

Pérola Del Bianco Ribaldo

“O chá verde (*Camellia sinensis*) atenua a nefropatia através da redução da expressão da subunidade NOX-4 da ND(P)H oxidase no diabetes mellitus experimental”

Campinas
2008

Pérola Del Bianco Ribaldo

“O chá verde (*Camellia sinensis*) atenua a nefropatia através da redução da expressão da subunidade NOX-4 da ND(P)H oxidase no diabetes mellitus experimental”

Dissertação de mestrado apresentada à pós-graduação da Faculdade de Ciência Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção de título de Mestre em Clínica Médica, na área de Ciência Básicas.

Orientador: *Profº Dr. José B. Lopes de Faria*

Campinas
2008

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

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

R351c Ribaldo, Pérola Del Bianco
“O chá verde (*Camellia sinensis*) atenua a nefropatia através da redução da expressão da subunidade NOX4 da ND (P)H oxidase no diabetes mellitus experimental” / Pérola Del Bianco Ribaldo. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : José Butori Lopes de Faria
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Nefropatias diabéticas. 2. Albuminúria. 3. Estresse oxidativo
4. Diabetes mellitus. 5. *Camellia sinensis*. I. Faria, José Butori
Lopes de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Green tea (*Camellia sinensis*) attenuates nephropathy by downregulating Nox4 NADPH oxidase in experimental diabetes mellitus

Keywords: • Diabetic nephropathy
• Albuminuria
• Oxidative stress
• Diabetes Mellitus
• *Camellia sinensis*

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Butori Lopes de Faria

Prof. Dr. Eduardo Homsí

Profa. Dra. Lílian Cuppari Valle

Data da defesa: 02 - 10 - 2008

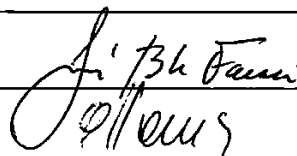
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Pérola Del Bianco Ribaldo

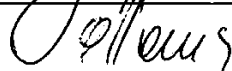
Orientador: Prof. Dr. José Butori Lopes de Faria

Membros:

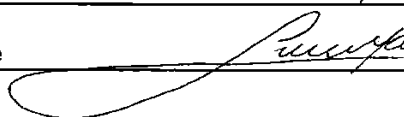
1. Prof. Dr. José Butori Lopes de Faria



2. Prof. Dr. Eduardo Homs



3. Prof^a. Dr^a. Lilian Cuppari Valle



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

Data: 02/10/2008

DEDICATÓRIA

*Pel***O** amor, dedicação e incentivo dos meus pais Carlos Alberto e Elisabete.
Às **B**elas demonstrações de amor, apoio e compreensão do meu noivo Marcão.
Ao **R**espeito, carinho e empenho de minha avó Rosa, durante minha formação.
Ao **I**ncentivo, auxílio e companheirismo de minhas irmãs, Patrícia e Priscila.
À **G**rande entusiasta de meus trabalhos com diabetes, minha Tia Margareth.
Ao **A**poio e credibilidade de meus cunhados, sobrinhos, amigos e pacientes.
Ao **D**iabético, real beneficiário dos meus constantes estudos e deste trabalho.
Eu **O**fereço este trabalho a todos vocês, que contribuíram para minha formação
pessoal e profissional, incentivando minha busca à realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de maneira muito especial, ao meu orientador **Profº Dr. José Butori Lopes de Faria** por sua extrema atenção, dedicação e orientação no desenvolvimento dos meus trabalhos, artigo e esta dissertação. Seu empenho e auxílio foram apreciáveis e fundamentais para minha formação como mestre, exercendo com plenitude seu papel de orientador.

Às minhas amigas Kamila Silva e Camila Pinto pela agradável acolhida, pelos preciosos ensinamentos e pelos momentos de descontração.

À Denise Souza pelo auxílio, empenho e cuidado na obtenção de resultados.

Ao Subrata Biswas pelo apoio, treinamento e pelo desenvolvimento de técnicas tão importantes ao meu trabalho.

Aos amigos Bruno Pessoa, Mariana Rosales, Elisa Peixoto, Aline Faria e Christine Marinho pelo auxílio, carinho e torcida, que por muitas vezes me motivaram à acreditar e buscar sempre mais.

Aos amigos Felipe Val, Renata Serrer e Adriana Mattos pela assistência na realização de vários experimentos.

À Prof^a Dra. Jacqueline Mendonça Lopes de Faria pelas valiosas sugestões e orientações, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À todos os integrantes do Laboratório de Fisiopatologia Renal que fazem dele um ambiente harmonioso, de amizade e ajuda mútua.

À nutricionista Prof^a Dra. Lílian Cuppari, minha referência profissional, pela gentileza e disponibilidade ao final desta jornada.

