SHR and normotensive control Wistar Kyoto (WKY) rats used were provided by Taconic (Germantown, NY) and bred in our animal facility. The rats were housed at a constant temperature (22°C) on a 12-h light/dark cycle with ad libitum access to food and tap water.

Experimental diabetes was induced in 12-week-old hypertensive male SHR and WKY rats with a single intravenous injection of streptozotocin (50 mg/kg in sodium citrate buffer, pH 4.5; Sigma, St. Louis, MO). From the day after diabetes induction, the diabetic SHR were randomly assigned to receive no antihypertensive treatment or to be treated with the ARB losartan (200 mg/l; Merck Sharp & Dome Farmaceutica, São Paulo, Brazil) in drinking water. During the study, diabetic rats received 2 units of insulin (human insulin HI-0310; Lilly) three times per week subcutaneously to promote survival and prevent ketoacidosis. Control rats received only vehicle. Blood glucose levels were measured by the colorimetric GOD-PAP assay (Merck, Darmstadt, Germany). Values ≥15 mmol/l were indicative of diabetes. Systolic blood pressure (SBP) was obtained by tail-cuff plethysmography (Physiograph MK-III-S; Narco Bio-System, Houston, TX) as previously reported (14). Body weight, blood glucose levels, and SBP were measured at 0, 4, 8, and 12 weeks of duration of diabetes. At 12 weeks after diabetes induction, the rats were killed, and the retinas in one eye were detached from the retinal pigmented epithelium cell layer and used for protein extraction or colorimetric assays; the other eye was used for immunohistochemical or immunofluorescence assays.

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling. To determine whether retinal cell apoptosis was influenced by diabetes or rat strain, the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) method for detecting DNA breaks in situ was applied to retinal tissue. After quenching endogenous peroxidase, the sections were rinsed in One-Phor-All buffer (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) and incubated with TdT (Amersham Pharmacia Biotech) and biotinylated dUTP (Gibco/BRL, Life Technologies, Grand Island, NY) in TdT buffer. Labeled nuclei were detected with ABC Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and diaminobenzidine tetrahydrochloride/chloride/hydrogen peroxide and counterstained with hematoxylin. As a positive control, some slides were treated with DNase (Sigma). The quantitative analysis for TUNEL-positive cells was performed by an observer with no knowledge of the studied groups and expressed as the number of positive cells per retinal section.

Double-immunofluorescence for caspase-3 and glial fibrillary acidic protein or nestin to identify the cell type origin. The eyes were enucleated and fixed with 4% paraformaldehyde, cryoprotected in 30% sucrose in phosphate buffer, frozen in embedding medium (OCT; Sakura Finetek, Torrance, CA), and cut perpendicularly to the vitreal surface. The slides were blocked with BSA and the sections were stained with both primary antibodies to polyclonal cleaved caspase-3 (1:10; Cell Signaling), a marker of apoptosis, and polyclonal anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody (1:10; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for Müller glial cell or anti-rat nestin monoclonal antibody (1:10; BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) for neural cell identification. The sections were then incubated with the appropriate secondary antibodies. Afterwards, the sections were rinsed and cover-slipped with Vectashield antifading medium containing 4',6'-diamino-2-phenylindole used for nuclei staining (Vector). The sections were examined with a confocal laser scanning microscope (LSM510; Zeiss) using appropriate emission filters. Digital images were captured using specific software (LSM; Zeiss).

Immunofluorescence for GFAP for estimation of glial reaction on retinal tissue. The immunofluorescence labeling of GFAP was performed as described above in double-immunofluorescence staining assay. The sections were examined using an Olympus BX51 fluorescence microscope. Digital images were captured using specific software (Image Pro Express 6.0). The GFAP analyses were determined using the public domain program Image J (National Institutes of Health, available online at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The semiquantitative analyses were performed as mentioned above in TUNEL assay. The fluorescence of GFAP was expressed as the percentage of fluorescence per millimeter squared of retina.

Detection of superoxide anion production in retinal tissue. Lucigenin (bis-N-methylacridinium nitrate; Invitrogen, Eugene, OR) was used to measure superoxide anion production (23). Briefly, the retinas were isolated and placed into tubes containing RPMI-1640 medium (Gibco/BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD) at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO₂. Then, 25 μmol/l of lucigenin was added, and photon emission was measured over 10 s; repeated measurements were made over a 3-min period using a luminometer (TD 20-E; Turner). Superoxide production was expressed as the relative luminescence units (RLU) per minute per milligram protein. Protein concentration was measured using the Bradford method (24) using BSA standard.

Determination of reduced glutathione levels in the retina. Retinal glutathione (GSH) levels were measured using a method described previously (25), with a few modifications described previously (14). The absorbance was read at 412 nm and the GSH concentration expressed as micromoles per liter GSH per microgram of retinal protein. GSH was used as an external standard for preparation of a standard curve.

Immunohistochemistry for nitrotyrosine and 8-OHdG in retinal slides. Briefly (14), after quenching endogenous peroxidase, the sections were incubated with nonfat milk. Tissue sections were incubated with polyclonal rabbit anti-nitrotyrosine antibody (Upstate Cell Signaling Solutions, Lake Placid, NY) and a mouse monoclonal anti-8-OHdG antibody (1:50, N45.1; Japan Institute for the Control of Aging). Afterwards, secondary appropriated antibodies were applied to the sections. Labeled nuclei were detected as described above in the section on immunohistochemistry for TUNEL. Staining was performed, omitting the primary antibody for negative controls. For nitrotyrosine, quantitative analyses were performed as a positivity percentage in all retinal layers, grading from 0 for no positivity to 4 for ≥80% of positivity (14). The 8-OHdG analyses were determined using the public domain program Image J (National Institutes of Health) and expressed by percentage of positivity per retinal field. Semiquantitative analyses were performed as described above in the section on GFAP immunofluorescence assay.

Western blotting analysis for Bcl-2 protein. The retinas were lysed in a buffer containing 2% SDS and 60 mmol Tris-HCl (pH 6.8) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Complete; Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN). After centrifugation, the protein concentrations were measured by the Bradford method. For analysis, 100 μg of total retinal protein was loaded into SDS polyacrylamide gels. Molecular weight markers (Rainbow; Amersham Pharmacia) were used as standards. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA). Membranes were blocked in nonfat milk, incubated with primary antibody (rabbit polyclonal anti-Bcl-2; Santa Cruz), subsequently incubated with goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP) secondary antibody, and developed by 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. Equal loading and transfer were ascertained by reprobing the membranes for β-actin.

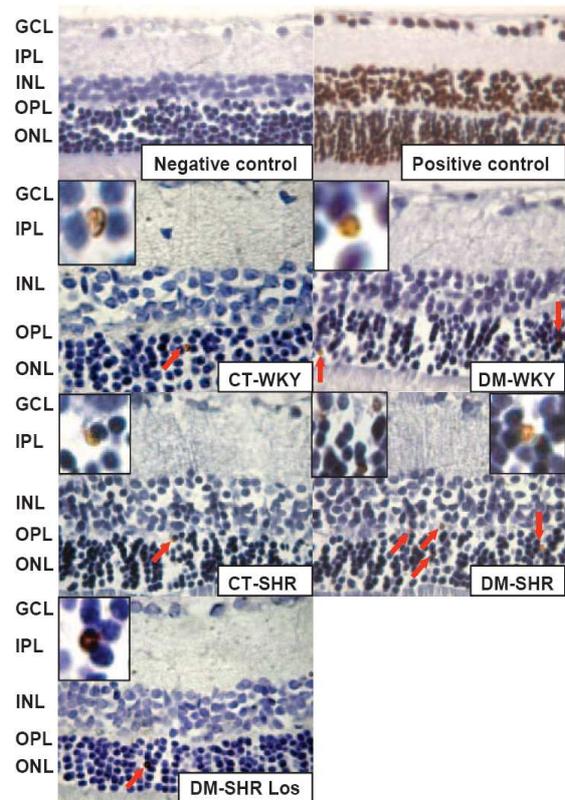
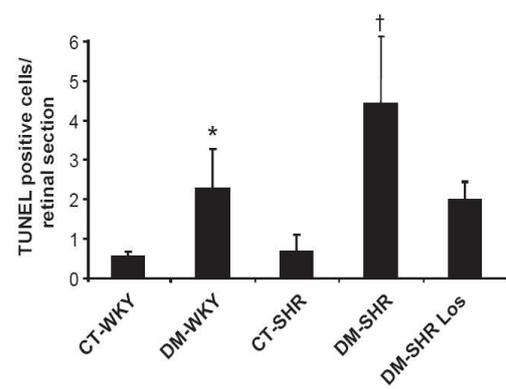


FIG. 1. A: A representative immunohistochemical identification of TUNEL-positive cells in the retinal sections of control and diabetic WKY rats and SHRs and losartan-treated diabetic SHRs. The positive controls were retinal slides treated with DNase. The majority of positive cells were localized in the outer nuclear layer of the retina, indicating, therefore, that the photoreceptors are the most affected cells. **B:** Summary of the number of TUNEL-positive cells per retinal section (0.5 ± 0.1 vs. 2.3 ± 0.9 positive cells per retinal section for control WKY vs. diabetic WKY rats, $P = 0.03$; 2.3 ± 0.9 vs. 4.4 ± 2.0 positive cells per retinal section for diabetic WKY rats vs. diabetic spontaneously hypertensive rats, $P = 0.01$; 0.6 ± 0.3 vs. 4.4 ± 2.0 positive cells per retinal section, control spontaneously hypertensive vs. diabetic spontaneously hypertensive, $P = 0.0003$; 4.4 ± 2.0 vs. 2.0 ± 0.4 positive cells per retinal section for diabetic spontaneously hypertensive vs. diabetic spontaneously hypertensive-losartan, $P = 0.01$). * $P = 0.03$; † $P = 0.01$. CT, control; DM, diabetic; GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; Los, losartan; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer. (A high-quality digital representation of this figure is available in the online issue.)

Immunoprecipitation of retinal protein extract for mitochondrial uncoupling protein-2. The retinas were lysed directly with buffer A containing 100 mmol/l Tris, 10 mmol/l sodium pyrophosphate, 100 mmol/l sodium

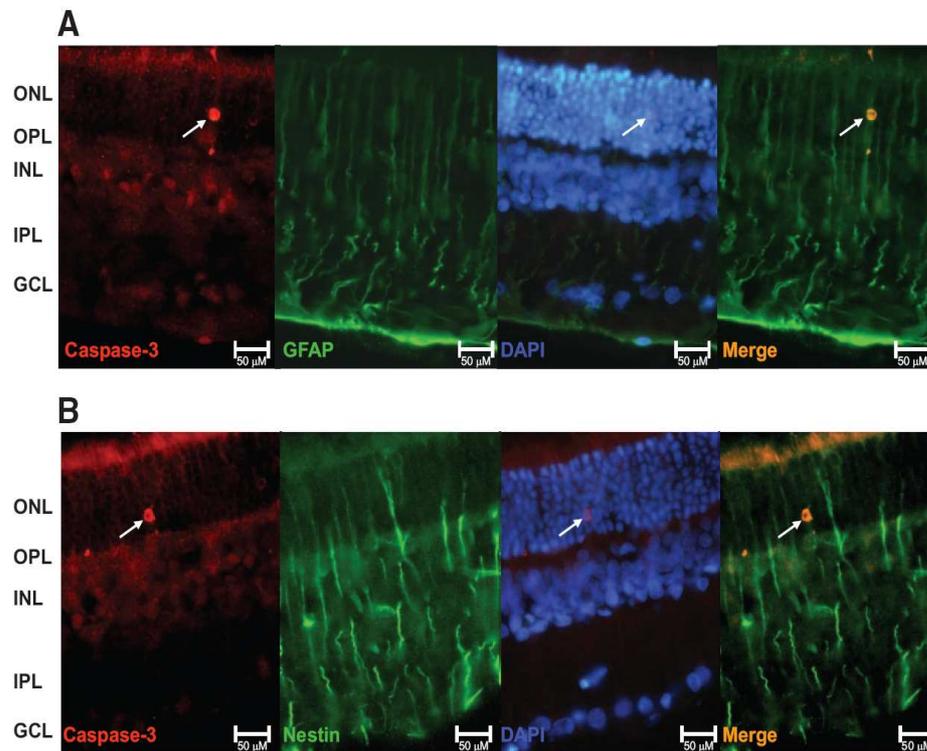


FIG. 2. *A*: Retinal section with a caspase-3–positive cell colabeled with GFAP antigen localized on outer nuclear layer, as indicated by the arrow. This is indicative of the glial nature of the apoptotic cell. *B*: Caspase-3–positive cell expressing the intermediate filament nestin in the outer nuclear layer of the retina, demonstrating the neural origin of the indicated cell. Scale bars = 50 μ m. Both double-labeling immunofluorescence assays were performed in retinal tissue obtained from diabetic hypertensive rats because of its higher number of TUNEL-positive cells observed. DAPI, 4',6'-diamino-2-phenylindole; GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer. (A high-quality digital representation of this figure is available in the online issue.)

fluoride, 10 mmol/l EDTA, 2 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mmol/l sodium ortovanadate, and 1% Triton X-100. The protein concentrations were measured by the Bradford method (24). Samples containing 1 mg of total protein were incubated with antibody goat polyclonal IgG uncoupling protein-2 (UCP-2; Santa Cruz) overnight, followed by the addition of protein A Sepharose for 1 h. After centrifugation, the pellets were repeatedly washed in buffer C (100 mmol/l Tris, 10 mmol/l sodium vanadate, 10 mmol/l EDTA, and 1% Triton X-100). For immunoblotting, 400 μ g of protein was loaded into 5% glycerol/0.03% bromophenol blue/10 mmol dithiothreitol and then loaded onto 15% SDS polyacrylamide gels. Molecular weight markers were used as standards. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad), and the membranes were blocked in nonfat milk and then incubated with primary antibody goat polyclonal IgG UCP-2 (1:500). The blots were subsequently incubated with secondary antibody donkey anti-goat IgG HRP and developed using a chemiluminescence method. Equal loading and transfer were ascertained by Ponceau S staining.

Statistical analysis. The results are expressed as the means \pm SD. The groups were compared by one-way ANOVA, followed by the Fisher protected least-significant difference test. StatView statistics software for Macintosh was used for all comparisons with a significance value of $P < 0.05$.

RESULTS

Physiological characteristics of the studied groups.

The final body weight was lower after streptozotocin injection in both WKY and SHR ($P < 0.0001$), and it was not affected by treatment with losartan in diabetic SHR. As expected, SBP was significantly higher in SHR than in WKY rats, and it was reduced in the treated SHR ($P < 0.0001$). Blood glucose levels were higher in diabetic rats compared with nondiabetic groups, and these were not modified by ARB treatment ($P < 0.0001$) (Table 1).

TUNEL staining is modified by diabetes or rat strain.

TUNEL staining was a rare event in the retina from control rats. After 12 weeks of diabetes in WKY rats, an increment of retinal cells staining positive for TUNEL was observed ($P = 0.03$). The diabetic SHR exhibited an increased number of TUNEL-positive cells in the retina compared with diabetic WKY rats ($P = 0.01$) and control SHR ($P = 0.0003$). Losartan significantly reduced the number of TUNEL-positive cells in all retinal layers compared with diabetic SHR ($P = 0.01$) (Fig. 1).

Identification of apoptotic cell type. To further characterize the apoptotic cells in the retina of adult rats, we labeled retinal sections for GFAP and nestin. A caspase-3–positive cell colabeled with the GFAP marker was observed (Fig. 2A), and another caspase-3–positive cell expressed nestin (Fig. 2B); both cells were in the outer nuclear layer. These findings indicate that the apoptotic retinal cells are of glial and neural origin.

Immunofluorescence for detection of glial reactivity induced by diabetes and hypertension.

