

**Projeto: “Avaliação de fenômenos oxidativos na patogênese da retinopatia diabética: possível papel da hipertensão na exacerbação da retinopatia diabética”**

**1. Resumo**

Há diversos estudos de diabetes que mostram a importância da produção das espécies reativas do oxigênio (ROS) na patogênese da retinopatia diabética (RD). O objetivo desse projeto é caracterizar os efeitos decorrentes da produção da ROS nas fases iniciais da RD, em modelos que combinam hipertensão arterial (HA) geneticamente determinada e diabetes mellitus experimental. Animais e Métodos. São utilizados ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) com 4 semanas de idade. A indução do diabetes mellitus (DM) será através de injeção de estreptozotocina (Sigma, St Louis, MO, USA), na dose de 50 mg/Kg, na veia caudal e incluídos no estudo animais com glicemia acima de 270 mg/dl. Os experimentos são realizados nos animais controles e diabéticos com 20 dias de duração do DM. Nos grupos de estudo, serão quantificadas as expressões do 8-OHdG através de ensaios de imunohistoquímica, avaliada a expressão e a ativação do fator nuclear NF-kB sub unidade p65 e verificada a expressão de nitrotirosina, biomarcador de peroxinitrito através de ensaios de Western blot, quantificado os níveis de glutathiona reduzida, um dos maiores sistemas defensivos da retina, medida pelo espectrofotômetro no tecido retiniano, e quantificar a produção de ânion superóxido na retina através de quimioluminescência dependente de luciferina.

**2. Introdução**

A primeira causa de casos novos de cegueira em pessoas em idade produtiva nos

EUA é a retinopatia diabética (RD) que acomete pacientes com diabetes mellitus (DM) (1) . Projeções da incidência do DM da Organização Mundial de Saúde para o ano de 2030 em países com desenvolvimento mostram um aumento em torno de 200%, o que coloca o DM e suas complicações como uma preocupação de Saúde Pública (OMS 2003). Após 15 anos de duração desta complicação crônica microvascular, um subgrupo de 60% do total dos pacientes doentes irão apresentar a forma proliferativa (2) , o que sugere existir suscetibilidade de um sub grupo de pacientes ao desenvolvimento de formas graves da RD. O fator primário mais importante e necessário ao desenvolvimento da RD é a hiperglicemia (3). Foi demonstrada considerável redução no desenvolvimento e progressão de complicações microvasculares, em pacientes diabéticos tipo 1 com controle metabólico rigoroso em comparação ao grupo de pacientes sob tratamento metabólico convencional (4) .Outros ensaios importantes demonstraram que a hipertensão arterial (HA) é o fator independente mais importante associado à RD, depois da hiperglicemia (5,6). Estas evidências sugerem fortemente que a pressão arterial e a hiperglicemia refletem importante efeito sobre a incidência e progressão de complicações microvasculares retinianas. O contra transporte de  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  (CT  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ ) em hemácias, marcador genético de predisposição da hipertensão arterial (7) , representa o modelo de funcionamento da bomba de  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}^+$  nas membranas celulares. Este é um transportador de cátions transmembrana envolvido em eventos celulares básicos, como o controle de Ph e volume celular, resposta a fatores de crescimento e citocinas (7).Em estudos transversais e recentemente num estudo prospectivo longitudinal, a atividade do CT  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  esteve associada ao desenvolvimento da nefropatia diabética, mais recentemente foi demonstrado que o CT  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  também está associado à presença de RD proliferativa em pacientes diabéticos tipo 1 (8), sugerindo que a genética da hipertensão possa ser importante no desenvolvimento das formas graves da RD.

Numerosos estudos de diabetes e suas complicações suportam a idéia de que há uma associação entre diabetes e estresse oxidativo (9). Foi relatado que o estresse oxidativo pode contribuir para a patogênese da RD, pois a administração de antioxidantes para animais diabéticos inibe significativamente o desenvolvimento de lesões precoces características da RD, tais como capilares acelulares e perda de pericitos (10). O excesso de glicose conduz a um elevado número de elétrons na mitocôndria, resultando na hiperpolarização da membrana mitocondrial e formação dos radicais livres. Essa sobrecarga de elétrons na cadeia respiratória na mitocôndria gera disfunção mitocondrial, com a diminuição de sua função (11). Em pacientes diabéticos tipo 2, o aumento da produção dos radicais livres e a diminuição dos mecanismos antioxidantes têm estreita ligação com as complicações microvasculares do DM (12). Recentemente, estudos estão demonstrando o papel do peroxinitrito na disfunção vascular de diabéticos. Peroxinitrito é um oxidante altamente reativo formado pela rápida combinação de óxido nítrico com ânion superóxido. Essa formação inicia uma variedade de processos patológicos incluindo a nitração da proteína tirosina, a inibição de enzimas metabólicas chaves, redução das defesas antioxidantes celulares pela oxidação de grupos thiol e indução da quebra de fita DNA, levando a apoptose, esse dano pode ser mensurado através da quantificação de 8-hidroxi-dioxi-guanosina (8OHdG) considerado um bom marcador de dano oxidativo do DNA. Por ter meia-vida curta, o peroxinitrito não pode ser medido, mas a nitrotirosina pode servir como seu biomarcador. Análises mostram que a formação de nitrotirosina em retina de ratos diabéticos e no plasma de pacientes diabéticos têm evidenciado o papel do peroxinitrito nas complicações vasculares no diabetes (13). O aumento da concentração de glicose (14) e o estresse oxidativo, através da produção das espécies reativas do oxigênio (ROS) ativam o fator de transcrição nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B). Este fator após fosforilado

pela ROS no citosol celular, se dirige ao núcleo regulando a transcrição de RNA mensageiros envolvidos com a produção de moléculas de adesão, crescimento e proliferação celulares e resposta inflamatória (15, 16, 17) que contribuem com o desenvolvimento e progressão das complicações vasculares associadas à RD.