Aos funcionários da UNICAMP José Carlos, Márcio, Luiz e Antônio pelo cuidado com meus animais, prezando sempre pelo seu bem estar e atentos à todos os detalhes.

Ao Sr. Sérgio Magalhães pelo cuidado na manipulação dos tecidos dos animais, fundamental para a obtenção das boas imagens histológicas desta dissertação.

Aos meus familiares, noivo, amigos e pacientes que me incentivaram e sempre acreditaram no meu trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	23
3.2 ANIMAIS.....	24
3.3 INDUÇÃO DO DM	24
3.4 CONFIRMAÇÃO DO DM E RANDOMIZAÇÃO DOS ANIMAIS POR GRUPO.....	24
3.5 DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA	26
3.6 DETERMINAÇÃO DO PESO CORPORAL.....	27
3.7 DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL	27
3.8 DETERMINAÇÃO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE ALBUMINA (EUA)	27
3.9 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E PREPARO DOS TECIDOS PARA OS EXPERIMENTOS.....	29
3.10 PREPARO DO EXTRATO CORTICAL RENAL.....	29
3.11 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	30
3.12 EXPERIMENTO DE WESTERN BLOT	31
3.13 ATIVIDADE DA NAD(P)H OXIDASE	32
3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33

4. RESULTADOS.....	34
4.1 PARÂMETROS FÍSICOS E METABÓLICOS	34
4.1.1 PESO CORPORAL E RAZÃO PESO DO RIM / PESO CORPORAL.....	34
4.1.2 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS).....	36
4.1.3 GLICEMIA	37
4.2 O CHÁ VERDE ATENUOU A GERAÇÃO DE SUPERÓXIDO VIA NAD(P)H OXIDASE E A EXPRESSÃO DE NOX-4 EM SHR DIABÉTICOS	38
4.2.1 PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO VIA NAD(P)H OXIDASE	38
4.2.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA SUBUNIDADE NOX-4 DA NAD(P)H OXIDASE	40
4.3 O CHÁ VERDE ATENUOU O ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS SHR DIABÉTICOS	42
4.3.1 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NITROTIROSINA POR WESTERN BLOT	42
4.3.2 MARCAÇÃO DE LESÃO OXIDATIVA EM DNA DE CÉLULAS RENAI, POR 8-OHdG	44
4.4 O CHÁ VERDE AMENIZOU O DANO RENAL EM RATOS SHR DIABÉTICOS.....	46
4.4.1 EXCREÇÃO URINÁRIA DE ALBUMINA	46
4.4.2 EXPRESSÃO CORTICAL RENAL DE COLÁGENO IV	48
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
8. APÊNDICES	62
8.1 TABELA DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS	63
8.2 ARTIGO PUBLICADO: THE JOURNAL OF NUTRITION.	65

Lista de Abreviaturas

8-OHdG: 8-hydroxi-2'-deoxiguanosina

CV: chá verde (*Camellia sinensis*)

DM: Diabetes mellitus

EGCG: epigallocatequina galato

ERO: espécies reativas de oxigênio

HA: Hipertensão arterial

IRCT: Insuficiência renal crônica terminal

NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato

ND: Nefropatia diabética

SCA: SHR não diabético que recebeu água

SCC: SHR não diabético que recebeu chá verde

SDA: SHR diabético que recebeu água

SDC: SHR diabético que recebeu chá verde

SHR: Spontaneously hypertensive rats

STZ: Estreptozotocina.

Resumo

Introdução e Objetivos: Há muito se sabe que a hiperglicemia e a hipertensão arterial são fenômenos promotores de estresse oxidativo no tecido renal. O estresse oxidativo, por sua vez, contribui fortemente com a doença renal do diabetes, especialmente pela geração de oxidantes via NAD(P)H oxidase. Em contrapartida, inúmeros pesquisadores têm sugerido que o chá verde (*Camellia sinensis*) possa reduzir o estresse oxidativo. Desta forma, como objetivos deste estudo, testamos se a administração de chá verde a ratos espontaneamente hipertensos (SHR) diabéticos ameniza o dano renal, verificando ainda se os efeitos se fazem por redução do estresse oxidativo.

Métodos: Ratos SHR com 12 semanas de idade foram tornados diabéticos por injeção de estreptozotocina (50 mg/kg) e os grupos controle receberam somente o veículo (tampão citrato de sódio pH 4.5). Animais diabéticos (SD) (glicemia ≥ 270 mg/dl) e controle (SC) foram randomicamente divididos para receber chá verde (CV) ou água (A) como fonte única de líquidos, totalizando 8 a 10 animais por grupo, sendo eles SCA (SHR controle recebendo água), SCC (SHR controle recebendo chá verde), SDA (SHR diabético recebendo água) e SDC (SHR diabético recebendo chá verde). Peso, glicemia, pressão arterial sistólica (PAS) e albuminúria foram determinados a cada 4 das 12 semanas de acompanhamento.