Retinal glial reaction, demonstrated by a local increase in GFAP expression, is an early marker in the pathogenesis of diabetic retinopathy (26). In the retina of control WKY rats, GFAP positivity is minimally apparent. In contrast, after diabetes induction there was an accentuated increase in glial reactivity ($P < 0.0001$). Similarly observed in diabetic WKY rats, there was a moderate glial reaction throughout the retina in control SHR ($P = 0.4$), and the concomitance of both diabetes and hypertension extensively exacerbated

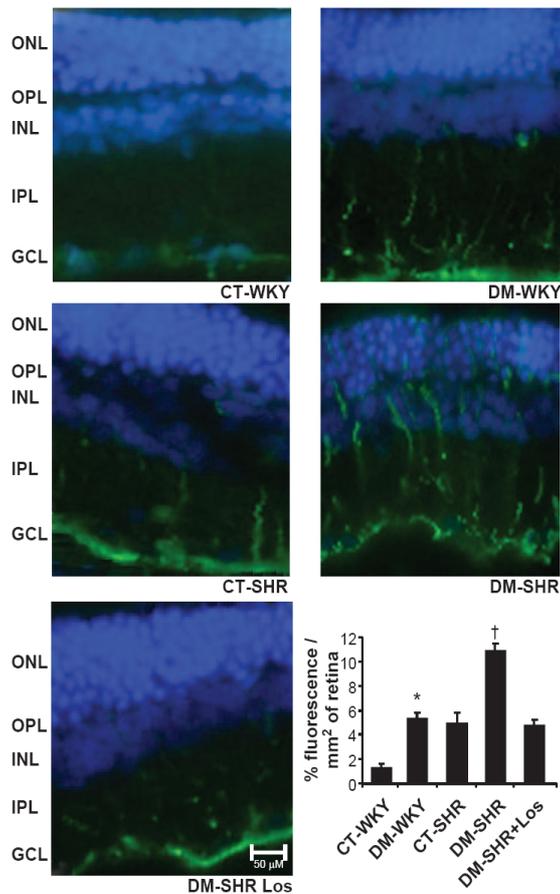


FIG. 3. Evaluation of glial cell reactivity by GFAP immunofluorescence in retinas of control and diabetic WKY and spontaneously hypertensive rats. The presence of diabetes or hypertension alone induced a clear increase in GFAP immunoreactivity throughout the retina. The concomitance of both provoked a further increase in glial reactivity, and the losartan treatment abolished this effect. Bars = means \pm SD of percentage of fluorescence per millimeter squared of retina. Scale bars = 50 μ m. The graph shows 1.3 ± 0.3 vs. $5.3 \pm 0.5\%$ of fluorescence/ mm^2 of retina for control WKY vs. diabetic WKY rats, $*P < 0.0001$; 5.3 ± 0.5 vs. $4.9 \pm 0.08\%$ of fluorescence/ mm^2 of retina for diabetic WKY rats vs. control SHR, $P = 0.4$; 4.9 ± 0.08 vs. $10.8 \pm 0.5\%$ of fluorescence/ mm^2 of retina for control SHR vs. diabetic SHR, $\dagger P < 0.0001$; 10.8 ± 0.5 vs. $4.7 \pm 0.5\%$ of fluorescence/ mm^2 of retina for diabetic SHR vs. diabetic losartan (Los)-treated SHR, $\ddagger P < 0.0001$. CT, control; DM, diabetic; GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer. (A high-quality digital representation of this figure is available in the online issue.)

the GFAP staining in retinal tissue ($P < 0.0001$). The treatment prevented the retinal glial reaction seen in diabetic SHRs, which remained similar to control levels ($P < 0.0001$) (Fig. 3).

Superoxide anion production and GSH levels. After 12 weeks of diabetes, a significant increase of superoxide anion production was observed in diabetic WKY rats compared with the control WKY rats (0.9 ± 0.3 vs. 2.0 ± 0.8 RLU \cdot min $^{-1}$ \cdot mg protein $^{-1}$, $P = 0.03$), and the concomitance of diabetes and hypertension exacerbated the superoxide production compared with the other groups ($P = 0.0002$). To identify the source of superoxide production, we used diphenyliodonium, an inhibitor of flavin-containing oxidases, and rotenone, an inhibitor of

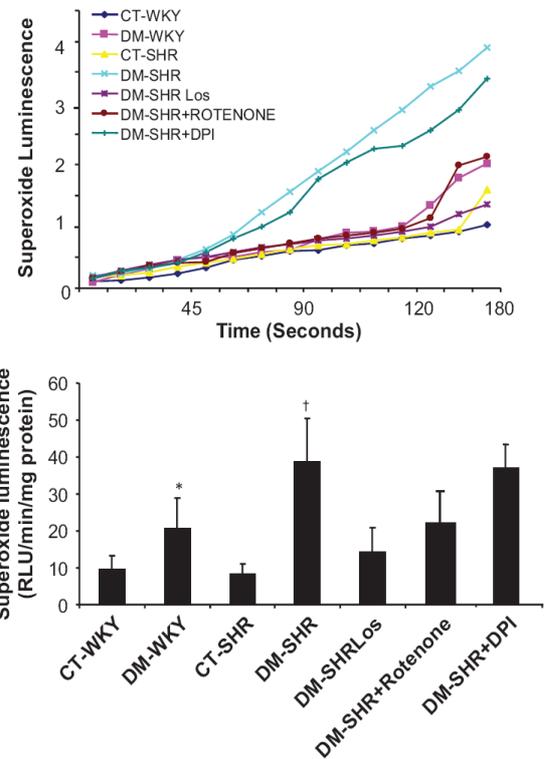


FIG. 4. Total superoxide generation in retinal tissue. Superoxide anion generation of retinal tissue was determined by the lucigenin-enhanced chemiluminescence method, and photoemission was measured every 10 s for 3 min. The peak level of superoxide generation was observed ~ 3 min after lucigenin was added to the reaction buffer containing retina from different groups. Diabetes increased superoxide production (RLU \cdot min $^{-1}$ \cdot mg protein $^{-1}$) in the retina, and the concomitance of diabetes and hypertension further exacerbated this parameter. The presence of diphenyliodonium (20 μ mol/l), an inhibitor of flavin-containing oxidases, did not affect superoxide production, whereas preincubation with rotenone (100 μ mol/l) resulted in a marked reduction in superoxide production from retinal tissue. This indicates that mitochondria are an important source of the superoxide in retina tissue. Treatment with the ABR losartan reduced superoxide production to levels observed in the control groups. Bars are the means \pm SD. $*P = 0.03$ vs. control WKY; $\dagger P = 0.0002$ vs. other groups. CT, control; DM, diabetic; DPI, diphenyliodonium.

complex I of the mitochondrial respiratory chain, in vials containing retina from diabetic SHRs. Preincubation of the retinal tissue with diphenyliodonium (20 μ mol/l) did not affect superoxide production, whereas preincubation with rotenone (100 μ mol/l) resulted in a marked reduction in superoxide production. This indicates that mitochondria are an important source of the superoxide in retinal tissue (Fig. 4A). Therefore, we evaluated the effect of the treatment with losartan on retinal superoxide production. It was observed that the ARB restored the superoxide production in retina in diabetic SHRs to control WKY levels ($P = 0.0003$) (Fig. 4B).

Antioxidant defense was examined using the quantitative measurement of GSH levels in the retinal tissue; it was diminished in diabetic WKY rats compared with control WKY rats, but not significantly ($P = 0.1$). However, the concomitance of diabetes and hypertension led to a marked diminution in GSH concentration (~ 2.5 -fold decrease) compared with control SHRs ($P = 0.0005$). The treatment with losartan reestablished this parameter to control SHR levels ($P = 0.006$) (Fig. 5).

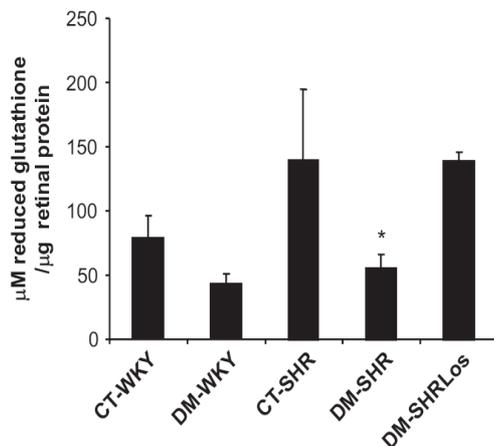


FIG. 5. Concentration of reduced GSH from retinas of control and diabetic WKY and SHR rats and treated diabetic SHRs ($\mu\text{mol/l}$ GSH per μg of retinal protein). There was a significant decrease in GSH levels in diabetic SHRs compared with control SHRs; the ARB treatment in diabetic hypertensive rats prevented this reduction. Bars = means \pm SD (79 ± 17 vs. 43 ± 7 $\mu\text{mol/l}$ reduced GSH per μg retina protein for control WKY vs. diabetic WKY rats, $P = 0.1$; 140 ± 54 vs. 56 ± 10 $\mu\text{mol/l}$ reduced GSH per μg retina protein for control SHRs vs. diabetic SHRs, $P = 0.0005$). * $P = 0.006$. CT, control; DM, diabetic; Los, losartan.

Diabetes elevated the nitrosative imbalance and was prevented by ARB treatment in diabetic SHRs.

The nitration of tyrosine, an effect of peroxynitrite on proteins, was assessed by nitrotyrosine expression. The immunohistochemistry for nitrotyrosine showed stronger staining throughout retinal layers in diabetic WKY rats and control SHRs compared with control WKY rats ($P < 0.0001$ and $P = 0.0003$, respectively). The presence of diabetes alone showed an increment in nitrotyrosine values compared with hypertension alone ($P = 0.004$). The concomitance of diabetes and hypertension further increased nitrotyrosine expression in all retinal layers compared with other groups ($P = 0.001$). Losartan completely reestablished retinal nitrosative status in the retinas of diabetic SHRs ($P < 0.0001$). These findings suggest that losartan protects the retinal tissue against nitrosative stress in diabetic SHRs (Fig. 6A).

Oxidative DNA damage in diabetic SHR retina was prevented by treatment with losartan. The distribution of positive 8-OHdG, a marker of oxidative damage on nucleic acids, was heterogeneous in retinal tissue, presenting higher positivity in the outer nuclear layer of diabetic WKY rats and in all cellular layers of diabetic SHRs. The presence of diabetes or hypertension alone induced a significant increment in 8-OHdG-positive cells in retinal tissue compared with the control WKY group ($P = 0.003$). The concomitance of both resulted in a marked increase in oxidative DNA damage compared with control SHRs ($P < 0.0001$). Similarly, as observed with nitrotyrosine, losartan significantly protected the retinal cells against DNA damage ($P < 0.0001$) (Fig. 6B).

Diabetes induced retinal mitochondrial dysfunction and was prevented by losartan. The overexpression of Bcl-2 mitochondrial protein inhibits the release of cytochrome c into the cytosol, protecting the cells against early death (27). Therefore, the estimation of Bcl-2 may be indicative of mitochondrial involvement in the apoptotic cascade. The expression of Bcl-2 in total retinal lysates was decreased in both diabetic groups when compared

with the controls ($P = 0.01$) and reestablished in diabetic SHRs treated with losartan (Fig. 7A).

UCP-2 expression reflects the mitochondrial energy metabolism and might play a role in retinal neurodegeneration (28). Similarly, as observed in Bcl-2 protein, the expression of UCP-2 was diminished in both diabetic groups compared with the respective control groups ($P = 0.03$), and it was restored to the levels of the control groups in losartan-treated diabetic SHRs ($P = 0.04$) (Fig. 7B).

DISCUSSION

The ARB used in the treatment of hypertension exerts a variety of pleiotropic effects, including antioxidant, anti-apoptotic, and anti-inflammatory effects (29). However, the possible antioxidant/antiapoptotic effects of ARB in the diabetic retina have never been addressed. In the current study, we investigated the potential effect of the losartan on retinal neurodegeneration in a model that combines diabetes and hypertension. We observed that the apoptotic rate was higher in the retina of diabetic SHRs compared with control WKY rats, and the cells exhibited neural and glial characteristics, as demonstrated by specific antigens. The oxidative imbalance, characterized by an increase in superoxide production and a decrease in reduced GSH levels in retinal tissue, was higher in diabetic rats and accentuated in diabetic SHRs in the presence of mitochondrial involvement, as demonstrated by decreased expression of Bcl-2 and UCP-2 mitochondrial proteins. Losartan treatment led to amelioration of the apoptotic rate in neural and glial retinal cells, reestablishment of redox status by decreasing superoxide production and improving the antioxidative enzymatic system GSH, and restoration of mitochondrial protein expression levels. Therefore, the ARB seemed to offer neural protection, including antiapoptotic and antioxidant benefits, in the retina of diabetic hypertensive rats.

The increased number of TUNEL-positive cells detected in the retinas of diabetic SHRs occurred mainly in the outer nuclear layer, and this may contribute to widespread retinal dysfunction. In line with previous studies of electroretinography, Phipps et al. (30) demonstrated a significant reduction in the rod photoreceptor response in diabetic Ren-2 rats compared with nondiabetic Ren-2 rats, which in turn translated losses to b-wave and oscillatory potentials. Other studies had confirmed that rod photoreceptors are the primary retinal neuron affected by diabetes (31,32). The photoreceptors are most vulnerable to oxidative damage because of the high content of polyunsaturated fatty acids in their membranes; oxidative stress may cause lipid peroxidation reactions (33) and therefore damage their structure and function. In this study, we observed glial reactivity, as evaluated by GFAP immunoreactions, but not apoptosis of photoreceptor, as evaluated by TUNEL, in hypertensive rats. This is explained by the fact that glial cells and photoreceptors are damaged by oxidative stress through different mechanisms. The glial cells possess mechanisms providing high intracellular GSH concentration (34). Depending on the insult, the depletion of GSH in glial cells and the subsequent heme oxygenase-1 induction (35) is associated with the production of bilirubin, a potent free radical scavenger (36), and with the reduction of heme, a powerful pro-oxidant (37). One reason for this is that Müller cells provide metabolic