A retina possui alguns mecanismos defensivos que reduzem o estresse oxidativo. Estudos demonstram que mecanismos enzimáticos envolvidos na proteção contra o estresse oxidativo estão diminuídos na retina de diabéticos. A forma reduzida da glutathiona é um dos maiores sistemas defensivos da retina. As atividades enzimáticas envolvidas na manutenção dos níveis da glutathiona reduzida (GSH) têm apresentado anormalidade em vários tecidos na hiperglicemia. O ânion superóxido é uma espécie reativa de oxigênio (ROS) gerado a partir da molécula de oxigênio pela adição de um elétron, apesar de ser um radical livre, não é altamente reativo, pois não consegue penetrar em membranas celulares, ficando restrito ao compartimento onde é produzido (18). O ânion superóxido parece ser o produto primário do sistema de produção de ROS, gerando o peróxido de hidrogênio após reações enzimáticas (19). De acordo com estes autores, a formação do superóxido acontece espontaneamente, em ambientes aeróbicos, ricos em elétrons, próximo à membrana mitocondrial interna, que ocorre devido ao escape de elétrons da cadeia respiratória. A lucigenina permanece no meio extracelular e é oxidada preferencialmente pelo ânion superóxido.

### **3. Animais e métodos**

Ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) com 4 semanas de idade. Com 4 semanas, os animais SHR apresentam a genética da hipertensão, mas não a hipertensão arterial “per se”. Todos os

experimentos seguem as orientações da Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia sobre a utilização de animais e foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (protocolo 446-2). Os animais são 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 são anestesiados com pentobarbital sódico 3% (30mg/Kg Hipnol®, Fontoveter, Itapira, Brasil) intraperitonealmente.

A indução do DM é realizada através da injeção de estreptozotocina (Sigma, St Louis, MO, USA), na dose de 50 mg/kg, na veia caudal, dissolvida em tampão citrato 0,5 M, pH 4,5, após 48 horas a confirmação da presença do diabetes mellitus é feita através da glicemia pelo método da glicose oxidase (Precision QID, Abbott) e incluídos no estudo animais com glicemia acima 15 mmol (270 mg/dl). Os animais do grupo controle recebem injeção endovenosa de tampão citrato, seguindo exatamente o mesmo protocolo utilizado para o grupo diabético. A pressão arterial sistólica é determinada na cauda dos ratos, que ficam restritos, aquecidos a 39°C, não anestesiados e acostumados ao procedimento, utilizando-se pletismógrafo (Narco Bio System, Houston, Tx, USA). São realizados experimentos nos diferentes grupos de animais: SHR e WKY machos com seus respectivos controles com 4 semanas de idade, mantidos diabéticos por 20 dias.

Na segunda etapa do projeto, onde realizaremos o tratamento dos animais, estes serão divididos em dois grupos, que receberão Bloqueador do receptor de angiotensina II 200mg/l (Coazar -Losartana potássica-Merck Sharp & Dohme) que atua no sistema renina angiotensina (SRA).

**-Extração de proteína retiniana para investigar a expressão do fator nuclear NF-κB e a nitrotirosina através de ensaios de Western blot neste modelo**

**experimental:** Para extração de proteína retiniana, as retinas são isoladas do epitélio pigmentado da retina (EPR) e transferidas para tampão de homogeneização (30 mmol Tris-HCL, 10 mmol/l EGTS, 5 mmol/l EDTA, 1% Triton X-100, 250 mmol/l sucrose e 1 mmol/l fenilmetilsulfonil Fluorido, pH 7.5) suplementado com coquetel de inibidores de protease (Complete®, Boehringer Mannheim, Germany) . O homogeneizado é submetido às ondas de ultra-som, 3 vezes por 5 segundos. Após centrifugação, 9000 rpm por 10 minutos a 15°C, uma alíquota de 10 µl será separada para quantificação da proteína total pelo método de Bradford, utilizando como padrão albumina bovina sérica. O restante do homogeneizado será 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.

**-Preparação dos extratos nucleares para investigar a ativação do fator nuclear NF-Kb p65 através de ensaios de Western blot neste modelo experimental:** Pool de 8 retinas serão utilizadas para obtenção de material nuclear. As retinas são isoladas e imediatamente imersas no tampão A (20 mM Tris [pH 7.6], 10 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 20% [do volume] glicerol, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, e inibidor de protease) (5x o volume das retinas) em um potter pequeno para serem homogeneizadas. O núcleo é peletizado, a 2500g à 4°C por 10 minutos, e ressuspendido com tampão B (idem tampão A exceto KCl que aumentou para 0,42M) (2x o volume do pellet). É feita centrifugação deste homogeneizado a 15000g à 4°C por 20 minutos. Uma alíquota de 10 µl é separada para quantificação da proteína pelo método de Bradford, utilizando como padrão albumina bovina sérica. O restante do homogeneizado é 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.

**-Eletroforese para quantificação da Nitrotirosina e da subunidade p65 do NF-kB em proteína total e extrato nuclear de retina :** Amostras de 30 µg de proteína (NF-kB), 50 µg de extrato de proteína nuclear (NF-kB) e 40 µg (Nitrotirosina) são submetidas a eletroforese em gel de 10% SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, as proteínas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad). Em seguida, é realizado bloqueio inespecífico com leite 5% diluído em PBS e Tween 20 a 1%; a seguir as membranas então incubadas com anticorpo de coelho policlonal anti NF-kB p65 (1:500; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA), anticorpo de camundongo monoclonal anti-nitrotirosina (1:2000; Upstate, NY) por 1 hora na temperatura ambiente, seguido de incubação com anticorpo anti IgG coelho conjugada com HRP (1:10.000 para NF-kB ; Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ ), anticorpo anti IgG camundongo conjugada com HRP (1:10.000 para Nitrotirosina; Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ ). Os sinais são visualizados através de quimiluminescência (SuperSignal™ CL-HRP Substrate System, Pierce, Rockfor, IL), de acordo com as instruções do fabricante, e posteriormente autoradiografadas.