Resultados: Durante as 12 semanas de estudo, as glicemias foram significativamente maiores ($p < 0.001$) nos animais SDA do que nos controles SCA e SCC, não sendo alteradas pela administração de CV. As PAS não foram

afetadas pelo diabetes ou pelo tratamento com CV. A albuminúria dos animais não diabéticos SCA e SCC foram semelhantes, aumentando significativamente ($p=0.048$) nos SDA e reduzindo no tratamento com o CV (SDC) de forma significativa ($p=0.048$). A atividade da NAD(P)H oxidase, determinada por quimiluminescência foi significativamente maior ($p=$) no grupo SDA comparado ao SCA. O tratamento com CV reduziu de forma significativa ($p=0.01$) na ausência e presença do diabetes. A expressão da subunidade NOX-4 da NAD(P)H oxidase, determinada por Western Blot, aumentou de forma significativa ($p=0.04$) no grupo SDA em relação aos grupos não diabéticos SCA e SCC. Porém, em ratos diabéticos tratados com CV (SDC) esta expressão reduziu significativamente ($p=0.04$) chegando aos níveis do controle. A nitrotirosina, um marcador de modificação de proteína induzida pelo estresse oxidativo/nitrosativo avaliada por Western Blot, foi significativamente ($p=0.04$) maior no SDA do que no SCA e SCC, sendo no entanto significativamente reduzida ($p=0.04$) no grupo SDC. A expressão renal de colágeno IV determinada por Western Blot foi significativamente aumentada ($p=0.008$) nos ratos SDA comparados aos SCA e SCC. NA presença do diabetes, a administração de CV reduziu de forma significativa ($p=0.013$) esta variável.

Conclusão: Em ratos hipertensos e diabéticos, o chá verde restabeleceu o equilíbrio redox, reduzindo marcadores de nefropatia sem alterar glicemia e pressão arterial. Desta forma, o consumo de chá verde pode ser benéfico à pacientes diabéticos e hipertensos.

Abstract

It has been suggested that green tea (GT) has beneficial properties in the treatment or prevention of human disease. The major biological mechanisms of action of GT are being attributed to its antioxidant properties. Several lines of evidence suggest that oxidative stress contributes to the pathogenesis of diabetic nephropathy. The effect of GT on diabetic nephropathy is unclear. We tested the hypothesis that GT prevents diabetes and hypertension-related renal oxidative stress and attenuates renal injury. Spontaneously hypertensive rats (SHR) with streptozotocin-induced diabetes and control SHR were treated daily with tap water or fresh GT extract. After 12 weeks, the systolic blood pressure was unchanged by diabetes or GT. However, there was a decrease in body weight and a significant ($p < 0.0001$) increase in blood glucose level in diabetic SHR. These parameters were unaffected by GT therapy. GT prevented the increase in 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, an indicator of renal oxidative stress-induced DNA, and nitrotyrosine, an indicator of oxidative stress-induced protein modification, that were significantly ($p < 0.01$) elevated in diabetic SHR. Likewise, GT attenuated ($p = 0.048$) NADPH oxidase-dependent superoxide generation and the expression of renal cortex NOX-4, a subunit of NADPH oxidase, that were elevated ($p = 0.013$) in diabetic SHR. Treatment with GT significantly ($p = 0.048$) reduced the indices of renal injury, albuminuria and renal expression of collagen IV in diabetic SHR. GT reestablished the redox state and reduced the indicators of nephropathy without altering blood glucose and blood pressure levels in diabetic SHR. These findings

suggest that the consumption of GT may ameliorate nephropathy in diabetic hypertensive patients.

1. Introdução

A nefropatia diabética (ND) constitui a principal causa de insuficiência renal crônica terminal (IRCT) na maior parte do mundo. Nos Estados Unidos da América quase 50% dos pacientes que necessitam de diálise ou transplante renal apresentam ND (US Renal Data System, 2007). Também na América Latina a ND é a principal causa de IRCT (CUSUMANO, et al 2005). No Brasil estima-se que 25% dos pacientes em diálise tenham diabetes mellitus (DM) (Soc. Bras.de Nefrologia, 2006). Mais importante, o número de pacientes com IRCT por ND continua crescendo, sugerindo que as medidas adotadas para o tratamento e prevenção desta complicação do DM ainda sejam insuficientes (US Renal Data System, 2007). É possível que a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento da ND possibilite sua prevenção, além do desenvolvimento de tratamentos mais adequados e eficazes.

A patogênese da ND resulta do sinergismo entre alterações metabólicas e hemodinâmicas, desencadeadas pela interação entre susceptibilidade genética e fatores ambientais (GIUNTI, BARIT, COOPER, 2006).