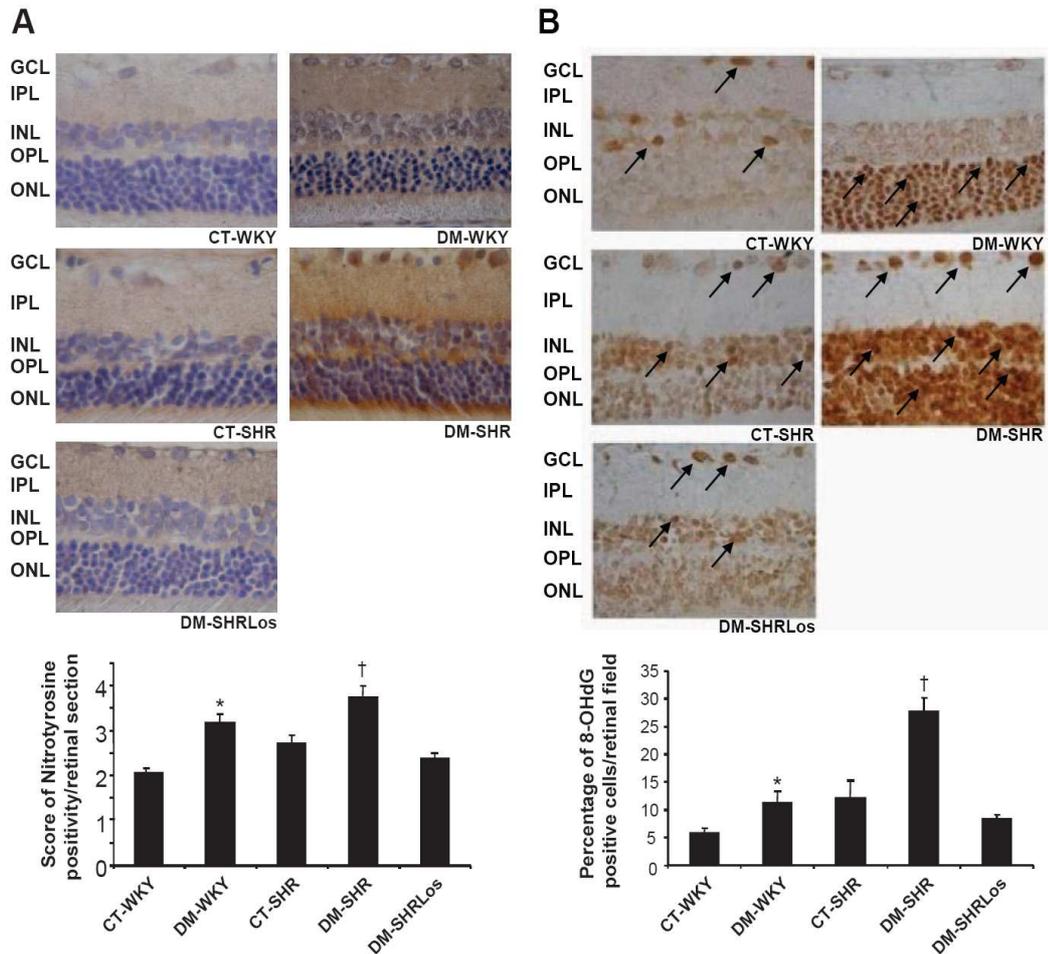


FIG. 6. *A*: Representative photomicrograph of immunolocalization of nitrotyrosine in control and diabetic WKY and SHRs and diabetic SHRs treated with losartan. The presence of nitrotyrosine is indicated by the brown color, and the positivity is diffuse. Bars represent the means \pm SD of score of positivity of nitrotyrosine per retinal section, as defined in RESEARCH DESIGN AND METHODS. Diabetes increased tyrosine nitration in retinal tissue, and concomitance of diabetes and hypertension exacerbates this phenomenon. A significant reduction was observed in treated diabetic SHRs. The graph shows 2.0 ± 0.1 vs. 3.2 ± 0.2 score of positivity for control WKY vs. diabetic WKY rats, $*P < 0.0001$; 2.0 ± 0.1 vs. 2.7 ± 0.2 score of positivity for control WKY vs. control SHRs, $P = 0.0003$; 3.2 ± 0.2 vs. 2.7 ± 0.2 score of positivity for diabetic WKY rats vs. control SHRs, $P = 0.004$. $\dagger P = 0.001$ vs. other groups. *B*: Representative photomicrograph of immunohistochemistry for 8-OHdG from retinas of control and diabetic WKY and SHRs and diabetic SHRs treated with losartan. Bars represent the means \pm SD of percentage of positive 8-OHdG retinal cells per retinal field, as defined in RESEARCH DESIGN AND METHODS. The presence of 8-OHdG is indicated by the brown color, and the positivity is in the nucleus of the cells. The presence of diabetes or hypertension separately increased the oxidative DNA damage in retinal cell layers, and concomitance of both induced a markedly pronounced effect; the antihypertensive treatment with ARB promoted significant neuroprotection of retinal tissue, abolishing this damage. All the retinal layers were included in the quantitation for both proteins. $*P = 0.003$ vs. control WKY; $\dagger P < 0.0001$ vs. other groups. CT, control; DM, diabetic; GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; Los, losartan; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer. (A high-quality digital representation of this figure is available in the online issue.)

support to adjacent neural cells, providing protective mechanisms for photoreceptors.

Previous studies demonstrated that local angiotensin II expression was extremely elevated during retinal inflammation, thereby influencing the condition of the retinal neural and vascular cells through AT_1 receptor signaling. The ARB was effective in keeping the retinal neural cells from losing their physiological activities and normal electroretinography responses; therefore, the ARB plays a key role in neuroprotection, and it preserves good visual function by reducing inflammatory reactions in the retinal neural and vascular cells, preventing the development of diabetic retinopathy (7,38). This treatment also reduced the accumulation of one of the advanced glycation end products as well as vascular endothelial growth factor

expression in a model of type 2 diabetes (39). Other studies also showed that treatment with ARBs in hypertensive diabetic Ren-2 rats prevented acellular capillary and endothelial cell proliferation as well as development of neuronal deficits in diabetes, namely loss of function in photoreceptors and neurons, independent of controlling hypertension (30,40). These findings support the concept that ARBs may be useful as a therapeutic target for diabetic retinopathy. Although in this study we did not treat the diabetic SHRs with another antihypertensive drug that does not act on the renin-angiotensin system, to avoid the hypotensive effect of the losartan treatment, the normotensive diabetic WKY rats still had markers of oxidative stress and mitochondrial dysfunctions that were not present in diabetic SHRs treated with losartan.

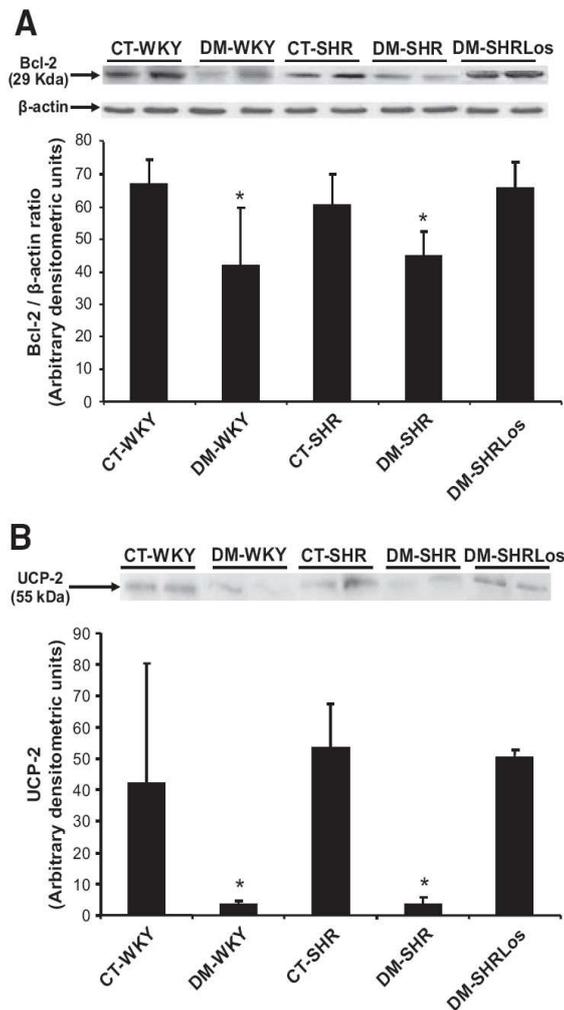


FIG. 7. *A*: Western blot analysis of Bcl-2 in total retinal lysates of the studied groups; the bars represent the means \pm SD of band densities expressed in arbitrary densitometric units from at least three independent experiments. * $P < 0.05$. *B*: Western blot analysis of UCP-2 in immunoprecipitated retinal protein of the studied groups. The bars represent the means \pm SD of band densities expressed in arbitrary densitometric units from at least three independent experiments. * $P = 0.03$. CT, control; DM, diabetic; Los, losartan.

The marked effect in reducing the oxidative damage in diabetic retinal tissue of hypertensive rats treated with losartan may be attributable to its antioxidant effect through ARB and an increase in nitric oxide (NO) bioavailability via the angiotensin II type 2 receptor (41). A recent study demonstrated that intravenous application of angiotensin II reduces plasma NO levels and increases the peroxynitrite concentration, which significantly increases nitrosative stress. Treatment with valsartan, an ARB similar to losartan, suppressed this effect (42). The question of how NO can attenuate oxidative damage is still intriguing. A previous study provided direct evidence that NO inactivates xanthine oxidase by reacting first with the superoxide anion to form peroxynitrite, which in turn reduces both xanthine oxidase activity and superoxide generation (43), thus reestablishing the oxidative status.

It was previously demonstrated that hyperglycemia-induced production of ROS is associated with the devel-

opment of diabetic microvascular complications (11) and that the normalization of mitochondrial superoxide production blocks the pathways of diabetic damage (44). Normalization of mitochondrial ROS production prevents pathways involved in the development of diabetic microvascular complications (44). In the current study, the blockage of mitochondria complex I using rotenone revealed a significant reduction in its superoxide production. This fact may be explained by the observation of diversity in electron chain transport components present in different neuron subpopulations, as demonstrated by a study where mitochondria from retinal ganglion cells decreased the superoxide production in response to rotenone (45).

Mitochondria are a major endogenous source and target of superoxide and hydroxyl radicals (46). Reactive oxidant intermediates can trigger mitochondria to release cytochrome c, resulting in activation of caspase-3 (27,46). Increasing evidence indicates that mitochondria are intimately associated with the initiation of apoptosis (47,48). In this study, mitochondrial integrity was evaluated by determining Bcl-2 and UCP-2 protein expressions. The mechanism that involves angiotensin II in mitochondrial ROS production is supported by the fact that in vivo preconditioning effects of angiotensin II for cardiac ischemia/reperfusion injury may be mediated by cardiac mitochondria-derived ROS enhanced by NAD(P)H oxidase (49). The superoxide production via NAD(P)H oxidase stimulates the opening of reconstituted mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels via a direct action on the sulfhydryl groups of this channel (50). Thus, the overstimulation of angiotensin II and renin-angiotensin system may account for mitochondrial dysfunction, in line with the observed effect that AT_1 blockage with losartan reestablished the UCP-2 and Bcl-2 contents in retinal tissue.

In summary, the findings of this study provides evidence for the first time of the benefits of the AT_1 blocker losartan in ameliorating diabetic retinal neurodegeneration, mitochondrial function, and oxidative balance.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) grants 04/00455-9 and 05/58189-5. K.C.S. was a recipient of a scholarship from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

The authors thank Dania E.H. Britto and Aline M. Faria for assistance in double-labeling immunofluorescence assays.

REFERENCES

1. UK Prospective Diabetes Study Group: Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *BMJ* 1998;317:703-713
2. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XVII. The 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes. *Ophthalmology* 1998;105:1801-1815
3. Chaturvedi N, Sjölie AK, Stephenson JM, Abrahamian H, Keipes M, Castellari A, Rogulja-Peponik Z, Fuller JH. Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes. The EUCLID Study Group. *EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*. *Lancet* 1998;351:28-31
4. Chaturvedi N, Porta M, Klein R, Orchard T, Fuller J, Parving HH, Bilous R, Sjölie AK; DIRECT Programme Study Group: Effect of candesartan on prevention (DIRECT-Prevent 1) and progression (DIRECT-Protect 1) of

- retinopathy in type 1 diabetes: randomised, placebo-controlled trials. *Lancet* 2008;372:1394–402
5. Sjölie AK, Klein R, Porta M, Orchard T, Fuller J, Parving HH, Bilous R, Chaturvedi N; DIRECT Programme Study Group. Effect of candesartan on progression and regression of retinopathy in type 2 diabetes (DIRECT-Protect 2): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2008;372:1385–1393
 6. Danser AH, van den Dorpel MA, Deinum J, Derckx FH, Franken AA, Peperkamp E, de Jong PT, Schalekamp MA. Renin, prorenin, and immunoreactive renin in vitreous fluid from eyes with and without diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:160–167
 7. Nagai N, Izumi-Nagai K, Oike Y, Koto T, Satofuka S, Ozawa Y, Yamashiro K, Inoue M, Tsubota K, Umezawa K, Ishida S. Suppression of diabetes-induced retinal inflammation by blocking the angiotensin II type 1 receptor or its downstream nuclear factor-kappaB pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4342–4350
 8. Funatsu H, Yamashita H, Nakanishi Y, Hori S. Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2002;86:311–315
 9. Kurihara T, Ozawa Y, Nagai N, Shinoda K, Noda K, Imamura Y, Tsubota K, Okano H, Oike Y, Ishida S. Angiotensin II type 1 receptor signaling contributes to synaptophysin degradation and neuronal dysfunction in the diabetic retina. *Diabetes* 2008;57:2191–2198
 10. 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
 11. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813–820
 12. Kowluru RA, Abbas SN. Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:5327–5334
 13. Boveris A. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol* 1977;78:67–82
 14. Pinto CC, Silva KC, Biswas SK, Martins N, Lopes de Faria JB, Lopes de Faria JM. Arterial hypertension exacerbates oxidative stress in early diabetic retinopathy. *Free Radic Res* 2007;41:1151–1158
 15. Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, Brownlee M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* 1998;47:1114–1120
 16. Mizutani M, Kern TS, Lorenzi M. Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *J Clin Invest* 1996;97:2883–2890
 17. Cogan DG, Toussaint D, Kuwabara T. Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1961;66:366–378
 18. Engerman RL, Kern TS. Retinopathy in animal models of diabetes. *Diabetes Metab Rev* 1995;11:109–120
 19. Bresnick GH, Korth K, Groo A, Palta M. Electroretinographic oscillatory potentials predict progression of diabetic retinopathy: preliminary report. *Arch Ophthalmol* 1984;102:1307–1311
 20. Lopes de Faria JM, Katsumi O, Cagliero E, Nathan D, Hirose T. Neurovisual abnormalities preceding the retinopathy in patients with long-term type 1 diabetes mellitus. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001;239:643–648
 21. Carrasco E, Hernández C, Miralles A, Huguet P, Farrés J, Simó R. Lower somatostatin expression is an early event in diabetic retinopathy and is associated with retinal neurodegeneration. *Diabetes Care* 2007;30:2902–2908
 22. Carrasco E, Hernández C, de Torres I, Farrés J, Simó R. Lowered cortistatin expression is an early event in the human diabetic retina and is associated with apoptosis and glial activation. *Mol Vis* 2008;14:1496–1502
 23. Li Y, Zhu H, Kuppusamy P, Roubaud V, Zweier JL, Trush MA. Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J Biol Chem* 1998;273:2015–2023
 24. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254
 25. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963;61:882–888
 26. Picaud S, Peichl L, Franceschini N. Dye-induced photolesion in the mammalian retina: glial and neuronal reactions. *J Neurosci Res* 1993;35:629–642
 27. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TL, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129–1132
 28. Cui Y, Xu X, Bi H, Zhu Q, Wu J, Xia X, Qiushi Ren, Ho PC. Expression modification of uncoupling proteins and MnSOD in retinal endothelial cells and pericytes induced by high glucose: the role of reactive oxygen species in diabetic retinopathy. *Exp Eye Res* 2006;83:807–816
 29. Jung KH, Chu K, Lee ST, Kim SJ, Song EC, Kim EH, Park DK, Sinn DI, Kim JM, Kim M, Roh JK. Blockade of AT1 receptor reduces apoptosis, inflammation, and oxidative stress in normotensive rats with intracerebral hemorrhage. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322:1051–1058
 30. Phipps JA, Wilkinson-Berka JL, Fletcher EL. Retinal dysfunction in diabetic ren-2 rats is ameliorated by treatment with valsartan but not atenolol. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:927–934
 31. Holopigian K, Greenstein VC, Seiple W, Hood DC, Carr RE. Evidence for photoreceptor changes in patients with diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:2355–2365
 32. Phipps JA, Fletcher EL, Vingrys AJ. Paired-flash identification of rod and cone dysfunction in the diabetic rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:4592–4600
 33. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74:139–162
 34. Kato S, Ishita S, Sugawara K, Mawatari K. Cysteine/glutamate antiporter expression in retinal Müller cells: implications for DL-aminoacidipate toxicity. *Neuroscience* 1993;57:473–482
 35. Ewing JF, Maines MD. Glutathione depletion induces heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA and protein in rat brain. *J Neurochem* 1993;60:1512–1519
 36. Stocker R, Peterhans E. Antioxidant properties of conjugated bilirubin and biliverdin: biologically relevant scavenging of hypochlorous acid. *Free Rad Res Commun* 1989;6:57–66
 37. Vincent SH. Oxidative effects of heme and porphyrins on proteins and lipids. *Semin Hematol* 1989;26:105–113
 38. Kurihara T, Ozawa Y, Shinoda K, Nagai N, Inoue M, Oike Y, Tsubota K, Ishida S, Okano H. Neuroprotective effects of angiotensin II type 1 receptor (AT1R) blocker, telmisartan, via modulating AT1R and AT2R signaling in retinal inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:5545–5552
 39. Sugiyama T, Okuno T, Fukuhara M, Oku H, Ikeda T, Obayashi H, Ohta M, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N. Angiotensin II receptor blocker inhibits abnormal accumulation of advanced glycation end products and retinal damage in a rat model of type 2 diabetes. *Exp Eye Res* 2007;85:406–412
 40. Wilkinson-Berka JL, Tan G, Jaworski K, Ninkovic S. Valsartan but not atenolol improves vascular pathology in diabetic Ren-2 rat retina. *Am J Hypertens* 2007;20:423–430
 41. Matsubara H. Pathological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal disease. *Circulation* 1998;83:1182–1191
 42. Imanishi T, Kobayashi K, Kuroi A, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K, Akasaka T. Effects of angiotensin II on NO bioavailability evaluated using a catheter-type NO sensor. *Hypertension* 2006;48:1058–1065
 43. Lee CI, Liu X, Zweier JL. Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite. *J Biol Chem* 2000;275:9369–9376
 44. Nishikawa T, Kukidome D, Sonoda K, Fujisawa K, Matsuhisa T, Motoshima H, Matsumura T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production on diabetic vascular complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77:S41–S45
 45. Hoegger MJ, Lieven CJ, Levin LA. Differential production of superoxide by neuronal mitochondria. *BMC Neurosci* 2008;9:4
 46. Sandbach JM, Coscun PE, Grossniklaus HE, Kokoszka JE, Newman NJ, Wallace DC. Ocular pathology in mitochondrial superoxide dismutase (Sod2)-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2173–2178
 47. Kowluru RA, Atasi L, Ho YS. Role of mitochondrial superoxide dismutase in the development of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:1594–1599
 48. Takahashi A, Masuda A, Sun M, Centonze VE, Herman B. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pHm). *Brain Res Bull* 2004;62:497–504
 49. Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, Shokoji T, Yao L, Fan YY, Rahman M, Abe Y. Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide. *Hypertension* 2005;45:438–444
 50. Zhang DX, Chen YF, Campbell WB, Zou AP, Gross GJ, Li PL. Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res* 2001;89:1177–1183