**-Preparação dos globos oculares para estudos de imunohistoquímica:** Os animais são sacrificados com overdose de pentobarbital sódico 3% (30mg/Kg Hipnol®, Fontoveter, Itapira, Brasil) intraperitonealmente e os olhos enucleados. Os olhos destinados para estudos de imunohistoquímica, são fixados em methacarn (clorofórmio 30%, ácido acético 10%, metanol 60%) por no máximo 24 horas e então transferidos para álcool 70% por 24 horas. A seguir, são fixados em parafina e realizados cortes transversais de 4 micra de espessura. Os cortes são montados em lâminas tratadas com selane.

**-Imunohistoquímica para detecção de células 8-OHdG positivas na retina:** É realizada desparafinização, re-hidratação, recuperação antigênica com aquecimento em microondas e

bloqueio das ligações inespecíficas com leite desnatado 1% em PBS; a seguir as lâminas foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti 8-Hydroxy-2'-dioxiguanosine (Jaica, Japão) 1:50 em BSA 1% e 10% de soro de rato normal à 4°C overnight; após 3 lavagens em PBS, polímero marcado com fosfatase alcalina conjugado com anticorpo de cavalo anti IgG de rato conjugado de biotina (1:200, Vector, Burlingame, CA) é aplicado por 1 hora em temperatura ambiente. As lâminas são então incubadas com complexo avidina-biotina (ABC) (Vector) seguido pela adição de diaminobenzidina tetrahydroclorido (DAB) (Sigma). Os cortes são contra-corados com hematoxilina, reidratados e montados com entellan; controle negativo é obtido omitindo-se o anticorpo primário.

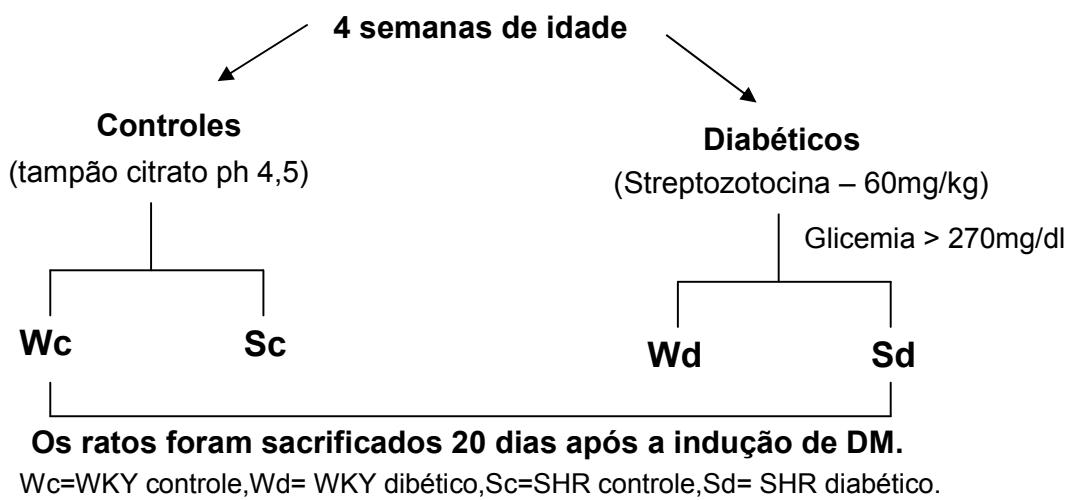
**-Ensaio para análise da glutathiona reduzida:** Os animais são sacrificados com overdose de pentobarbital sódico 3% (30mg/Kg Hipnol®, Fontoveter, Itapira, Brasil) intraperitonealmente e os olhos enucleados. As retinas serão isoladas do epitélio pigmentado da retina e transferidas para a solução 10% TCA adicionado de 5mM de EDTA. O homogeneizado será submetido às ondas de ultra-som, 3 vezes por 5 segundos. Após centrifugação, 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante será adicionado em 1ml de tampão fosfato e 125ml de DTNB. Será obtida uma curva padrão para determinar a concentração da glutathiona reduzida no tecido retiniano

**-Lucigenina:** Os animais são sacrificados com overdose de pentobarbital sódico 3% (30mg/Kg Hipnol®, Fontoveter, Itapira, Brasil) intraperitonealmente e os olhos enucleados. As retinas serão isoladas do epitélio pigmentado da retina e transferidas para tubo de polipropileno contendo 237µl de tampão Krebs-HEPES; Serão incubadas no escuro a 37°C em 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub> para período de equilibração 30min. Após a equilibração, será adicionado 0.5mM de lucigenina no tubo (13 µl) no escuro; A leitura será realizada no luminômetro (a emissão do fóton é medida após 10 segundos, medidas repetidas

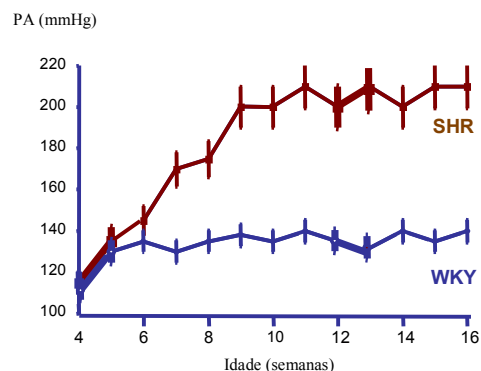
completando um período de 10 min). Será feito um tubo apenas com tampão Krebs-HEPES e lucigenina e esse valor desse ser diminuído das outras leituras. Após leitura, será medida a concentração de proteína pelo método de Bradford.