Classicamente a ND é vista como a transição da normoalbuminúria para a IRCT, passando por dois estágios intermediários, marcados pela microalbuminúria e proteinúria clínica. A transição da normo para a microalbuminúria tem no controle glicêmico o principal fator determinante, podendo haver ainda outros fatores envolvidos, como a hipertensão arterial (HA) (LOPES DE FARIA, 2006; UK Prospective Diabetes Study, 1998).

DM e HA são doenças que freqüentemente coexistem em um mesmo paciente, acentuando significativamente o risco para a nefropatia (Hypertension in Diabetes Study, 1993). Nestes casos, certamente os controles glicêmico e pressórico são as metas mais efetivas para a prevenção e tratamento da doença renal no diabetes (UK Prospective Diabetes Study, 1998; The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1995; UK Prospective Diabetes Study 38; PARVING et al, 1993).

Estudos do nosso laboratório, onde o diabetes experimental é induzido em animais espontaneamente hipertensos (SHR), a presença de hipertensão arterial agravou e antecipou as alterações renais (COOPER et al, 1988; RIGUETTI et al, 2001; SILVEIRA et al, 2002; PAVAN et al, 2003) as quais puderam ser prevenidas com terapia antihipertensiva (AMAZONAS, LOPES DE FARIA, 2006). Estes dados demonstraram, portanto, o envolvimento da HA na patogênese da lesão renal no DM, não se tratando apenas de uma consequência da ND (LOPES DE FARIA, 1999).

A hiperglicemia também parece ter papel essencial no desenvolvimento e progressão da ND (UK Prospective Diabetes Study, 1998; The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1995; KAYOA et al, 2003; MUSTATA et al, 2005, WU et al, 2004). Estudos tem mostrado que o aumento da glicemia promove uma série de alterações envolvidas na patogênese da ND, entre as quais se destacam: a ativação da proteína cinase C, a cinase ativadora de mitose protéica, a metabolização da glicose pela via do poliol, a glicosilação não enzimática de proteínas e formação dos produtos finais de glicação avançada, o

aumento na produção de matriz extracelular, o aumento de citocinas, alterações no ciclo e proliferação celular, a redução na carga aniônica das membranas celulares, o estresse oxidativo e a inflamação (KAYOA et al, 2003).

Em particular, o estresse oxidativo é um dos processos que mais tem recebido atenção nos últimos tempos. Resultante do desbalanço entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, o estresse oxidativo tem como consequência o dano molecular pela falta de antioxidantes frente ao excesso de oxidantes (JONES, 2006).

Várias linhas de evidências recentes sugerem que o estresse oxidativo desencadeado pela hiperglicemia determine a ativação de processos inflamatórios, os quais contribuem fortemente para a lesão renal no DM (KAYOA et al, 2003; WU et al, 2004; PRABHAKAR et al, 2007). Ainda mais, tanto o DM quanto a HA são capazes de ativar múltiplas vias que levam ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (BROWNLEE, 2005; VAZIRI, RODRIGUES-ITURBE, 2006). Algumas destas vias incluem o aumento da atividade da corrente de transporte mitocondrial de elétrons induzida pela hiperglicemia (NISHIKAWA et al, 2000), aumento da expressão e desacoplamento da oxido nítrico sintase endotelial levando ao aumento na produção de superóxido relativo ao óxido nítrico (PRABHAKAR et al, 2007) e ativação das formas reduzidas da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeos fosfato (NAD(P)H) (GUZIK et al, 2002; CHABRASHVILI et al, 2002; BISWAS, LOPES DE FARIA, 2007). Este último sistema está presente em diferentes tipos celulares renais (CUI, DOUGLAS,

1997; JONES et al, 1995) e pode contribuir ao dano renal na presença de DM e HA (BISWAS et al, 2008; ASABA et al, 2005).

A NAD(P)H oxidase é uma enzima com múltiplas subunidades a qual cataliza a produção de superóxido pela redução de 1 elétron do O_2 usando o NAD(P)H ou NADH como doador de elétrons (PARAVANCINI et al, 2008). A NAD(P)H oxidase encontrada em neutrófilos (comum em células endoteliais e vasculares), é composta por 2 proteínas de adesão, a RAC e a GTP e mais 5 subunidades (Fig1): as citosólicas $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ e $p47^{phox}$, e as de membrana $p22^{phox}$ e NOX-4, sendo esta última um homólogo da subunidade $gp91^{phox}$, encontrado nas células renais (PARAVANCINI et al, 2008).