**Exogenous SOD mimetic tempol ameliorates the early retinal changes reestablishing
the redox status in diabetic hypertensive rats**

Mariana A.B. Rosales, Kamila C. Silva, José B. Lopes de Faria,

Jacqueline M. Lopes de Faria

Renal Pathophysiology Laboratory, Investigation on Complications of Diabetes,
Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas
(Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil

Running title: TEMPOL prevented the early markers of diabetic retinopathy

Abstract: 258 words

Main text: 4.735 words

Corresponding author: Jacqueline M. Lopes de Faria, MD, PhD

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

(Unicamp), Campinas, SP, Brazil; P.O. Box 6111. Phone: +55-19-35217499 /

Fax: +55-19-35217366; e-mail: jmlfaria@fcm.unicamp.br

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest.

This work was supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP)

under the grant numbers 05/58189-5 and 08/54068-7

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study is to investigate the efficacy of tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy), a superoxide dismutase (SOD) mimetic, in preventing the early retinal molecular changes in a model that combines hypertension and diabetes.

Methods: Four-week-old spontaneously hypertensive rats (SHR) were rendered diabetic by streptozotocin. Diabetic SHR rats (DM-SHR) were randomized to receive or not receive tempol treatment. After 20 days of induction of diabetes, the rats were euthanized and their retinas were collected. *Results:* The early molecular markers of diabetic retinopathy (DR), glial fibrillary acidic protein and fibronectin, were evaluated by western blot assays, and showed an increase in DM-SHR compared to the SHR group.

The oxidative balance, evaluated by superoxide production and nitric oxide end product levels estimated by a nitric oxide analyzer, and the counterpart antioxidative defense, revealed an accentuated unbalance in DM-SHR compared to the SHR group. As a result, the product peroxynitrite, which was detected by immunohistochemistry for nitrotyrosine, was higher in the DM-SHR group. The retinal poly ADP-ribose (PAR) modified proteins, which reflect the activation of PARP, and the inducible nitric oxide synthase (iNOS) expressions were found to have increased in this group. The treatment with tempol reestablished the oxidative parameters and decreased the PAR modified proteins, thus preventing extracellular matrix accumulation and glial reaction.

Conclusions: The administration of tempol prevented oxidative damage, decreased iNOS levels, and ameliorated the activation of PARP in the retina of diabetic hypertensive rats. Consequently, the early molecular markers of DR, such as glial reaction (GFAP) and extracellular matrix accumulation (FN), were prevented in tempol-treated rats.

Keywords: Diabetic retinopathy, superoxide dismutase mimetic, poly (ADP-ribose) polymerase, inducible nitric oxide synthase, oxidative stress

INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) has become one of the most challenging health problems of the twenty-first century. Diabetic retinopathy (DR) is a vascular complication in either type 1 or type 2 diabetes, and it is considered the leading cause of blindness in developed countries¹. It is characterized by extensive neuro and glial degeneration² accompanied by damage to the integrity of the vasculature, as evidenced by an early breakdown of the blood-retinal barrier³. Risk factors in the development and progression of DR include glycemic control and hypertension⁴. Epidemiological studies clearly identify hypertension as the most important independent risk factor for DR⁵. In UKPDS, the control of hypertension reduced the progression of DR in 35% of cases surpassing even glycemic control⁵.

The renin-angiotensin system (RAS) has been implicated in the progression of DR⁶. Moreover, overactivity of the retinal RAS, which has been shown to be independent of the systemic RAS⁷, promotes endothelial cell proliferation in DR⁸. We have recently demonstrated that angiotensin II type 1 receptor blockage ameliorates diabetic retinal neurodegeneration by reestablishing oxidative balance and mitochondrial function⁹.

Superoxide dismutase (SOD) catalyzes the conversion of superoxide (O_2^-) to hydrogen peroxide (H_2O_2), which can then be turned into water by catalase or the glutathione peroxidase system. Although SOD is the first line of physiological defense against

oxidative stress, the reaction of O_2^- with nitric oxide (NO) is about three times faster than its reaction with SOD¹⁰. It has been demonstrated that nitroxides such as tempol exert a cytoprotective action against diverse oxidative insults¹¹ and catalyze the dismutation of superoxide to H_2O_2 plus O_2 (SOD-like activity). Previous studies demonstrated the beneficial effects of tempol in diabetic retinas for reducing leukostasis¹² and protecting the retina's neural cells¹³. Tempol was found to attenuate the aorta's response to angiotensin II (increasing O_2^- formation and inducing vasoconstriction); this effect was endothelium-dependent and reversed by the inhibition of NO synthesis¹⁴, suggesting that tempol counteracts vasoconstriction by scavenging O_2^- and by increasing the bioavailability of NO.

The antioxidant defense enzymes responsible for scavenging free radicals and maintaining redox homeostasis such as SOD, glutathione (GSH) reductase, peroxidase, and catalase are diminished in the retina of animals with diabetes¹⁵. In an animal model with genetic hypertension and streptozotocin-induced diabetes, the antioxidant system is reduced compared with that of the normotensive control¹⁶. Under DM conditions, the induction of the glycation reaction produces free radicals such as O_2^- and NO. NO interacts with O_2^- to form the highly reactive hydroxyl radical, peroxynitrite, which leads to reactive oxidative damage. Peroxynitrite interacts with lipids, DNA, and proteins, resulting in damaging cellular effects. The effects on DNA are the most damaging to the cell function. The nitrosative stress induces DNA single-strand breaks and leads to over-activation of the DNA repair enzyme poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). PARP is the enzyme that cleaves nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) to form nicotinamide

and a poly (ADP-ribose) polymer. Generally, the activation of PARP contributes to energy failure¹⁷, transcriptional gene regulation, and the induction of apoptosis/necrosis¹⁷. In DM, PARP activation contributes to endothelial cell dysfunction and appears to be central in the mechanisms by which hyperglycemia induces diabetic vascular dysfunction¹⁸. In animal studies with PARP-1 knockout mice that were fed a 30% galactose diet for 2 months, Xu and colleagues showed that the hyperhexosemia-induced oxidative stress and increased expression of fibronectin observed in wild-type control groups were not observed in PARP-1^{-/-} hyperhexosemic mice, suggesting that the PARP blockade in this animal model might prevent hyperhexosemia-induced effects¹⁹. In addition, a previous paper addressing endothelial dysfunction in diabetes complications showed that PARP-deficient endothelial cells incubated with high glucose did not exhibit production of reactive nitrogen and oxygen species, consequent single-strand DNA breakage, or metabolic and functional impairments²⁰. PARP activation may also cause NFκB activation²¹. In this work, Zheng and colleagues demonstrated that in streptozotocin induced diabetes, as well as *in vitro* studies, the use of a specific PARP inhibitor (PJ-34) prevented the early apoptosis of retinal vascular cells and the development of acellular capillaries and pericyte ghosts in bovine retinal endothelial cells (BRECs)²¹. It also inhibited the NFκB activation and inflammatory markers in BRECs²¹. By using PARP inhibitors or knocking out PARP genes, both NFκB activation and transcription of NFκB-dependent genes, such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) or intracellular adhesion molecule (ICAM)-1, can be reduced²². This suggests that the inhibition of PARP activation might prevent the consequences of inflammation or oxidative stress by modifying the NFκB-dependent pathways. In our previous studies, we

revealed that after 20 days of diabetes, SHR showed an increased expression of the early inflammatory markers NF-kB, ICAM-1, and microglial activation²³. In a recent paper by Drel et al.²⁴, treatment with PARP inhibitors prevented apoptosis, glial reaction, and nitrosative imbalance in experimental-diabetes retina.

In view of the evidence that the prevalence of hypertension is very high among patients with diabetes and that antioxidants can provide protective benefits for the treatment of DR, we sought to investigate *in vivo* whether treatment with tempol would prevent the early molecular events in the pathogenesis of retinopathy. We have already demonstrated that the early molecular changes observed in diabetic retina are more evident and first detected in concomitance of arterial hypertension and experimental diabetes^{16,23,25}. A number of papers investigating the mechanisms of tempol are in hypertensive animal models or *in vitro* studies^{26,27}. For this purpose, we used a murine model genetically hypertensive (spontaneously hypertensive rats, SHR) and experimentally induced diabetes. Among diabetic SHR, the tempol treatment prevented the early molecular changes of DR through the reestablishment of the redox status thus decreasing the amount of modified PAR proteins and iNOS expression in the retinal tissue.

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 Animal Research Ethics Committee (CEEA/IB/Unicamp, protocol number 1833-1). It is also in accordance

with the Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research (ARVO). Taconic (Germantown, NY) provided the SHR and the genetic control Wistar Kyoto rats (WKY) used in the present study, and we bred them in our animal facility. Experimental diabetes was induced in 4-week-old male SHR (DM-SHR) by injecting streptozotocin (STZ, 60 mg/kg) (Sigma, St. Louis, MO) dissolved in a sodium citrate buffer (pH 4.5) via the tail vein after overnight fasting. The WKY control normotensive rats and the control SHR (CT-SHR) received only the citrate buffer. From the first day after diabetes induction, the DM-SHR's were randomized to receive or not to receive a daily intraperitoneal injection of tempol (DM-SHR tempol - 250 mg/kg/day; 1.45 μ mol/g). We used an enzymatic colorimetric GOD-PAP assay (Merck, Darmstadt, Germany) to measure plasma glucose levels 72 hours after the STZ or citrate buffer injection and on the day before sacrificing the rats. Rats with plasma glucose values \geq 15 mmol/L were considered diabetic for the present study. We obtained systolic blood pressure by indirect tail-cuff plethysmography in unanesthetized rats with an MK III physiograph (Narco Bio-System, Houston, TX). Twenty days after diabetes induction, the rats were euthanized and their retinas were detached from the retinal-pigmented epithelium cell layer and collected for colorimetric assays and Western blotting analysis, or their eye globes were prepared for immunohistochemistry assays.

Western Blotting Analysis for GFAP, FN, Cu-Zn SOD, PARP and iNOS

The retinas were lysed in 300 μ L of a buffer containing 2% SDS and 60 mmol Tris-HCl (pH 6.8), supplemented with a protease inhibitor cocktail (Complete®, Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN). After centrifugation, we measured protein concentrations

with the Bradford method²⁸. SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting were performed as described elsewhere¹⁶. To assess the protein expression of GFAP, FN, iNOS, and Cu-Zn SOD and to detect poly (ADP-ribose) (PAR) polymers, the membrane was incubated for an additional hour with antibodies against goat polyclonal anti-GFAP (1:100, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA), goat polyclonal anti-FN (1:1000, Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA), rabbit polyclonal anti-iNOS (1:500, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), rabbit polyclonal anti-Cu-Zn SOD (1:4000, AbFrontier, Seoul, Korea), or anti-poly (ADP-ribose) mouse monoclonal antibody (1:1000, Trevigen, Gaithersburg, MD), along with horseradish peroxidase conjugated appropriate secondary antibodies and developed by the chemiluminescence method (Super Signal CL-HRP Substrate System; Pierce, Rockford, IL). A densitometer (Bio-Rad) scanned exposed films, and Multi-Analyst Macintosh Software for Image Analysis Systems quantitatively analyzed them. Equal loading and transfer were ascertained by reprobating the membranes for β -actin.

Immunohistochemistry for GFAP, Nitrotyrosine (NT) and PAR Modified Proteins in Retinal Tissues

After quenching endogenous peroxidase, the sections were incubated with nonfat milk. Tissue sections were then incubated with goat polyclonal anti-GFAP (Santa Cruz), rabbit polyclonal anti-nitrotyrosine antibody (Upstate Cell Signaling Solutions, Lake Placid, NY), and mouse monoclonal anti-poly (ADP) ribose (Trevigen, Gaithersburg, MD). The antibody anti-poly (ADP-ribose) detects poly (ADP-ribose) (PAR) polymers. Appropriate secondary antibodies were applied to the tissue sections. Labeled nuclei were detected

with ABC Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)/chloride/hydrogen peroxide and counterstained with hematoxylin (only for NT). For the negative controls, the staining was performed omitting the primary antibody. Quantitative analyses were performed as a percentage of positive cells per mm² of retina with the public domain program Image J (National Institutes of Health). An observer with no knowledge of the studied groups counted the positivity under high-power microscopic fields (x1000).

Detection of Superoxide Anion Production in Retinal Tissue

Lucigenin (bis-N-methylacridinium nitrate) (Invitrogen Inc., Eugene, OR) was used to measure superoxide anion production²⁹. The retinas were isolated and placed into tubes containing an RPMI-1640 medium (Gibco/BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air-5% CO₂. Lucigenin (25 mM) was added, and photon emission was measured over 10 seconds; repeated measurements were made over a 3-minute period using a luminometer (TD 20-E Luminometer Turner, USA). Superoxide production was expressed in relative luminescence units (RLU)/min/mg protein. Protein concentration was measured using the Bradford method²⁸ with BSA as the standard.

Measurements of Nitric Oxide End Products (NO_x⁻) (Nitrite and Nitrate) in Retina Tissue

Various cell types in the picomolar to nanomolar range produce NO, which has a very short half-life in biological fluids. Thus, the stable products of NO oxidation nitrite (NO₂⁻) and nitrate (NO₃⁻) are often analyzed instead to estimate the NO level in biological

fluid. The NO_2^- and NO_3^- concentrations were detected using an NO chemiluminescence analyzer (NOA, Sievers Instruments Inc, Boulder, Colorado, USA) in retina samples. With a syringe, 4 μL aliquots of supernatant were added to a purge chamber containing vanadium chloride (VCl_3) (97°C) (Aldrich Chemical Company) in 1 N HCl under a nitrogen atmosphere. The VCl_3 solution reduces nitrites and nitrates to NO gas, which the NOA detects. NO was liberated from the samples into the gaseous headspace and conducted to the NOA, where it reacted with the ozone to produce a chemiluminescent signal. The amount of light was proportional to the NO concentration, which was calculated from a standard curve of known NO_3^- concentrations. Each sample was analyzed in triplicate.