#### 4. Discussão e Resultados:

##### a. Descrição dos animais utilizados na primeira etapa



**Figura 1.** Desenvolvimento da pressão sistólica em animais SHR e WKY de acordo com a idade)



Os animais SHR começam a desenvolver hipertensão arterial com 5 semanas de vida, já apresentando um nível de pressão considerado como hipertensão espontânea entre a

7º e 15º semanas de vida, atingindo um platô entre a 20º e 28º semanas, não havendo influência sexual nesse desenvolvimento (20). A **Figura 1** mostra o desenvolvimento da pressão dos animais WKY e SHR de acordo com a idade nela é possível ver que no período estudado já há uma significativa diferença de pressão entre os modelos estudados. É, portanto considerado um bom modelo de hipertensão arterial essencial ou mesmo modelo para estudar a genética da hipertensão na ausência desta (nas idades entre 4 e 7 semanas de vida)

**Tabela 1. Características Gerais dos Grupos Estudados.**

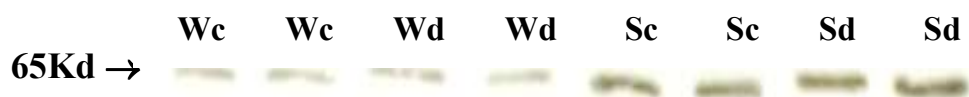
Grupos	4 semanas+20dias DM			
	peso inicial (g)	peso final (g)	pressão (mmHg)	glicemia (mg/dl)
Wc, n=5	108±2,0	245±15,9	127±2,7	189±26,5
Wd, n=7	114±6,7	173±13,4 <sup>π</sup>	127±2,6	539±35 <sup>▲</sup>
Sc, n=4	69±5,4 <sup>*</sup>	181±12,4	150±17,6 <sup>♦</sup>	170±8,4
Sd, n=7	67±3,5 <sup>*</sup>	116±16,4 <sup>π</sup>	157±14,2 <sup>♦</sup>	547±53 <sup>▲</sup>

P<0,005 <sup>\*</sup>WKY CT vs SHR CT, <sup>π</sup>WKY CT vs WKY DM, <sup>♦</sup>SHR CT vs SHR DM

Os animais utilizados no estudo possuíam 4 semanas de idade e 20 dias de duração do DM. Os animais SHR apresentaram pressão sistólica mais elevada em comparação com os animais normotensos (WKY) (p<0.001) e os diabéticos, com glicemia de jejum mais alta que os grupos controle não diabéticos (p<0.001). A aferição das pressões foi realizada por mim cerca de 4 dias antes do sacrifício, e a glicemia medida na véspera no sacrifício, 19 dias após a indução da DM.(tabela 1)

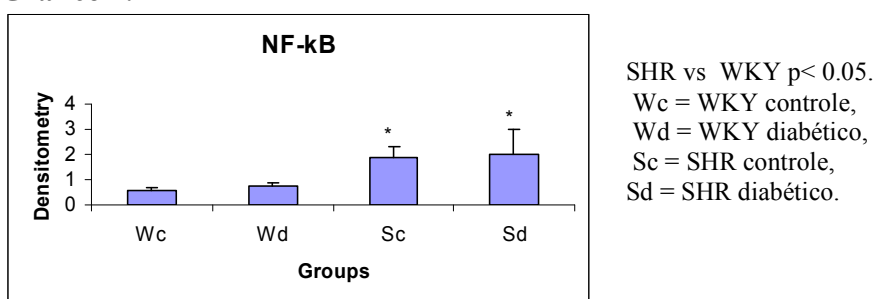
**b. Investigação da expressão e a ativação do NF-kB (subunidade p65) através de ensaios de Western blot:**

**Figura 2. Atividade do NF-kB através da expressão da fração nuclear da subunidade p65 do NF-kB na retina por western blot.**



Obtivemos um bom resultado, com um filme sem “background” e banda única na altura esperada (65kD). Nesse filme podemos ver que expressão da fração nuclear da subunidade p65 do NF-kB na retina foi maior nos grupos SHR (hipertensos) quando comparados com os animais WKY.(Fig.2)

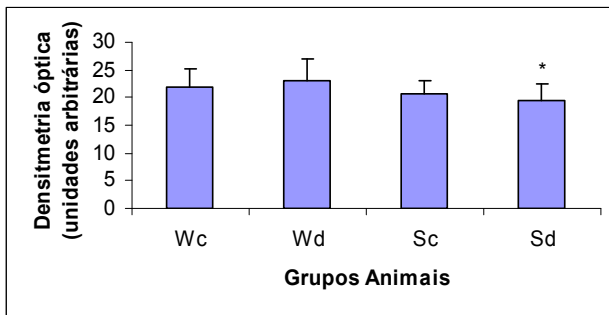
**Gráfico 1.**



Conforme podemos ver no gráfico 1 houve um aumento significativo nos níveis de NF-kB dos animais hipertensos (SHR) em relação aos animais normotensos (WKY) tanto nos animais controle quanto nos animais diabéticos ( $p < 0.05$ ), evidenciando a relação entre a hipertensos. Podemos ver também que há um discreto aumento dos níveis de NF-kB dos animais diabéticos em relação aos seus controles, porém sem significância estatística.

**c. Investigação da expressão de glutathiona reduzida em tecido retiniano através de ensaios colorimétricos.** A avaliação da glutathiona reduzida, importante sistema antioxidante presente na retina, por ensaios de colorimetria utilizando o espectrofotômetro demonstrou diminuição de sua expressão nos grupos de animais diabéticos e hipertensos em relação aos diabéticos normotensos (Sd vs Wd,  $p = 0.04$ ) conforme mostrado no **Graf.2**.