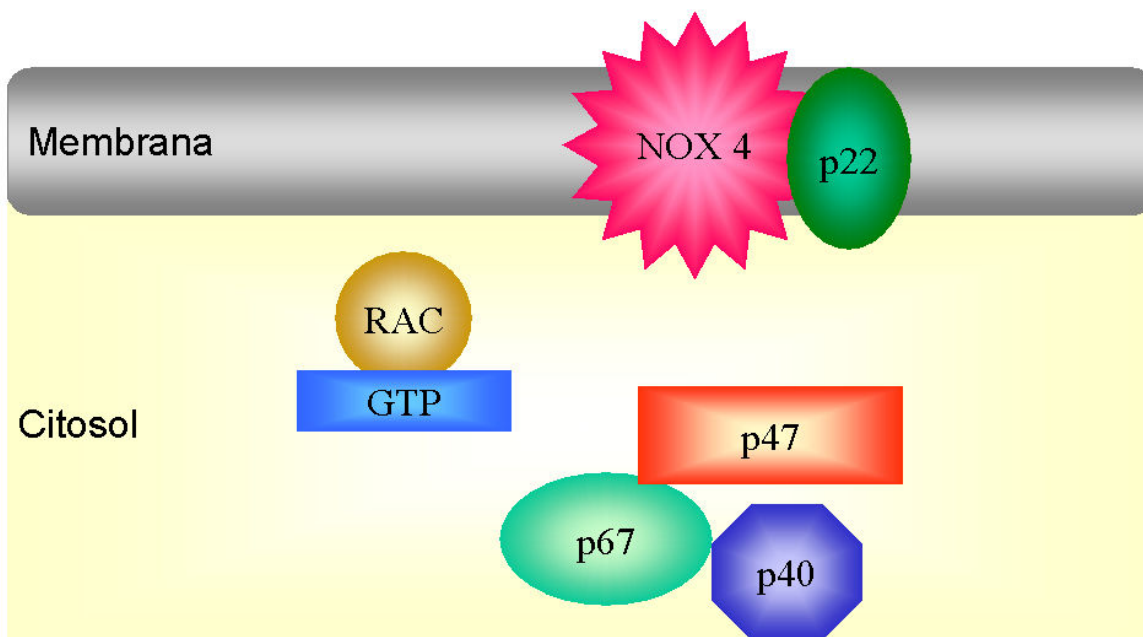


Figura 1. Representação esquemática da enzima NAD(P)H oxidase. É formada por duas frações a citosólica e a de membrana. Na fração citosólica estão as subunidades p67, p40 e p47, além das proteínas de adesão GTP e RAC. Na porção de membrana, estão presentes as subunidades NOX 4 e p22. **Esquema adaptado de PARAVANCINI et al, 2008.**

Mediante diferentes estímulos, a subunidade p47phox sofre fosforilação e os componentes citosólicos formam um complexo que se transloca até a membrana, se liga aos componentes de membrana, onde finalmente fará a transferência de elétrons de O_2 formando O_2^- . Esta ativação requer a participação da RAC (PARAVANCINI et al, 2008).

Recentemente nosso laboratório demonstrou, em ratos SHR diabéticos induzidos por estreptozotocina, que o aumento do estresse oxidativo renal resulta da elevação da produção de superóxido NAD(P)H-dependente e da redução das defesas antioxidantes (BISWAS et al, 2008). Ainda mais, estratégias que reduzem a formação de superóxido via NAD(P)H oxidase e/ou aumento da atividade dos sistemas antioxidantes, mostram-se eficientes na atenuação da lesão renal induzida pela hiperglicemia (ASABA et al, 2005; ASABA et al, 2007; CRAVEN et al, 2001; GORIN et al, 2005). Exemplo disso, foi a demonstração de que a administração de apocinina, a qual inibe a NAD(P)H oxidase, reduz o estresse oxidativo renal, a proteinúria e a lesão renal em ratos diabéticos (ASABA et al, 2005). Igualmente a inibição da subunidade NOX-4 da NAD(P)H oxidase, inibiu a formação NAD(P)H-dependente de ERO no córtex renal, além de reduzir a hipertrofia glomerular e a expressão renal de fibronectina (GORIN et al, 2005).

As principais modalidades terapêuticas utilizadas na ND envolvem primeiramente o controle glicêmico (UK Prospective Diabetes Study, 1998; The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1995; LOPES DE FARIA, 1999). No DM tipo 1, o controle glicêmico feito através de tratamento intensivo com insulina, é capaz de reduzir em até 50% as chances de indivíduos

normoalbuminúricos desenvolverem microalbuminúria (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1995).

O tratamento da HA também constitui uma forma de tratamento para a ND. O controle pressórico mostra-se uma estratégia eficaz na prevenção primária da ND e quando a nefropatia já está instalada é capaz de retardar a velocidade de progressão da ND clínica (UK Prospective Diabetes Study, 1998).

Estratégias que reduzem o estresse oxidativo tem sido utilizadas atualmente, especialmente em animais de experimentação, sob a hipótese de que sejam capazes de amenizar a agressão renal causada pelas hiperglicemias. Desta forma a redução do estresse oxidativo passa a compor uma nova modalidade terapêutica para a ND (MUSTATA et al, 2005).