Measurement of Activity of Cu-Zn Superoxide Dismutase (SOD)

The enzyme activity of Cu-Zn SOD in retinal protein was measured using a kit from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI), according to the manufacturer's instructions. The kit utilizes a tetrazolium salt for detection of superoxide radicals generated by xanthine oxidase and hypoxanthine. One unit of SOD is defined as the amount of enzyme needed for a 50% dismutation of the superoxide radical. The assay measures activity of Cu-Zn SOD in tissue. The standard curve was generated using a controlled SOD standard. The reaction was initiated by adding 20 μL of diluted xanthine oxidase. A spectrophotometer (Elx800, Bio-TEK Ins, USA) monitored the absorbance continuously at 450 nm. Protein concentrations were measured by the Bradford method²⁸.

Determination of Reduced Glutathione (GSH) Levels in the Retina

Retinal GSH levels were measured using the method described previously³⁰, with a few modifications, also described previously¹⁶. The absorbance was read at 412 nm and the GSH concentration expressed as μM GSH per μg of retinal protein. GSH was used as an external standard for the preparation of a standard curve.

Statistical Analysis

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

RESULTS*Physiological Characteristics of the Studied Groups*

The body weight of the 4-week-old SHR was lower than the age-matched WKY rats ($p < 0.0001$). The weight gain was lower in DM-SHR than in CT-SHR ($p < 0.0001$), and the tempol treatment significantly reduced the body weight of treated DM-SHR in comparison to the non-treated SHR ($p = 0.03$). Systolic blood pressure (SBP) was significantly higher in the SHR groups than in the WKY-rat group ($p = 0.004$) and was not affected by the treatment. Plasma glucose levels were higher in diabetic rats when compared with the nondiabetic group ($p < 0.0001$) and were not affected by tempol treatment (Table 1).

Glial Reaction and Fibronectin Retinal Accumulation

To assess retinal lesion in this short-term study of diabetes and hypertension, we used the retinal expression of GFAP and fibronectin. These two abnormalities have been identified as early markers of retinal lesion in diabetes^{31,32}. We did not use classical morphological methods, such as retinal capillary morphology in trypsin digest retinas because the abnormalities seen in this preparation, such as acellular capillaries and pericyte ghosts, require a longer-term diabetes to be detected^{33,34}. GFAP levels were evaluated by Western blot analysis and immunohistochemistry. In the Western blot assay, an increase of GFAP levels in CT-SHR was observed compared with the WKY rats, ($p=0.001$) and this expression was exacerbated in the DM-SHR group ($p=0.0001$). The treatment with tempol prevented the enhancement of GFAP expression, maintaining levels similar to the control WKY levels ($p=0.7$) (Figure 1A). With immunohistochemistry, we observed an incrementally higher glial activity in the DM-SHR group compared with the WKY and CT-SHR rats. The treatment reestablished this expression to approximately the same levels as the CT-SHR group (Figure 1B).

The retinal expression of FN increased in the DM-SHR group when compared with the WKY ($p=0.004$) and CT-SHR ($p=0.02$) groups. Treatment with tempol ($p=0.02$) prevented the retinal expression of FN (Figure 2).

Evaluation of Oxidative/antioxidative Systems and the Peroxynitrite Oxidative Damage in Retinal Tissue

The redox state is dependent upon the balance between free radicals and antioxidant systems that influence tyrosine nitration and oxidative damage of lipids, proteins, and nucleic acids. For estimation of the oxidative status in retinal tissue, we evaluated the production of O_2^- and NO_x^- as well as the antioxidative system's GSH concentrations and the activity and expression of Cu-Zn SOD.

Superoxide production in the retina, evaluated by the lucigenin-enhanced chemiluminescence method, was increased in the DM-SHR group compared with the CT-SHR group ($p < 0.05$), and the tempol treatment reestablished superoxide production to normal levels ($p = 0.01$) (Figure 3A). Additionally, the retinal NO_x^- production was increased in the DM-SHR group compared with control groups ($p = 0.004$ vs. WKY and $p = 0.003$ vs. SHR), in which the tempol treatment ($p = 0.01$) prevented retinal NO_x^- production (Figure 3B).

The antioxidant defense was evaluated by retinal expression, Cu-Zn SOD activity, and the levels of GSH in retinal tissue. Two isoforms of SOD have Cu and Zn at their catalytic center and are localized to the intracellular cytoplasmic compartment and extracellularly³⁵. Presently, there was a marked reduction in Cu-Zn SOD retinal expression in DM-SHR was observed compared to the WKY group ($p = 0.0008$) and the CT-SHR group ($p = 0.02$). Similarly, the activity of Cu-Zn SOD was also significantly decreased in DM-SHR compared to WKY and CT-SHR ($p = 0.002$ and $p = 0.001$, respectively). The treatment with tempol protected both the expression and activity of Cu-Zn SOD from the effect of short-term diabetes and hypertension. The expression of

Cu-Zn SOD was restored in tempol-treated DM-SHR compared with DM-SHR ($p=0.04$), and the activity of Cu-Zn SOD presented similarly to the CT-SHR and WKY ($p=0.1$) (Figures 4A-B).

Although the presence of hypertension or short-term diabetes did not affect the levels of GSH in the retina ($p=0.4$), the treatment with tempol increased its levels by approximately 47% compared with all other groups ($p=0.01$). This effect may be explained by the metabolism of hydrogen peroxide by tempol's catalase-like actions that diminish the formation of hydroxyl radicals, thus increasing the levels of GSH available in the retinal tissue (Figure 4C).

An immunoreaction for NT in retinal tissue detected the product peroxynitrite, generated by the reaction between NO and O_2^- . There was an evident increase of NT in the retina from DM-SHR compared to the WKY and SHR ($p<0.0001$ and $p=0.0001$, respectively). By the mechanism of an SOD mimetic, tempol competed with NO by O_2^- and dismutated it to peroxide hydrogen and oxygen, leading to a marked reduction of NT levels in the treated DM-SHR group similar to those observed in the SHR group ($p=0.6$) (Figure 5).

Expression of Ribosylated Proteins in the Retinal Tissue of Tempol-treated Rats

Nitrosative stress induces DNA single strand breaks, leading to the over-activation of PARP. In the present study, the activation of PARP was accessed determined through the amount of PAR modified proteins by Western blot and immunohistochemistry analyses. In Western blot analyses, the presence of hypertension in the CT-SHR increased the

content of PAR ribosylated polymers compared with the normotensive WKY rats ($p=0.04$). The concomitance of both diabetes and hypertension in the DM-SHR significantly increased these levels compared with WKY and CT-SHR ($p<0.001$ and $p=0.02$, respectively). The treatment with tempol in the DM-SHR reestablished this parameter to SHR levels ($p=0.3$) (Figure 6A). As detected by immunohistochemistry, the distribution of poly (ADP-ribose) polymer positive cells was homogeneous among the ganglion cells, both the inner and outer nuclear layers. The presence of hypertension solely and in concomitance with diabetes revealed a significant increase in poly (ADP-ribose) polymer positive retinal cells compared with the WKY group ($p=0.01$ and $p=0.006$, respectively) suggesting activation of PARP evaluated through the amount of PAR modified proteins. Treatment with a SOD mimetic for 20 days reestablished this element to WKY levels ($p=0.7$) (Figure 6B).

iNOS Expression Associated with Poly(ADP-ribose)ation in Retinal Tissue

iNOS has been shown to cause DNA breaks and the subsequent activation of PARP, which was recently implicated in early diabetic retinal changes^{21,36}. Other investigators have shown that with specific PARP inhibitors or knocking out the PARP gene, NF κ B activation and transcription of NF κ B-dependent genes, such as inducible nitric oxide synthase, are reduced^{21,37}, suggesting that the inhibition of poly(ADP-ribose)ation might prevent the consequences of inflammation or stress by modification of NF κ B-dependent pathways. In the present work, we addressed the retinal expression of iNOS, which may be accepted as an indicator of the NF κ B-dependent pathways and PARP activation. A significant increase in retinal iNOS expression was demonstrated in the DM-SHR group

compared with the WKY group ($p=0.04$), and the treatment with tempol restored it to normal levels ($p=0.26$) (Figure 7).

DISCUSSION

The findings presented herein demonstrate that the systemic administration of tempol reestablished the cell's oxidative parameters and thus prevented the poly(ADP-ribose)ylation of proteins and iNOS expression in the retina of diabetic hypertensive rats. Consequently, the early molecular changes of DR, represented here by FN accumulation and increased GFAP expression, were prevented in tempol-treated rats.

Serious retinal injuries such as retinal detachment³⁸, glaucoma³⁹ or DR^{2,40,41} can trigger retinal reactive gliosis and neurodegeneration characterized by changes in astrocyte and Müller cell morphologies and increased production of intermediate filament proteins (GFAP)⁴². Müller cells and blood vessels of the retina are in close apposition and are likely to interact to each other⁴³. It has been suggested that the increase in vascular permeability in DR may be due to the effects of diabetes that alter the neural components of the retina, demonstrated by an increased production of vascular endothelial growth factor by Müller cells and neurons⁴⁴⁻⁴⁶, leading to a breakdown in the interactions between neurons, glia, and endothelial cells⁴⁷. Thickening of the basal lamina that surrounds the endothelial cells and pericytes of the retinal capillaries due to extracellular matrix accumulation^{48,49} is another finding present early in DR pathogenesis and this is believed to be pivotal in the progression of DR. This concept was based on the findings in DM animal models where the down-regulation of fibronectin (FN) synthesis partially

prevented retinal basal lamina thickening and prevented the classical early vascular changes such as the apoptosis of pericytes and the development of acellular capillaries⁵⁰. In in vitro studies, Oshitari and colleagues down-regulated several components of the extracellular matrix such as fibronectin, laminin, and collagen type IV, and thus reduced vascular leakage in streptozotocin-induced diabetes⁵¹. In light of these evidences fibronectin accumulation and GFAP expression might be used as molecular markers of diabetic changes in the retina in short-term experimental diabetes.

DM increases oxidative stress, which plays a key regulatory role in the development of its complications⁵². Since oxidative stress may be the promoter of many alterations implicated in the pathogenesis of DR and that represents an imbalance between excess formation and the impaired removal of reactive oxygen species (ROS), the antioxidant defense system of the cell is a crucial part of the overall oxidative stress experienced by a cell. A number of works have demonstrated beneficial effects of antioxidant treatments in diabetic retina. Antioxidants may act at different levels, may inhibit the formation of ROS or scavengers of free radicals, or increase the antioxidant defense enzyme capabilities⁵³. For instance, long-term lipoic acid treatment attenuated the apoptosis of rat retinal capillary cells and decreases the levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and NT in diabetic rats⁵⁴, and short-term treatment prevented the significant decrease of glutathione (GSH) content, normalized the malondialdehyde (MDA) concentration, and restored the electroretinogram *b*-wave amplitude⁵⁵. In addition, dietary supplementation with multi-antioxidants, including vitamins C and E, in diabetic rats prevented the inhibition of retinal glutathione reductase, glutathione peroxidase, SOD

activities⁵⁶, and superoxide production⁵⁷. It also reduced the development of retinal acellular capillaries and pericyte ghosts⁵⁸. In addition, the overexpression of mitochondrial SOD in hemizygous transgenic mice (MnSOD-Tg) prevented the diabetic retinal oxidative stress protecting the mitochondria from dysfunction⁵⁹.

Previous studies demonstrated that PARP activation increased vasoactive factors, such as endothelin-1 and ECM protein production, in diabetes and that PAR modified proteins are associated with an increase in oxidative stress up-regulation in the retina¹⁹. Among the PARPs, nuclear PARP-1 is a DNA damage-activated enzyme and is the most abundant and commonly studied member of the family. Its enzymatic activity leads to poly (ADP-ribose) formation, and it was first described over 40 years ago⁶⁰. More recently, PARP increased in importance when it was discovered to mediate nitric-oxide-induced neuronal death⁶¹. ROS-dependent DNA damage is thought to play a major role in triggering PARP-1 hyperactivity during ischemia. In the pathogenesis of DR, ischemia causes structural changes and a breakdown of the blood retinal barrier⁶². PARP-1 hyperactivation causes cell death because of cellular accumulation of the PARP-1 product, poly (ADP-ribose), which causes the translocation of the apoptosis-inducing factor (AIF) from mitochondria to the nucleus and the activation of a caspase-independent programmed cell-death pathway⁶³. In experimental models of brain ischemia, the use of a PARP-1 inhibitor, PJ34, preserved the endothelial tight junctions and decreased the expression of ICAM-1, thus limiting leukocyte infiltration to the ischemic brain⁶⁴.

Tempol is a cell membrane-permeable nitroxide and is among the most potent of the nitroxides for protecting cells and tissues from the damaging effects of ROS⁶⁵. Tempol has multiple antioxidant actions due to the ability of nitroxides to inhibit three or more sequential sites in an oxidative chain (for example O_2^- , H_2O_2 , and OH^\cdot). This may underlie its efficacy in diverse models of oxidative stress. Tempol is free of serious toxic effects in animal models. Despite these apparently beneficial effects in a wide range of animal models, tempol has yet to be developed as a drug for human use⁶⁶. Matsumoto et al. tested the toxic effects of five nitroxides and tempol was the least toxic⁶⁷. These toxic or lethal doses of tempol are approximately 30-fold higher than the therapeutic dose for the reduction of blood pressure. In addition, tempol had no adverse effects on gene mutation in Chinese hamster⁶⁸. The reaction rate constant for tempol with O_2^- has been determined to be $3.4 \cdot 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$. This makes it a much more efficient antioxidant than vitamins since the rate constant for the interaction of SOD with O_2^- is about $1.6\text{--}2.4 \cdot 10^9 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and for vitamin E with O_2^- , $0.59 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ⁶⁹. Tempol has two reaction sites with OH^\cdot that can be derived from ROS-like peroxynitrite. In cell cultures, tempol catalyses the SOD reaction and protects against oxidative stress⁷⁰. In addition, exposure to conditions of oxidative stress in cultured coronary endothelial cells leads to an increase in NO end products, namely nitrite and nitrate. In the presence of tempol, these effects are reversed²⁷.

In experimental models⁷¹ and in post-mortem retinas from diabetic patients⁷², as well as in the vitreous fluid from diabetic patients with proliferative diabetic retinopathy⁷³, increased levels of NO end products and the up-regulation of iNOS have been reported.

In line with this evidence, the treatment with tempol in this study reduced NO end products and the superoxide production observed in retina from diabetic SHR rats. In the treatment, tempol acted as an O_2^- scavenger, reducing nitric oxide end products and increasing the glutathione biosynthesis, thereby reestablishing the oxidative-nitrosative status of the diabetic retina. Likewise, we observed the prevention of Cu-Zn SOD retinal expression/activity reduction in treated diabetic rats. Further studies are required to address whether the variation in Cu-Zn SOD expression and activity plays a role in the effect of tempol in retinal tissue.