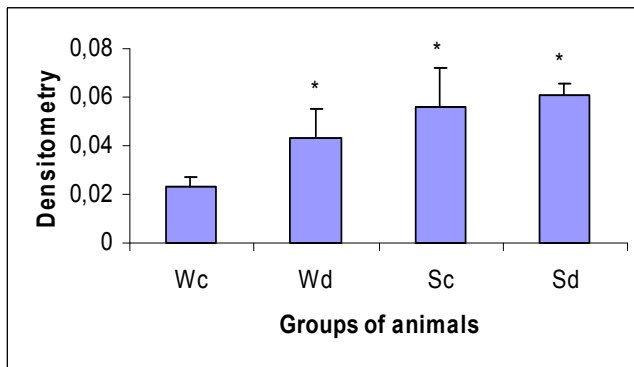
**Gráfico 2.** Gráfico representativo do ensaio colorimétrico



Sd vs Wd  $p=0.04$   
 Wc = WKY controle,  
 Wd = WKY diabético,  
 Sc = SHR controle,  
 Sd = SHR diabético.

**d. Avaliação de produção de radicais superóxidos na retina através de método luminométrico com lucigenina:**

**Gráfico 4.**

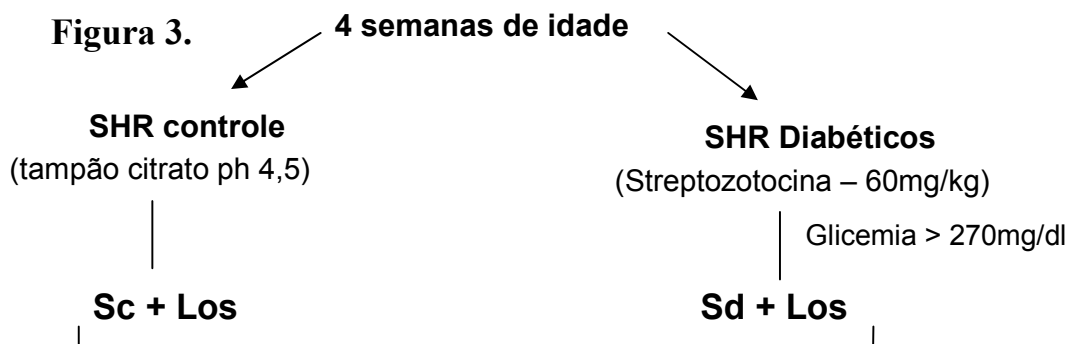


\* $P=0,01$  vs Wc  
 Wc= WKY controle,  
 Wd = WKY diabético,  
 Sc = SHR controle,  
 Sd = SHR diabético

O ensaio demonstrou que houve um aumento significativo na produção de ânion superóxido nos animais hipertensos, e nos animais diabéticos. Quando comparamos os resultados encontramos aumento significativo nos animais WKY diabético, SHR controle e SHR diabético em relação aos WKY controle ( $p=0.01$ ), e também houve um aumento nos animais SHR diabéticos em relação aos WHY controles ( $p < 0,02$ ). **(Graf.4)**

**Os novos grupos de animais introduzidos no estudo:**

Foram acrescentados ao estudo mais dois grupos de animais, ambos SHR com 4 semanas de idade, um grupo diabético, e outro controle, e todos foram tratados com Losartan 200mg/l por 20 dias **(Figura 3)**.



Os ratos foram sacrificados 20 dias após a indução de DM e tratamento com Losartan (200 mg/l).

Esses animais tiveram suas pressões, pesos e glicemias medidos e comparados com os grupos da primeira etapa do estudo (**Tabela 2** – em itálico grupos participantes da primeira etapa do estudo, em vermelho, grupos acrescentados).

Ao compararmos os grupos, podemos ver que os animais diabéticos (Wd,Sd,Sd+los) tiveram seus pesos finais significativamente menores que os animais não diabéticos (Wc,Sc,Sc+los), confirmando uma manifestação já conhecida da diabetes, a perda de peso (**Tabela 2**).

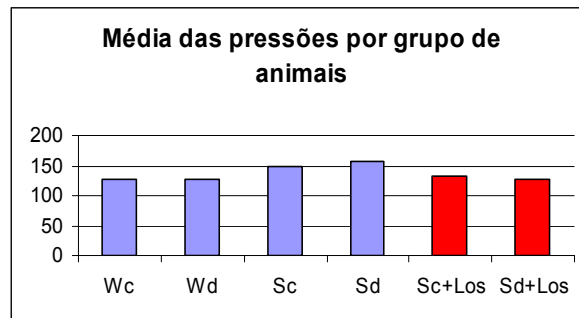
**Tabela 2.**

Grupos	4 semanas+20dias DM			
	peso inicial (g)	peso final (g)	pressão (mmHg)	glicemia (mg/dl)
<i>Wc, n=5</i>	<i>108±2,0</i>	<i>245±15,9</i>	<i>127±2,7</i>	<i>189±26,5</i>
<i>Wd, n=7</i>	<i>114±6,7</i>	<i>173±13,4</i>	<i>127±2,6</i>	<i>539±35</i>
<i>Sc, n=4</i>	<i>69±5,4</i>	<i>181±12,4</i>	<i>150±17,6</i>	<i>170±8,4</i>
<i>Sd, n=7</i>	<i>67±3,5</i>	<i>116±16,4</i>	<i>157±14,2</i>	<i>547±53</i>
<b>Sc+Los n=5</b>	<b>103,6±8,8</b>	<b>162,8±7,6</b>	<b>131,5±11,9</b>	<b>168,8±11,8•</b>
<b>Sd+Los n=7</b>	<b>112,5±8,6</b>	<b>99,2±43,4</b>	<b>126,7±11,27</b>	<b>603,1±82,3•</b>

P<0,005 \*Wc vs Sc, <sup>π</sup> Wc vs Wd, <sup>♦</sup> Sc vs Sd, <sup>•</sup> Sc+los vs Sd+los

Também podemos notar também que entre os animais SHR, houve uma diminuição significativa da pressão dos animais tratados com losartan em relação aos não tratados (**Gráfico 5**), mostrando que os novos animais estudos atingiram o nível pressórico necessário para o estudo, confirmando que o tratamento instituído foi eficaz.