Baseados na hipótese de que a composição química de plantas e vegetais conte com uma grande variedade de antioxidantes naturais em quantidades suficientes para desencadear um papel de defesa do estresse oxidativo, vários pesquisadores vêm investigando seus efeitos no organismo. No grupo de produtos ricos em antioxidantes encontram-se alguns materiais de plantas, alimentos e substâncias hidro e lipossolúveis (OSAWA, 1999).

O Chá Verde (CV) (*Camellia sinensis*) é uma rica fonte de polifenóis, os quais tem mostrado inúmeros benefícios no tratamento de certos tipos de câncer, artrite e distúrbios cardiovasculares (HIGDON, FREI, 2003).

Os polifenóis são os compostos antioxidantes dos chás, tendo no CV entre 30 e 40% do peso seco constituído por compostos fenólicos. (NISHITANI, SAGESAKA, 2004)

O polifenol mais abundante no CV é denominado catequina, o qual trata-se de um monômero de flavonóide de potente ação antioxidante (MUSTATA et al, 2005). Cerca de um terço da composição seca do chá verde é formada por catequinas e tem sido demonstrado que sua atividade antioxidante é consideravelmente maior do que as vitaminas C e E, dois antioxidantes potentes, largamente utilizados especialmente sob a forma de suplemento (MUSTATA et al, 2005).

Os tipos de catequinas naturalmente encontrados no CV são: epigallocatequina galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG), epicatequina (EC), galocatequina (GC), catequina (C), galocatequina galato (GCG) e catequina galato (CG)

A EGCG constitui a catequina com maior potencial antioxidante do CV, em decorrência do maior número de doadores de elétrons, o radical hidroxila. Ainda mais, a EGCG é a mais abundante das catequinas do CV, correspondendo à cerca de 50% do total de catequinas, o que faz do CV um dos principais antioxidante entre os chás. (NISHITANI, SAGESAKA, 2004)

Evidências sugerem que as catequinas sejam capazes de prevenir a formação e a toxicidade de lipídios hidroperóxido e seqüestrar o superóxido, peroxinitrito e outros radicais livres. Ressalta-se que o aumento desses produtos

do estresse oxidativo estão evidentes em algumas das complicações do DM (MUSTATA et al, 2005).

As catequinas também tem se mostrado capazes de alterar a atividade catalítica de enzimas oxidativas, além de quelar cobre e ferro, prevenindo assim a formação de radicais livres metal-catalizados (MUSTATA et al, 2005).

A administração de EGCG, à ratos SHR, foi capaz de melhorar a função endotelial, a sensibilidade a insulina, além de reduzir a pressão arterial (POTENZA et al, 2007). Em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ), a administração de CV na água de beber melhorou a função renal (baseada na proteinúria e no “clearance” de creatinina) e reduziu os níveis de glicose sanguínea e glicação de proteínas (RENNO et al, 2008). Em outro estudo, no mesmo modelo experimental, a administração de CV foi capaz de atenuar a retinopatia e a produção renal mitocondrial de ERO (MUSTATA et al, 2005).

Apesar da maioria das ações biológicas de CV serem atribuídas a suas propriedades antioxidantes (HIGDON, FREI, 2003), não há nenhum estudo sistemático sobre sua eficácia na prevenção da HA e na redução do estresse oxidativo causado pela hiperglicemia, levando à proteção do dano renal.

Portanto, um possível efeito benéfico do uso do chá verde na nefropatia de ratos hipertensos e diabéticos permanece por ser determinado.