In conclusion, our data reveal tempol's potential therapeutic role in the early phases of DR. In hypertensive diabetic rats, treatment with tempol reestablished the redox status by acting as an O_2^- scavenger, which enhances the glutathione biosynthesis and Cu-Zn SOD activity, thus preventing oxidative damage. These effects were associated with a reduction in retinal extracellular matrix accumulation and glial reaction. The possible mechanism conferred by tempol to protect against the early molecular changes present in retina from diabetic hypertensive rats is through the counteraction of oxidative-nitrosative stress thus diminishing the amount of ADP-ribosylated proteins.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) under the documents 05/58189-5 and 08/54068-7. Mariana A. B. Rosales was the recipient of a scholarship from the Coordination for the Improvement of Higher

Education Personnel (CAPES). The authors thank Gabriela F.P. de Souza and Marcelo G. de Oliveira for their assistance in the measurements of nitric oxide end products.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. (A) Western blot of retinal lysates for GFAP from studied rats. The membranes were reprobated with anti- β -actin antibody as a control for protein loading. Bars represent mean \pm SD of the band densities of GFAP/ β -actin ratio expressed in arbitrary densitometric units. (1.18 \pm 0.2 vs. 0.51 \pm 0.2 arbitrary densitometric units for CT-SHR vs. WKY rats, respectively, † p=0.001; 1.43 \pm 0.2 vs. 0.51 \pm 0.2 arbitrary densitometric units for DM-SHR vs. WKY rats, respectively, * p=0.0001; and 0.51 \pm 0.2 vs. 0.59 \pm 0.2 arbitrary densitometric units for WKY vs. DM-SHR tempol groups, respectively, $^{\#}$ p=0.7). (B) Representative photomicrograph of the immunolocalization of GFAP in retinal sections. Presence of the immunoreactivity of GFAP is indicated in brown. Bars represent mean \pm SD of the percentage of positive/ mm^2 of retina.

Figure 2. Western blot of retinal lysates for FN from studied rats. The membranes were reprobated with anti- β -actin antibody as a control for protein loading. Bars represent mean \pm SD of the band densities of FN/ β -actin ratio expressed in arbitrary densitometric units. (1.7 \pm 0.6 vs. 0.7 \pm 0.04 arbitrary densitometric units for DM-SHR vs. WKY rats, respectively, * p=0.004; 1.7 \pm 0.6 vs. 1.02 \pm 0.09 arbitrary densitometric units for DM-SHR vs. CT-SHR rats, respectively, * p=0.02; and 1.02 \pm 0.2 vs. 1.7 \pm 0.6 arbitrary densitometric units for DM-SHR tempol vs. DM-SHR, respectively, $^{\#}$ p=0.02).

Figure 3. (A) Total superoxide generation in retinal tissue. Superoxide anion production from the retinas of control, diabetic SHR, and diabetic SHR treated with tempol was measured every 10 s for 3 min with the lucigenin-enhanced chemiluminescence method. The peak level of superoxide generation was observed around 3 min after lucigenin was added to the reaction buffer containing the retinas from different groups. Bars represent mean \pm SD. All data shown are of $n\geq 6$ observations (6.8 \pm 3.5 vs. 3.7 \pm 1.2 RLU/min/mg of protein for DM-SHR vs. WKY rats, respectively, * $p=0.05$; and 2.1 \pm 0.2 vs. 6.8 \pm 3.4 RLU/min/mg of protein for DM-SHR tempol vs. DM-SHR rats, respectively, # $p=0.01$). (B) Nitrite (NO₂⁻) and Nitrate (NO₃⁻), the stable products of NO oxidation, are often analyzed to estimate the NO level in biological fluid by NO chemiluminescence analyzer. Results are corrected for protein concentration and are expressed as μ mol NO_x/mg protein. Each sample was analyzed in triplicate. (19.2 \pm 4.4 vs. 11.2 \pm 0.5 μ mol NO/mg protein for DM-SHR vs. WKY rats, respectively, * $p=0.004$; 19.2 \pm 4.4 vs. 10.6 \pm 1.7 μ mol NO/mg protein for DM-SHR vs. CT-SHR rats, respectively, * $p=0.003$; and 10.0 \pm 2.0 vs. 19.2 \pm 4.4 μ mol NO/mg protein for DM-SHR tempol vs. DM-SHR rats, respectively, # $p=0.001$).

Figure 4. (A) Western blot of retinal lysates for Cu-Zn SOD from studied rats. The membranes were reprobated with anti- β -actin antibody as a control for protein loading. Bars represent mean \pm SD of the band densities of the Cu-Zn SOD/ β -actin ratio expressed in arbitrary densitometric units. (0.65 \pm 0.20 vs. 1.20 \pm 0.10 arbitrary densitometric units for DM-SHR vs. WKY rats, respectively, * $p=0.0008$; 0.65 \pm 0.20 vs. 1.00 \pm 0.20 arbitrary densitometric units for DM-SHR vs. CT-SHR, respectively, * $p=0.02$; and 0.89 \pm 0.08 vs.

0.65±0.20 arbitrary densitometric units for DM-SHR tempol vs. DM-SHR, respectively, [#]p=0.04). (B) The enzyme activity of Cu-Zn SOD in retinal protein measured using a kit from Cayman Chemical. The standard curve was generated using quality a controlled SOD standard. Each sample was analyzed in triplicate. (0.004±0.001 vs. 0.008±0.001 units of SOD/mg protein for DM-SHR vs. WKY rats, respectively, *p=0.002; 0.004±0.001 vs. 0.009±0.002 units of SOD/mg protein for DM-SHR vs. CT-SHR rats, respectively, *p=0.001; and 0.007±0.002 vs. 0.004±0.001 units of SOD/mg protein for DM-SHR tempol vs. DM-SHR, respectively, [#]p=0.01). (C) Concentration of reduced glutathione (GSH) from the retinas of studied rats (µM glutathione/µg of retinal protein). The GSH was not affected by the presence of hypertension or short-term diabetes and the treatment with tempol increased its levels ([#]p=0.01).

Figure 5. Representative photomicrograph of immunolocalization of nitrotyrosine. Presence of nitrotyrosine is indicated in brown. Bars represent mean±SD of the percentage of positive/ mm² of retina. (2.03±0.3 vs. 16.7±4.5 percentage of positive/ mm² of retina WKY vs. DM-SHR rats, respectively, *p<0.0001; 3.03±0.8 vs. 16.7±4.5 percentage of positive/ mm² of retina CT-SHR vs. DM-SHR rats, respectively, *p=0.0001; and 3.03±0.8 vs. 4.1±1.0 percentage of positive/ mm² of retina CT-SHR vs. DM-SHR tempol treated rats, respectively, *p=0.6).

Figure 6. (A) Western blot of retinal lysates for PAR modified proteins from studied rats. The membranes were reprobred with anti-β-actin antibody as a control for protein loading. Bars represent mean±SD of the band densities of the PAR modified proteins /β-actin ratio

expressed in arbitrary densitometric units. (2.4 ± 1.5 vs. 9.8 ± 3.2 arbitrary densitometric units for WKY vs. CT-SHR rats, respectively, $^{\ddagger}p=0.04$; 2.4 ± 1.5 vs. 18.3 ± 7.8 arbitrary densitometric units for WKY vs. DM-SHR rats, respectively, $^*p<0.0001$; 9.8 ± 3.2 vs. 18.3 ± 7.8 for CT-SHR vs. DM-SHR rats, respectively, $^*p=0.02$; and 9.8 ± 3.2 vs. 6.6 ± 3.1 for CT-SHR vs. DM-SHR tempol treated rats, respectively, $^{\#}p=0.3$). (B) Representative photomicrograph of immunolocalization of poly (ADP-ribose) polymer positive cells in retinal sections. The presence of immunoreactivity of PAR is indicated by a dark brown nucleus. Bars represent mean \pm SD of the percentage of positive cells/ mm^2 of retina. (5.8 ± 2.5 vs. 16.8 ± 7.6 percentage of positive cells/ mm^2 of retina WKY vs. CT-SHR rats, respectively, $^{\ddagger}p=0.01$; 5.8 ± 2.5 vs. 18.6 ± 1.5 percentage of positive cells/ mm^2 of retina WKY vs. DM-SHR rats, respectively, $^*p=0.006$; and 5.8 ± 2.5 vs. 6.7 ± 2.3 percentage of positive cells/ mm^2 of retina WKY vs. DM-SHR tempol rats, respectively, $^{\#}p=0.7$).

Figure 7. Western blot of retinal lysates for iNOS from studied rats. The membranes were reprobred with anti- β -actin antibody as a control for protein loading. Bars represent mean \pm SD of the band densities of the iNOS/ β -actin ratio expressed in arbitrary densitometric units. (1.1 ± 0.4 vs. 0.7 ± 0.3 arbitrary densitometric units for CT-SHR vs. WKY rats, respectively, $p=0.26$; 1.5 ± 0.7 vs. 1.1 ± 0.4 arbitrary densitometric units for DM-SHR vs. CT-SHR rats, respectively, $p=0.17$; 1.5 ± 0.7 vs. 0.7 ± 0.3 arbitrary densitometric units for DM-SHR vs. WKY rats, respectively, $^*p=0.04$; 1.5 ± 0.7 vs. 0.3 ± 0.2 arbitrary densitometric units for DM-SHR vs. DM-SHR tempol, respectively, $^*p=0.001$; and 0.7 ± 0.3 vs. 0.3 ± 0.2 arbitrary densitometric units for WKY vs. DM-SHR tempol, respectively, $^{\#}p=0.25$).

WKY: control WKY; CT-SHR: control SHR; DM-SHR: diabetic SHR; DM-SHR
tempol: diabetic SHR treated with tempol, ganglion cell layer (GCL); inner plexiform
layer (IPL); inner nuclear layer (INL); outer nuclear layer (ONL); outer plexiform layer
(OPL).

REFERENCES

1. Patz A, Smith RE. The ETDRS and Diabetes 2000. *Ophthalmology*. 1991;98:739-740.
2. Barber AJ. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27:283-290.
3. Cunha-Vaz JG, Fonseca JR, Abreu JF, Ruas MA. Detection of early retinal changes in diabetes by vitreous fluorophotometry. *Diabetes*. 1979;28:16-19.
4. Dodson PM. Diabetic retinopathy: treatment and prevention. *Diab Vasc Dis Res*. 2007;4:S9-S11.
5. The UKPDS Study Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ*. 1998;317:703-713.
6. Danser AH, van den Dorpel MA, Deinum J et al. Renin, prorenin, and immunoreactive renin in vitreous fluid from eyes with and without diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;68:160-167.
7. Kawamura H, Kobayashi M, Li Q et al. Effects of angiotensin II on the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. *J Physiol*. 2004;561:671-683.
8. Moravski CJ, Kelly DJ, Cooper ME et al. Retinal neovascularization is prevented by blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000;36:1099-1104.
9. Silva KC, Rosales MA, Biswas SK, Lopes de Faria JB, Lopes de Faria JM. Diabetic retinal neurodegeneration is associated with mitochondrial oxidative stress and is improved by angiotensin receptor blocker in a model that combines hypertension and diabetes. *Diabetes*. 2009;58:1382-1390.

10. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 1996;40:C1424–C1437.
11. Krishna MC, Russo A, Mitchell JB, Goldstein S, Dafni H, Samuni A. Do nitroxide antioxidants act as scavengers of O_2^- or as SOD mimics?. *J Biol Chem*. 1996;271:26026–26031.
12. Chen P, Guo AM, Edwards PA, Trick G, Scicli AG. Role of NADPH oxidase and ANG II in diabetes-induced retinal leukostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293:R1619-1629 .
13. El-Remessy AB, Khalil IE, Matragoon S et al. Neuroprotective effect of (-) Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity: involvement of peroxynitrite. *Am J Pathol*. 2003;163:1997-2008.
14. Shastri S, Gopalakrishnan V, Poduri R, Di Wang H. Tempol selectively attenuates angiotensin II evoked vasoconstrictor responses in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2002;20:1381-1391.
15. 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.
16. Pinto CC, Silva KC, Biswas SK, Martins N, De Faria JB, De Faria JM. Arterial hypertension exacerbates oxidative stress in early diabetic retinopathy. *Free Radic Res*. 2007;41:1151-1158.
17. Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:517-528.

18. Chiu J, Xu BY, Chen S, Feng B, Chakrabarti S. Oxidative stress-induced, poly (ADP-ribose) polymerase-dependent upregulation of ET-1 expression in chronic diabetic complications. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008;86:365-372.
19. Xu B, Chiu J, Feng B, Chen S, Chakrabarti S. PARP activation and the alteration of vasoactive factors and extracellular matrix protein in retina and kidney in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008;24:404-412.
20. Garcia Soriano F, Virág L, Jagtap P et al. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADPribose) polymerase activation. *Nat Med*. 2001;7:108–113.
21. Zheng L, Szabó C, Kern TS. Poly(ADP-ribose) polymerase is involved in the development of diabetic retinopathy via regulation of nuclear factor-kappaB. *Diabetes*. 2004;53:2960-2967.
22. Chiarugi A, Moskowitz MA. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF-kappaB-driven transcription and microglial activation: implication for neurodegenerative disorders. *J Neurochem*. 2003;85:306-317.
23. Silva KC, Pinto CC, Biswas SK, Souza DS, de Faria JB, de Faria JM. Prevention of hypertension abrogates early inflammatory events in the retina of diabetic hypertensive rats. *Exp Eye Res*. 2007;85:123-129.
24. Drel VR, Xu W, Zhang J et al. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition counteracts cataract formation and early retinal changes in streptozotocin-diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;50:1778-1790.
25. Silva KC, Pinto CC, Biswas SK, de Faria JB, de Faria JM. Hypertension increases retinal inflammation in experimental diabetes: a possible mechanism for aggravation of diabetic retinopathy by hypertension. *Curr Eye Res*. 2007;32:533-541.

26. Schnackenberg CG and Wilcox CS. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-isoprostaglandin F_{2α}. *Hypertension*. 1999;33:424-428.
27. Vaziri ND, Ding Y. Effect of lead on nitric oxide synthase expression in coronary endothelial cells: role of superoxide. *Hypertension*. 2001;37:223-226.
28. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254.
29. Li Y, Zhu H, Kuppasamy P, Roubaud V, Zweier JL, Trush MA. Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J Biol Chem*. 1998;273:2015-2023.
30. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*. 1963;61:882-888.
31. Yoshida Y, Yamagishi S, Matsui T et al. Protective role of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in early phase of experimental diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009;25:678-86.
32. Roy S, Lorenzi M. Early biosynthetic changes in the diabetic-like retinopathy of galactose-fed rats. *Diabetologia*. 1996;39:735-8.
33. Jousseaume AM, Doehmen S, Le ML et al. TNF-α mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long-term histopathological alterations. *Mol Vis*. 2009;15:1418-28.

34. Gardiner TA, Anderson HR, Stitt AW. Inhibition of advanced glycation end-products protects against retinal capillary basement membrane expansion during long-term diabetes. *J Pathol*. 2003;201:328-33.
35. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:337-349.
36. Zheng L, Gong B, Hatala DA, Kern TS. Retinal ischemia and reperfusion causes capillary degeneration: similarities to diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:361-367.
37. Le Page C, Sanceau J, Drapier JC, Wietzerbin J. Inhibitors of ADP-ribosylation impair inducible nitric oxide synthase gene transcription through inhibition of NF kappa B activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;243:451-457.
38. Lewis GP, Matsumoto B, Fisher SK. Changes in the organization and expression of cytoskeletal proteins during retinal degeneration induced by retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36:2404-2416.
39. Wang L, Cioffi GA, Cull G, Dong J, Fortune B. Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:1088-1094.
40. Mizutani M, Gerhardinger C, Lorenzi M. Muller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes*. 1998;47:445-449.
41. Barber AJ, Antonetti DA, Gardner TW. Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:3561-3568.