**Gráfico 5.**



$P < 0,005$  Sc X Sd+los; Sd X Sc+los; Sd X Sd+los; Wc X Sc+los; Wd X Sd+los; Sc+los X Sd+los

**a. Quantificação de 8-OHdG através de ensaio de imunohistoquímica**

Foram contadas as células positivas (células marcadas com uma seta na figura 4) encontradas em toda a extensão da retina, sem distinção por camada de células(**Figura 4**). A partir da porcentagem de células positivas de cada animal, foi calculada a média simples por grupo, e então as médias de cada grupos foram comparadas (**Gráfico 6**).

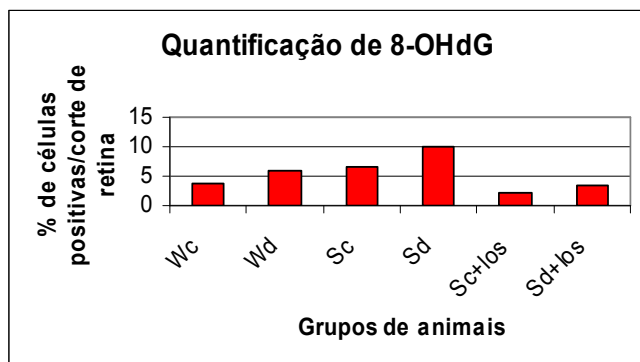
No **Gráfico 6** podemos observar que os grupos diabéticos apresentaram maior número de células positivas em comparação com seus respectivos controles. Estes resultados sugerem que a diabetes tem um importante papel na gênese da RD.

Quando comparamos o grupo WKY não diabético e normotenso, com o grupo SC, hipertenso porém não diabético, observamos um aumento significativo na porcentagem de células positivas nos animais hipertensos, o que mostra que isoladamente a hipertensão tem um papel importante na lesão oxidativa no DNA das células da retina. E quando comparamos o SC com os animais SD, hipertenso e diabéticos, observamos um aumento ainda mais expressivo no número de células positivas, o que mostra que há um efeito aditivo quando reunimos hipertensão e diabetes sobre ao dano no DNA da células retinianas. Podemos observar também que ao comparamos os animais SHR tratados com os não tratados, houver uma queda significativa na porcentagem de células positivas nos animais que receberam o antihipertensivo o que mais uma vez mostra que o aumento da

pressão contribui com a RD, e ao mesmo tempo nos evidencia que seu tratamento, levando à pressão para o níveis de normalidade é de grande valia para a prevenção da RD.

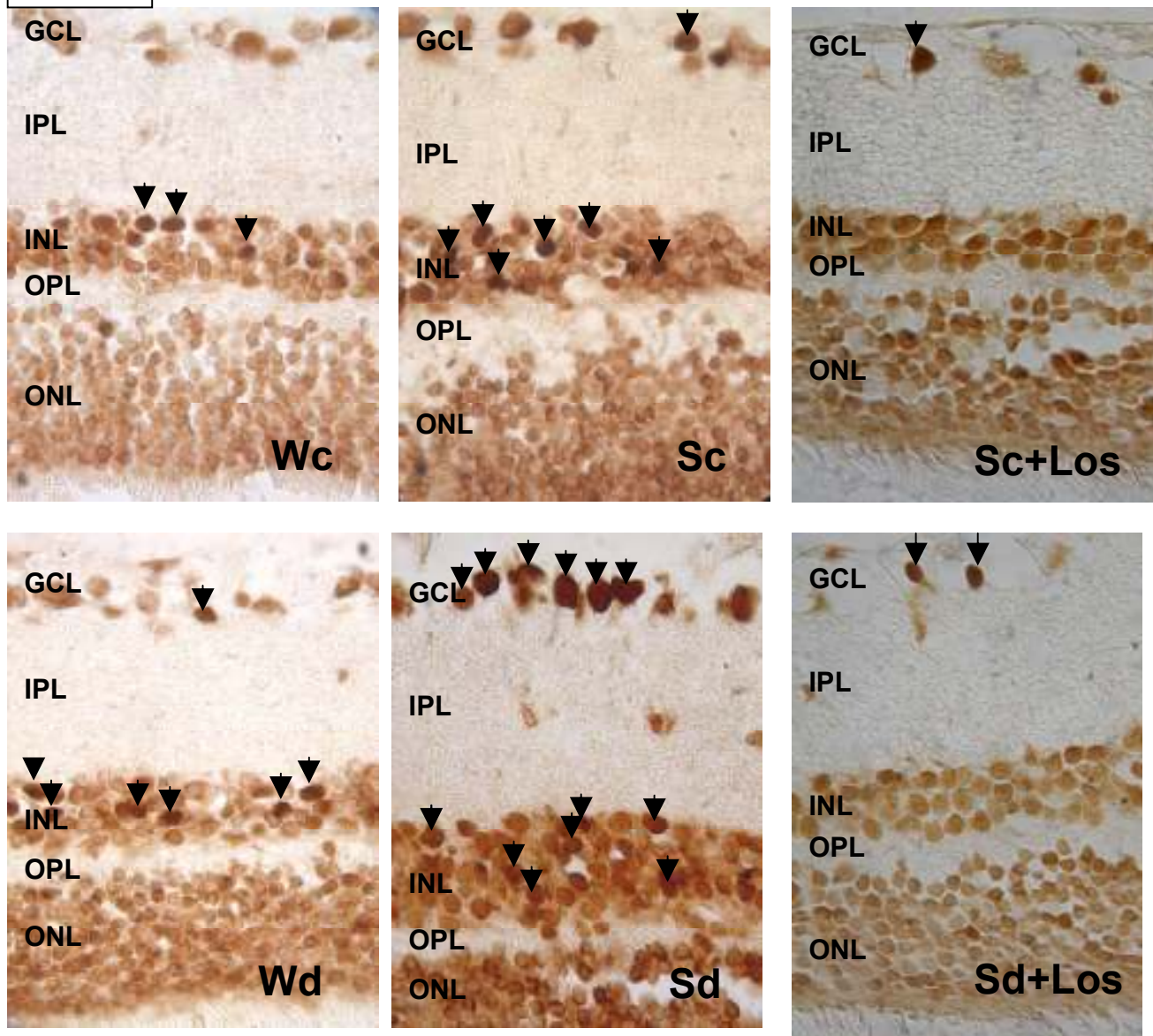
E ao confrontarmos o grupo WC, não diabético e não hipertenso, com o grupo SD+los, hipertenso tratado e diabético, podemos observar que no grupo tratado houve uma queda significativa na porcentagem de células positivas, o que pode apontar um possível efeito protetor específico da medicação (losartan) frente ao dano no DNA das células retiniana, dado que necessita de mais estudos para ser confirmado, porém tal questão não faz parte dos objetivos desse estudo, que não visa estudar ações específicas do antihipertensivo, e sim apenas o efeito da queda de pressão, por isso a opção por usar apenas um tipo de medicação nessa etapa do estudo.