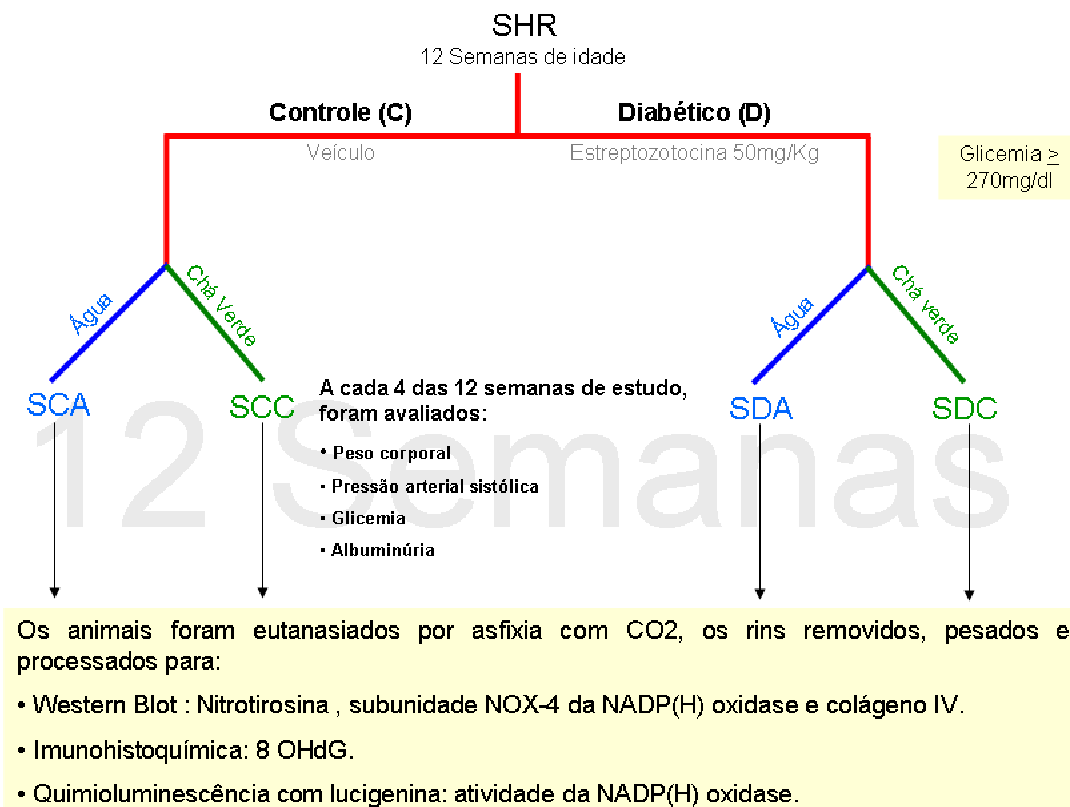
2. Objetivos

1. Investigar se a administração de chá verde em substituição à água de beber ameniza o dano renal em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), com DM induzido por STZ.
2. Explorar os mecanismos moleculares básicos envolvidos nos efeitos do CV, investigando a hipótese de que os efeitos benéficos do CV na ND se fazem por redução do estresse oxidativo.

3. Materiais e Métodos

O protocolo para este estudo seguiu as recomendações do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA), da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, sob o registro nº 1119-1.

3.1 Delineamento do estudo



3.2 Animais

Foram utilizados os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) machos com 12 semanas de idade, pesando cerca de 250 g, oriundos do biotério central da UNICAMP (CEMIB), obtidos à partir de matrizes importadas da TACONIC (Germantown), NY, USA. Os animais SHR caracterizam-se por serem normotensos durante as 4 primeiras semanas de vida tornando-se hipertensos, em sua totalidade, até a 12^a. semana (OKAMOTO et al, 1996).

3.3 Indução do DM

O DM experimental foi induzido nos animais através injeção única de STZ (50 mg/Kg) (Sigma, St. Louis, MO, USA), dissolvida em tampão citrato de sódio (pH 4,5) via artéria caudal, após jejum noturno. Os grupos controle não diabéticos receberam somente o veículo (tampão citrato de sódio, pH: 4,5). Após as injeções, os animais permaneceram em jejum por 2 horas.

3.4 Confirmação do DM e randomização dos animais por grupo

Passadas 72 horas da indução do DM ou injeção do veículo, as glicemias foram mensuradas através de um método enzimático colorimétrico (GOD-PAP Merck, Darmstadt, Germany), após jejum de 4 horas. Ratos que apresentaram glicemias superiores ou iguais a 270mg/dl foram considerados diabéticos.

Os animais diabéticos receberam 2 unidades de insulina NPH U100 (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca) três vezes por semana, a fim de reduzir a mortalidade, mas manter um ambiente propício para o desenvolvimento da nefropatia secundária ao DM.

Tendo determinados os animais controle (SC) e DM (SD), estes foram randomizados em subgrupos de acordo com a fonte exclusiva de líquidos que receberiam durante as 12 semanas do estudo: água (A) ou chá verde (C). Formaram-se então 4 grupos finais: SCA : SHR Controle + água, SCC : SHR Controle + chá verde, SDA : SHR diabético + água e SDC : SHR + chá verde.

Os ratos foram alojados em gaiolas com 3 animais cada, em ambiente com temperatura amena e controlada, em esquema dia-noite de 12 horas. A alimentação foi oferecida em livre demanda, sendo utilizada a ração peletizada para ratos de laboratório Nuvilab CR-1 (Nuvital Nutrientes S/A, Paraná, Brasil), com a seguinte composição de macronutrientes: 22% de proteínas, 55% de carboidratos e 4,5% de lipídeos.

A oferta de água também foi livre para os grupos SCA e SDA e para os grupos SCC e SDC o chá verde foi colocado em substituição à água, também como livre demanda. Os volumes consumidos, tanto de ração quanto de líquidos, foram mensurados 2 vezes por semana por diferença (volume oferecido – volume final).