42. Lewis GP, Fisher SK. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol.* 2003;230:263-290.
43. Stone J, Dreher Z. Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina *J Comp Neurol* 1987;255:35-49.
44. Stone J, Itin A, Alon T et al. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia *J Neurosci* 1995; 15:4738-4747.
45. Amin, RH, Frank, RN, Kennedy, A, Elliott, D, Puklin, JE, Abrams, GW. Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38,36-47.
46. Tretiach M, Madigan MC, Wen L, Gillies MC. Effect of Muller cell co-culture on in vitro permeability of bovine retinal vascular endothelium in normoxic and hypoxic conditions, *Neurosci. Lett.* 2005;378:160–165.
47. Antonetti DA, Lieth E, Barber AJ, Gardner TW. Molecular mechanisms of vascular permeability in diabetic retinopathy *Semin Ophthalmol* 1999; 14,240-248.
48. Lorenzi M and Gerhardinger C. Early cellular and molecular changes induced by diabetes in the retina. *Diabetologia.* 2001;44:791-804.
49. Cai J and Boulton M. The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye* 2002;16:242-60.

50. Roy S, Sato T, Paryani G, Kao R. Downregulation of fibronectin overexpression reduces basement membrane thickening and vascular lesions in retinas of galactose-fed rats. *Diabetes*. 2003;52:1229-1234.
51. Oshitari T, Polewski P, Chadda M, Li AF, Sato T, Roy S. Effect of combined antisense oligonucleotides against high-glucose- and diabetes-induced overexpression of extracellular matrix components and increased vascular permeability. *Diabetes*. 2006;55:86-92.
52. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414:813-820.
53. Kowluru RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res*. 2007; 2007:43603.
54. 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.
55. Johnsen-Soriano S, Garcia-Pous M, Arnal E et al. Early lipoic acid intake protects retina of diabetic mice. *Free Radic Res*. 2008;42:613-617.
56. Kowluru RA, Kern TS, Engerman RL. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia. IV. Antioxidant defense system. *Free Radic Biol Med*. 1997;22:587-592.
57. Mustata GT, Rosca M, Biemel KM, Reihl O, Smith MA, Viswanathan A, et al. Paradoxical effects of green tea (*Camellia sinensis*) and antioxidant vitamins in diabetic rats: improved retinopathy and renal mitochondrial defects but deterioration of collagen matrix glycoxidation and cross-linking. *Diabetes*. 2005;54:517-526.

58. 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.
59. Kowluru RA, Kowluru V, Xiong Y, Ho YS. Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2006;41:1187-1190.
60. Chambon P, Weill JD, Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*. 1963;11:39-43.
61. Zhang J, Dawson VL, Dawson T, Snyder SH. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science*. 1994;263:687–689.
62. Kaur C, Foulds WS, Ling EA. Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: basic concepts, clinical features and management. *Prog Retin Eye Res*. 2008;27:622-647.
63. Yu SW, Andrabi SA, Wang H, et al. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:18314–18319.
64. Zhang Y, Park TS, Gidday JM. Hypoxic preconditioning protects human brain endothelium from ischemic apoptosis by Akt-dependent survivin activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H2573–H2581.
65. Li WG, Zhang XY, Wu YJ, Gao MT, and Zheng RL. The relationship between structure and antioxidative activity of piperidine nitroxides. *J Pharm Pharmacol* 2006;58:941–949.

66. Wilcox CS, Pearlman A. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacol Rev.* 2008;60:418-469.
67. Matsumoto K, Krishna MC, Mitchell JB. Novel pharmacokinetic measurement using electron paramagnetic resonance spectroscopy and simulation of in vivo decay of various nitroxyl spin probes in mouse blood. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;310:1076-1083.
68. An J, Hsie AW. Effects of an inhibitor and a mimic of superoxide dismutase on bleomycin mutagenesis in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res.* 1992;270:167-175.
69. Mitchell JB, Samuni A, Krishna MC, et al. Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics. *Biochemistry.* 1990;29:2802-2807.
70. Samuni A, Winkelsberg D, Pinson A, Hahn SM, Mitchell JB, Russo A. Nitroxide stable radicals protect beating cardiomyocytes against oxidative damage. *J Clin Invest.* 1991;87:1526-1530.
71. Du Y, Smith MA, Miller CM, Kern TS. Diabetes induced nitrate stress in the retina, and correction by aminoguanidine. *Journal of Neurochemistry.* 2002;80:771-779.
72. Abu El-Asrar AM, Desmet S, Meerschaert A, Dralands L, Missotten L, Geboes K. Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the retinas of human subjects with diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol.* 2001;4:551-556.
73. Hernández C, Lecube A, Segura RM, Sararols L, Simó R. Nitric oxide and vascular endothelial growth factor concentrations are increased but not related in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabet Med.* 2002;19:655-660.

Table 1. Physiological characteristics of the studied animals.

Groups	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Systolic blood pressure (mmHg)	Glycemia (mmol/L)
WKY (n=28)	117.2 ± 21.1	288.5 ± 26.0	129.2 ± 18.3	9.6 ± 1.2
CT-SHR (n=27)	70.4 ± 8.4 [*]	196.0 ± 20.7 [†]	152.8 ± 11.1	9.1 ± 2.0
DM-SHR (n=31)	69.9 ± 10.5 [*]	125.4 ± 34.6 ^{†‡}	151.1 ± 21.4	29.5 ± 4.0 [#]
DM-SHR tempol (n=30)	68.3 ± 8.0 [*]	107.4 ± 18.5 ^{†‡§}	152.6 ± 14.6	29.9 ± 6.0 [#]

^{*}p<0.0001 vs WKY; [†]p<0.0001 vs WKY and [‡]p<0.0001 vs CT-SHR; [§]p=0.03 vs non treated SHR rats; ^{||}p=0.003 vs WKY; [#]p<0.0001 vs non diabetic rats. Abbreviations used: WKY: control WKY, CT-SHR: control SHR, DM-SHR: diabetic SHR, DM-SHR tempol: diabetic SHR treated with tempol, SBP: Systolic blood pressure.

Figure 1

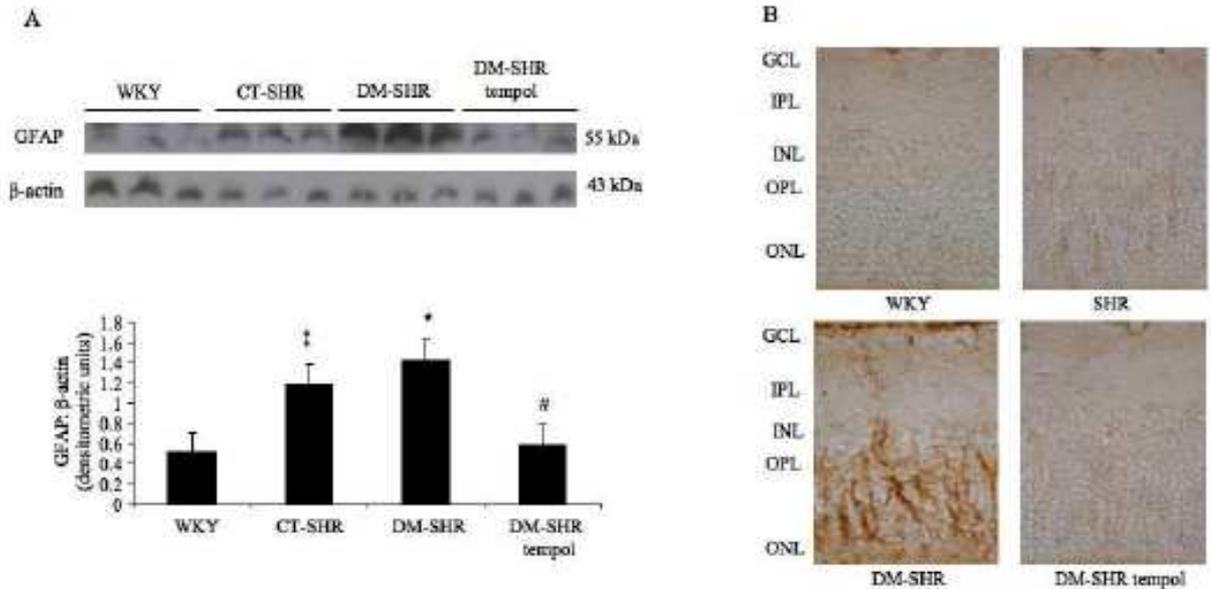


Figure 2

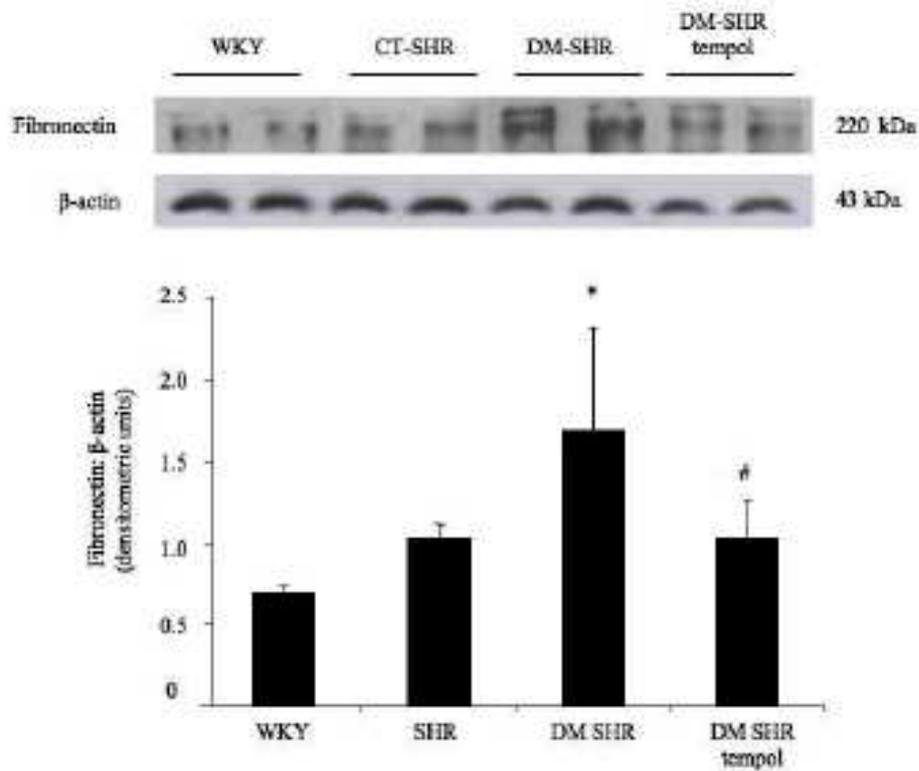


Figure 2. Western blot of retinal lysates for FN from studied rats. The membranes were reprobbed with anti- β -actin antibody as control for protein loading. Bars are representing mean \pm SD of band densities of FN/ β -actin ratio expressed in arbitrary densitometric units. (1.7 \pm 0.6 vs 0.7 \pm 0.04 arbitrary densitometric units for DM-SHR vs WKY rats, respectively, * p =0.004; 1.7 \pm 0.6 vs 1.02 \pm 0.09 arbitrary densitometric units for DM-SHR vs CT-SHR rats, * p =0.02; 1.02 \pm 0.2 vs 1.7 \pm 0.6 arbitrary densitometric units for DM-SHR tempol vs DM-SHR, respectively, # p =0.02).

Figure 3

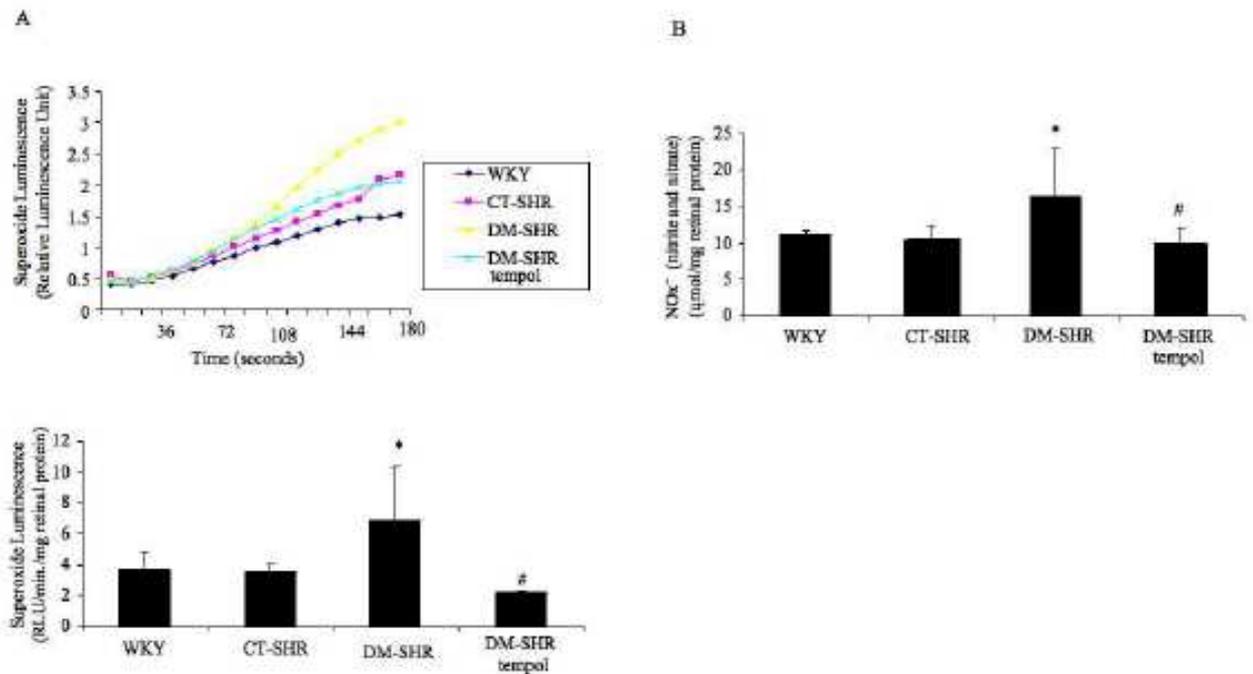


Figure 3. (A) Total superoxide generation in retinal tissue. Superoxide anion production, using the lucigenin-enhanced chemiluminescence method from retinas of control and diabetic SHR rats and diabetic SHR treated with tempol and photoemission, was measured every 10 s for 3 min. The peak level of superoxide generation was observed around 3 min after lucigenin was added to the reaction buffer containing retinas from different groups. Bars represent mean \pm SD. All data shown are of $n \geq 6$ observations (6.8 ± 3.5 vs 3.7 ± 1.2 RLU/min/mg of protein for DM-SHR vs WKY rats, respectively, $*p=0.05$; 2.1 ± 0.2 vs 6.8 ± 3.4 RLU/min/mg of protein for DM-SHR tempol vs DM-SHR rats, respectively, $\#p=0.01$). (B) Nitrite (NO₂) and Nitrate (NO₃), the stable products of NO oxidation, are often analyzed instead to estimate the NO level in biological fluid by NO chemiluminescence analyzer. Results are corrected for protein concentration, and are expressed as $\mu\text{mol NO}_x/\text{mg}$ protein. Each sample was analyzed in triplicate. (19.2 ± 4.4 vs 11.2 ± 0.5 $\mu\text{mol NO}/\text{mg}$ protein for DM-SHR vs WKY rats, respectively, $*p=0.004$; 19.2 ± 4.4 vs 10.6 ± 1.7 $\mu\text{mol NO}/\text{mg}$ protein for DM-SHR vs CT-SHR rats, respectively, $*p=0.003$; 10.0 ± 2.0 vs 19.2 ± 4.4 $\mu\text{mol NO}/\text{mg}$ protein for DM-SHR tempol vs DM-SHR rats, respectively, $\#p=0.001$).