**Gráfico 6.**



$P < 0,005$ : Wc X Wd, Wc X Sc, Wc X Sd, Wc X Sc+los, Wd X Sd, Wd X Sc+los, Wd X Sd+los, Sc X Sd, Sc X Sc+los, Sc X Sd+los, Sd X Sc+los, Sd X Sd+los, Sc+los X Sd+los

**Figura 4**



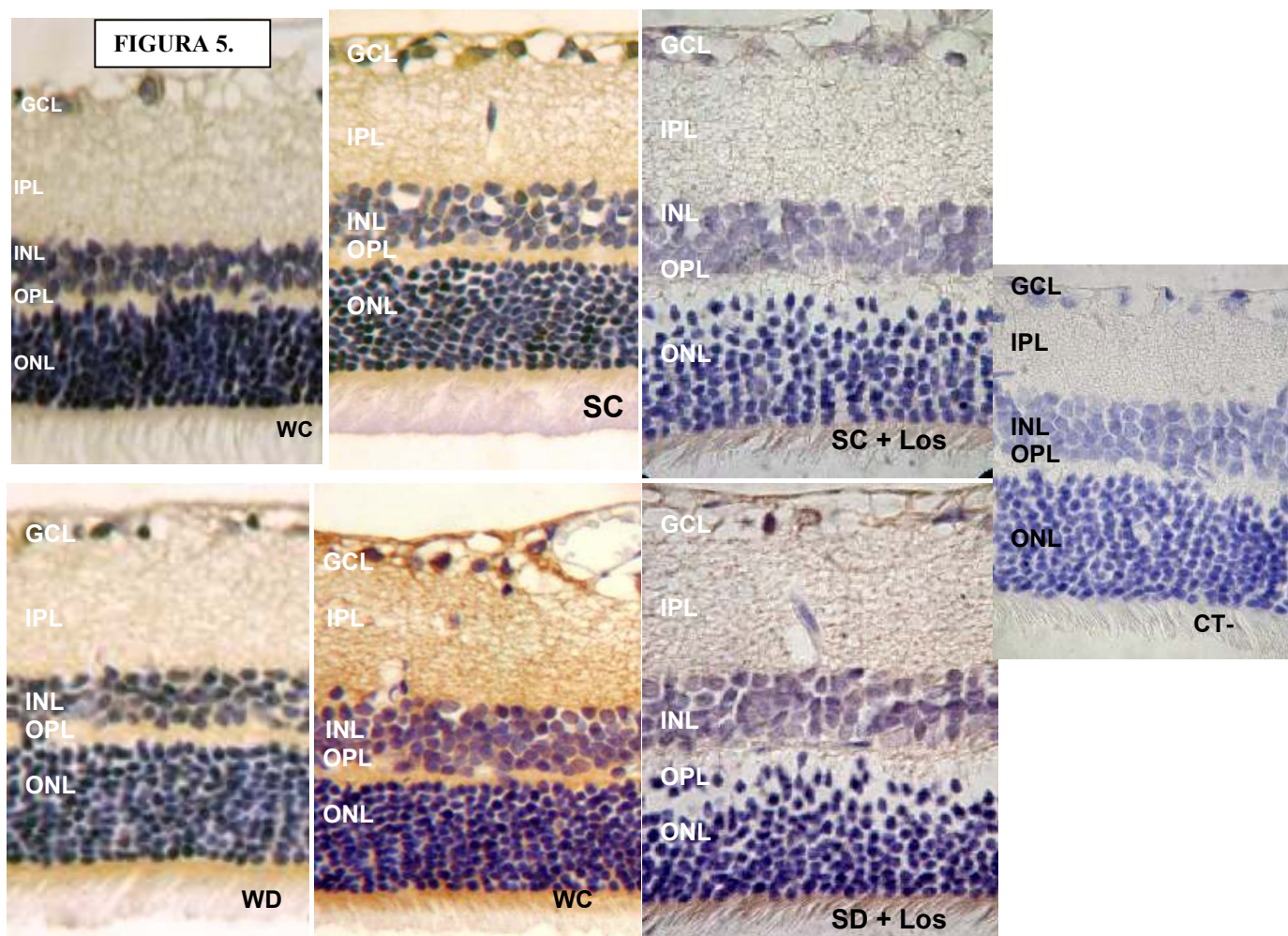
#### **b. Verificação da expressão de nitrotirosina**

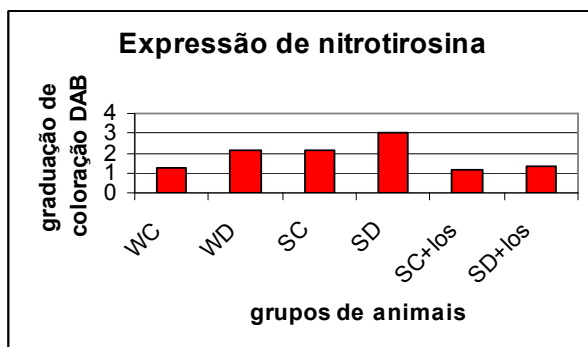
A quantificação da sua expressão foi feita graduando-se a coloração em 5 níveis diferentes de 0 à 4, onde zero representa a ausência de positividade, que é representada na figura pelo controle negativo, onde não foi possível visualizar o tom DAB (**Figura 5**), depois em tom crescente graduamos em 1,2,3 ou 4 as retinas. Assim obtivemos a média de tom por grupo, e em seguida as comparamos (**Gráfico 7**).

Ao compararmos as médias foi possível ver que houve aumento significativo da

expressão de nitrotirosina nos animais diabéticos em relação aos seus controles não diabéticos nos grupos WKY, e SHR não tratados, mostrando o efeito danoso da diabetes, porém tal resultado não foi visto no grupo SHR tratado com losartan.

Ao compararmos o grupo normotenso diabético (Wd) com o hipertenso diabético (Sd) podemos observar que houve um aumento significativo na expressão da nitrotirosina, o que mais uma vez indica efeito aditivo da hipertensão na gênese da RD. Quando analisamos os grupos tratados com losartan comparando-os com os grupos hipertensos não tratados podemos ver que houve queda significativa na expressão da NT. Entre os animais normotensos e não diabéticos não vemos diferença estatisticamente significativa, sugerindo que o tratamento da hipertensão teve um efeito positivo na diminuição da formação desse potente oxidante que atua de forma danosa nas células retinianas.





$P < 0,005$ : Wc X Wd, Wc X Sc, Wc X Sd, Wd X Sd, Wd X Sc+los, Wd X Sd+los, Sc X Sd, Sc X Sc+los, Sc X Sd+los, Sd X Sc+los, Sd X Sd+los

## 8. Conclusão

Podemos concluir que a hipertensão mesmo isoladamente representa um dano à retina, e que tal efeito é exacerbado na presença de hipertensão quando aliamos hipertensão e diabetes, aumentando consideravelmente o estresse oxidativo na retina, o que contribui diretamente na gênese da retinopatia diabética.

Numerosos estudos de diabetes e suas complicações suportam a idéia de que há uma associação entre diabetes e estresse oxidativo (10). Foi relatado que o estresse oxidativo pode contribuir para a patogênese da RD, pois a administração de antioxidantes para animais diabéticos inibem significativamente o desenvolvimento de lesões precoces características da RD (11). Porém estes mecanismos ainda não haviam sido estudados em modelos que combinam DM e hipertensão.

Este estudo pode ajudar no melhor entendimento dos mecanismos pelos quais a hipertensão agrava a retinopatia em pacientes diabéticos.

## 9. Bibliografia

- 1) Patz A, Smith RE. The ETDRS and Diabetes 2000. *Ophthalmology* 1991;98:1755-56.
- 2) Klein R, Klein BAK, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at

diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol* 1984;102:520-526.

3) The 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;329:977-86.

4) The DCCT Research Group: The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes* 1995;44:968-83.

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

6) Janka HU, Ziegler AG, Valsania P, Warram JH, Krolewski AS. Impact of blood pressure on diabetic retinopathy. *Diabete Metab.* 1989;15(5 Pt 2):333-7.

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

8) Lopes de Faria JM, Silveira LA, Morgano M, Pavin EJ, Lopes de Faria JB. Erythrocyte sodium-lithium countertransport and proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 May;41(6):1482-5.

9) Jagt DJV, Harrison JM, Ratliff DM, Hunsaker LA, Jagt DLV. Oxidative stress in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. *Clinical Biochemistry.* 2001;34:265-70.

10) Du Y, Miller CM, Kern TS. Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells. *Free Radical Biology & Medicine.* 2003;35:1491-99.

11) Vicent AM, Olzmann JA, Brownlee M, Sivitz WI, Russel JW. Uncoupling proteins prevent glucose-induced neuronal oxidative stress and programmed cell death. *Diabetes*

2004;53:726-34.

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

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

14) Pieper GM. Activation of NF-kappa B in cultured endothelial cells by increased glucose concentration: Prevention by calphostin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997;30:528-32.

15) Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kB in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12:141-79.

16) Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kB transcription factor and HIV-1. *EMBO* 1991;10:2247-58.

17) Lim J W, Kim H, Kim, K H. Nuclear factor-kappaB regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. *Lab.Invest.* 2001;81:349-60.

18) Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine.

Oxford: New York, 1999.

19) Nordberg, J.; Årner, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, s.L., v.31, n.11, p. 1287-1312, 2001.

20) Yamori Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. In: De Jong W (ed.). *Experimental and Genetic Models of Hypertension. Handbook of Hypertension.* Elsevier, 224-39, 1984.