Figure 4

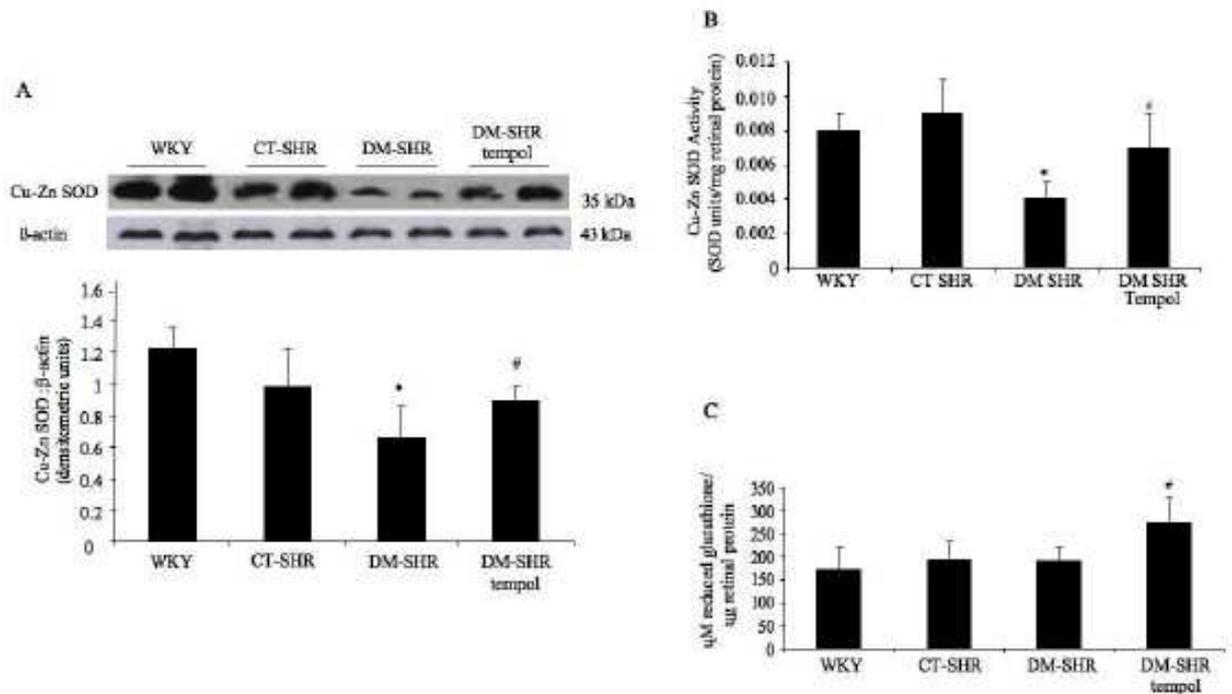


Figure 4. (A) Western blot of retinal lysates for Cu-Zn SOD reduced from studied rats. The membranes were reprobred with anti- β -actin antibody as control for protein loading. Bars are representing mean \pm SD of band densities of Cu-Zn SOD/ β -actin ratio expressed in arbitrary densitometric units. (0.65 \pm 0.20 vs 1.20 \pm 0.10 arbitrary densitometric units for DM-SHR vs WKY rats, respectively, * p =0.0008; 0.65 \pm 0.20 vs 1.00 \pm 0.20 arbitrary densitometric units for DM-SHR vs CT-SHR, respectively, * p =0.02; 0.89 \pm 0.08 vs 0.65 \pm 0.20 arbitrary densitometric units for DM-SHR tempol vs DM-SHR, respectively, # p =0.04). (B) The enzyme activity of Cu-Zn SOD measured in retinal protein using a kit from Cayman Chemical. The standard curve was generated using quality controlled SOD standard. Each sample was analyzed in each least triplicate. (0.004 \pm 0.001 vs 0.008 \pm 0.001 units of SOD/mg protein for DM-SHR vs WKY rats, respectively, * p =0.002; 0.004 \pm 0.001 vs 0.009 \pm 0.002 units of SOD/mg protein for DM-SHR vs CT-SHR rats, respectively, * p =0.001; 0.007 \pm 0.002 vs 0.004 \pm 0.001 units of SOD/mg protein, for DM-SHR tempol vs DM-SHR, # p =0.01). (C) Concentration of reduced glutathione (GSH) from the retinas of studied rats (μ M glutathione/ μ g of retinal protein). The GSH was not affected by the presence of hypertension or short term of diabetes and the treatment with tempol increased its levels. # p =0.01.

Figure 5

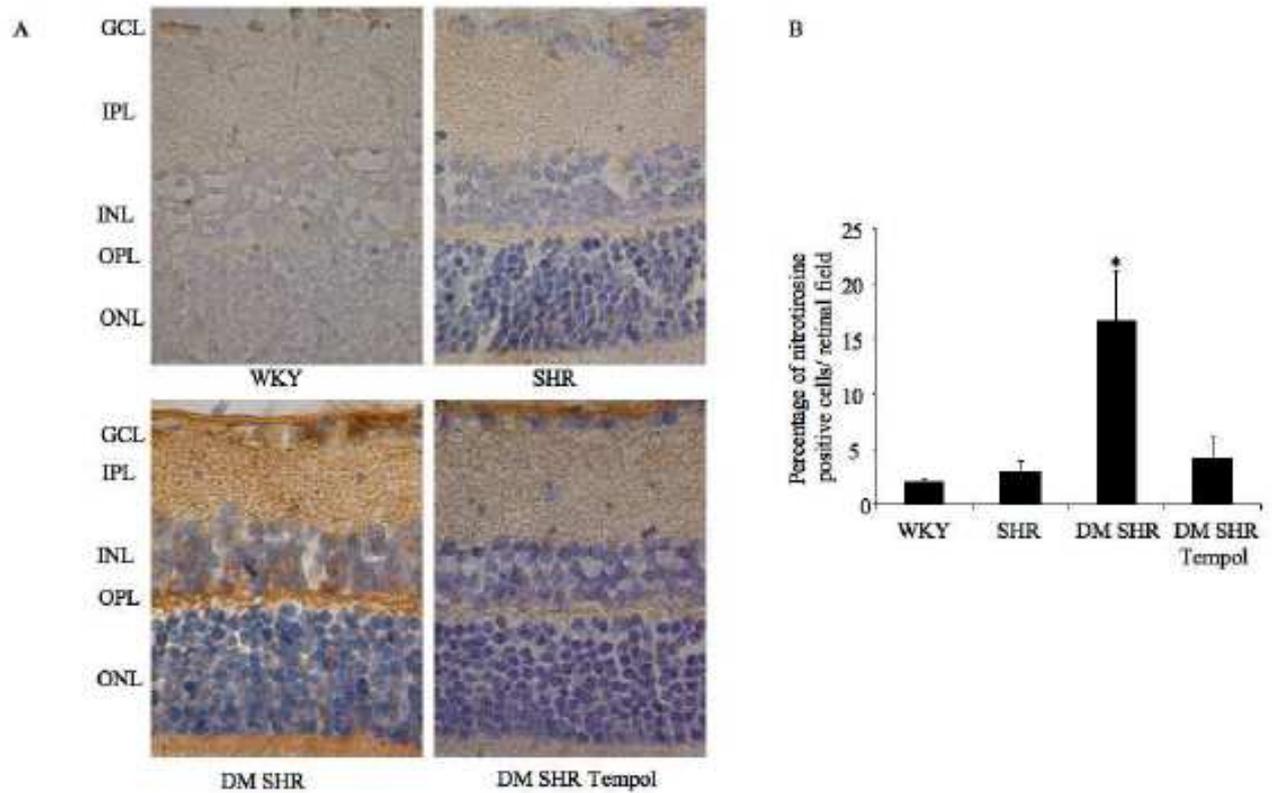


Figure 5. Representative photomicrographs of immunolocalization of nitrotyrosine. Presence of nitrotyrosine is indicated in brown color. Bars represent mean \pm SD of percentage of positive/ mm² of retina. (2.03 \pm 0.3 vs 16.7 \pm 4.5 percentage of positive/ mm² of retina WKY vs DM-SHR rats, * p <0.0001; 3.03 \pm 0.8 vs 16.7 \pm 4.5 percentage of positive/ mm² of retina CT-SHR vs DM-SHR rats, * p =0.0001; 3.03 \pm 0.8 vs 4.1 \pm 1.0 percentage of positive/ mm² of retina CT-SHR vs DM-SHR tempol treated rats, * p =0.6).

Figure 6

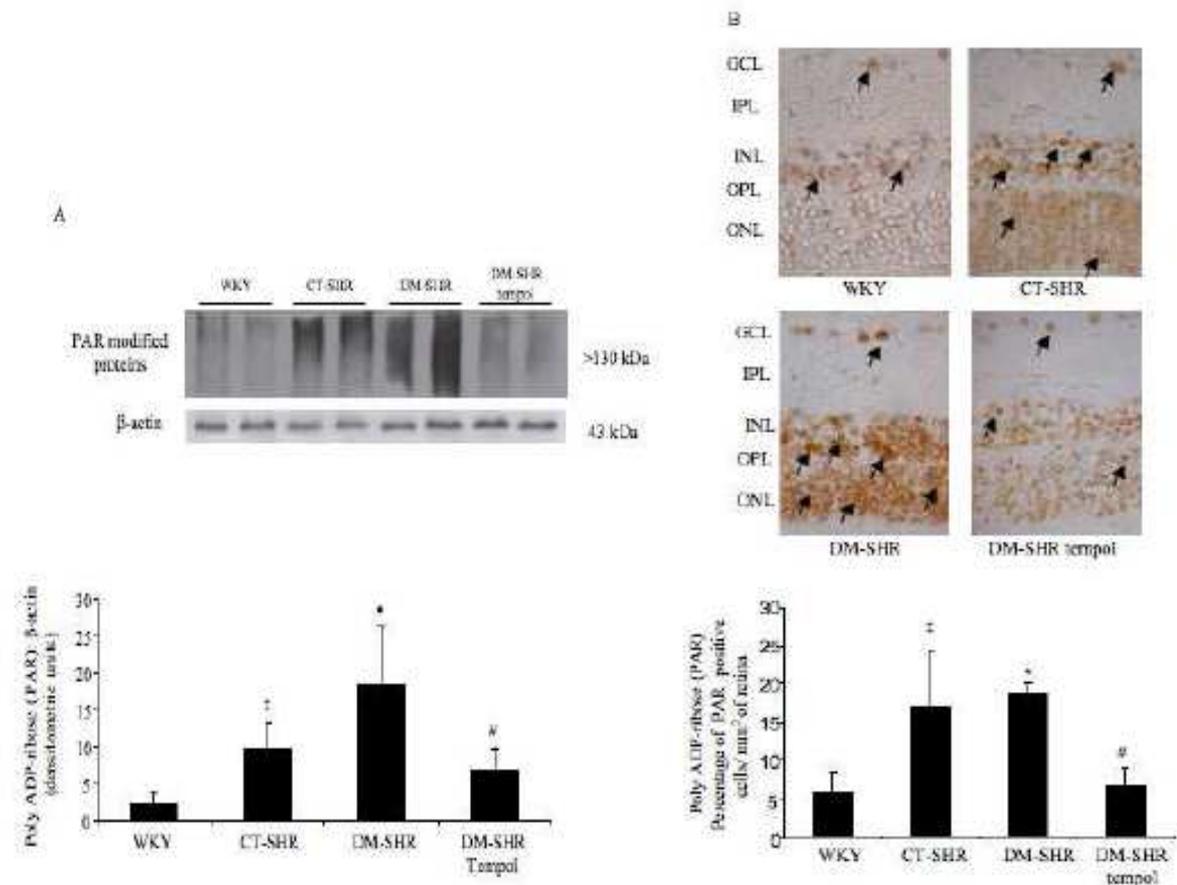


Figure 6. (A) Western blot of retinal lysates for PAR modified proteins from studied rats. The membranes were reprobbed with anti- β -actin antibody as a control for protein loading. Bars represent mean \pm SD of the band densities of the PAR modified proteins / β -actin ratio expressed in arbitrary densitometric units. (2.4 \pm 1.5 vs. 9.8 \pm 3.2 arbitrary densitometric units for WKY vs. CT-SHR rats, respectively, $\#p=0.04$; 2.4 \pm 1.5 vs. 18.3 \pm 7.8 arbitrary densitometric units for WKY vs. DM-SHR rats, respectively, $*p<0.0001$; 9.8 \pm 3.2 vs. 18.3 \pm 7.8 for CT-SHR vs. DM-SHR rats, respectively, $*p=0.02$; and 9.8 \pm 3.2 vs. 6.6 \pm 3.1 for CT-SHR vs. DM-SHR tempol treated rats, respectively, $\#p=0.3$). (B) Representative photomicrograph of immunolocalization of poly (ADP-ribose) polymer positive cells in retinal sections. The presence of immunoreactivity of PAR is indicated by a dark brown nucleus. Bars represent mean \pm SD of the percentage of positive cells/mm² of retina. (5.8 \pm 2.5 vs. 16.8 \pm 7.6 percentage of positive cells/mm² of retina WKY vs. CT-SHR rats, respectively, $\#p=0.01$; 5.8 \pm 2.5 vs. 18.6 \pm 1.5 percentage of positive cells/mm² of retina WKY vs. DM-SHR rats, respectively, $*p=0.006$; and 5.8 \pm 2.5 vs. 6.7 \pm 2.3 percentage of positive cells/mm² of retina WKY vs. DM-SHR tempol rats, respectively, $\#p=0.7$).

Figure 7

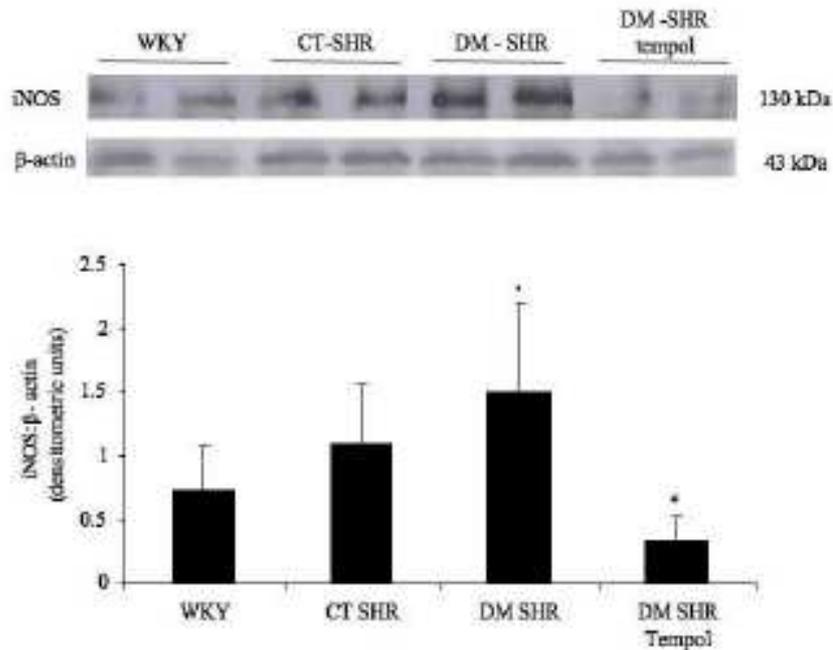


Figure 7. Western blot of retinal lysates for iNOS from studied rats. The membranes were reprobbed with anti-β-actin antibody as control for protein loading. Bars are representing mean±SD of band densities of iNOS/β-actin ratio expressed in arbitrary densitometric units. (1.1 ± 0.4 vs 0.7 ± 0.3 arbitrary densitometric units for CT-SHR vs WKY rats, respectively, $p=0.26$; 1.5 ± 0.7 vs 1.1 ± 0.4 arbitrary densitometric units for DM-SHR vs CT-SHR rats, $p=0.17$; 1.5 ± 0.7 vs 0.7 ± 0.3 arbitrary densitometric units for DM-SHR vs WKY rats, $*p=0.04$; 1.5 ± 0.7 vs 0.3 ± 0.2 arbitrary densitometric units for DM-SHR vs DM-SHR tempol, respectively, $*p=0.001$; 0.7 ± 0.3 vs 0.3 ± 0.2 arbitrary densitometric units for WKY vs DM-SHR tempol, respectively, $\#p=0.25$).