O chá verde foi preparado diariamente, seguindo a metodologia de MUSTATA et al (MUSTATA et al, 2005). Foram utilizadas folhas do chá verde

extra japonês Yamamotoyama (Midori Indústria de Chá Ltda., São Miguel Arcanjo, SP, Brasil) processadas da seguinte maneira: a água de torneira foi fervida e retirada do aquecimento, aguardando-se reduzir a temperatura à cerca de 90°C. Em seguida adicionamos as folhas, na proporção 1,33g/100ml de água e a infusão foi abafada por 3 minutos, deixando em seguida descansar até que as folhas decantassem completamente. Por fim o chá foi filtrado em filtro de papel nº 103, em recipiente imerso em gelo, resfriado e distribuído em garrafas prévia e rigorosamente limpas. O chá verde foi então colocado nas gaiolas.

3.5 Determinação da Glicemia

Os níveis de glicose sanguínea foram determinados 72 horas após a indução do DM em todos os grupos de animais e repetidos nas semanas 4, 8 e 12. Para tanto foram coletadas amostras de sangue da cauda dos animais, depositadas em tubos heparinizados. Estas foram então centrifugadas, a fim de separar o plasma a partir do qual foi determinada a glicemia, por GOD-PAP (Merck, Darmstadt, Germany). Resumidamente, 10µl de plasma dos animais ou de solução padrão, todos em duplicata, foram adicionadas a 1ml de reagente colorimétrico, homogeneizados e incubados por 10 minutos a 37°C, em banho maria. Em seguida as amostras foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda 500 nm, conforme instruções do fabricante, e por fim calculadas as glicemias.

3.6 Determinação do peso corporal

Todos os animais foram pesados no início do estudo e mensalmente até o sacrifício (semanas 4, 8 e 12), antes da determinação de pressão arterial.

3.7 Determinação da Pressão Arterial

A pressão arterial foi aferida após a indução do DM e nas semanas 4, 8 e 12, via caudal, por pletismografia (Narco Bio-System, Houston, TX, USA). Os animais não anestesiados foram colocados por 10 minutos em caixa aquecida à 39°C, mantendo a temperatura dos animais em torno de 36°C. Em seguida foram transferidos para um contentor dotado de placa aquecida, a fim de manter a temperatura dos animais, enquanto eram mensuradas as pressões arteriais. Foram realizadas cerca de 5 medições, feita ao final a média das 3 pressões mais parecidas de cada animal.

3.8 Determinação da excreção urinária de albumina (EUA)

A determinação da EUA foi determinada mensalmente em amostra de urina de 24 horas.

Para a obtenção das urinas, os animais foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas, com ração umidificada e água ou chá verde em livre demanda. Ao final de 24 horas foram determinados os volumes urinários totais do

período. As urinas foram então centrifugadas, aliquotadas e armazenadas á – 20°C.

A determinação da EUA se deu pelo método de imunodifusão radial simples (MANCINI, CARBONARO, 1965), utilizando-se o anticorpo policlonal anti-albumina de rato (Cappel, ICN, Aurora, Ohio, USA) , como previamente descrito pelo nosso laboratório (RIGUETTI et al, 2001; PAVAN et al, 2003). Resumidamente, este método foi realizado em placas com ágar-gel, contendo anticorpo anti-albumina de rato na concentração 1/300, onde foram feitos poços com capacidade para 20µl de urina. Estes poços foram então preenchidos com albumina de rato (Cappel, ICN, Aurora, Ohio, USA) em concentrações conhecidas e crescentes, ou com as amostras de urina, todos em duplicata. Decorrente da reação antígeno-anti-corpo há a formação de um halo em volta do poço, o qual foi medido em régua específica após 72 horas da colocação da albumina e das amostras. Tendo feitas as leituras, com os padrões fizemos o cruzamento da informação concentração do padrão X tamanho do halo, formando uma curva de regressão simples, a qual fornece uma fórmula padrão à ser aplicada ao tamanho do halo das amostras. Após calcular a EUA de cada animal através da aplicação do halo medido na fórmula padrão, multiplicamos uma a uma pelo volume de urina de 24 horas de correspondente a cada animal, obtendo então a EUA em µg por 24 horas, transformada em seguida em mg de albumina/24h.

3.9 Eutanásia dos animais e preparo dos tecidos para os experimentos

Após 12 semanas de DM, os animais foram sacrificados através de asfixia por CO₂. O abdômen foi aberto com uma incisão central, sendo primeiramente retirado o rim direito e cuidadosamente removidos a gordura peri-renal e a cápsula. Este rim foi então pesado. Em seguida o rim foi seccionado longitudinalmente, a camada cortical separada da medular em um fragmento equivalente a 1/8 do córtex renal foi retirado e processado para o preparo do extrato cortical renal. O restante do tecido foi congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80° C. O rim esquerdo foi removido da mesma maneira, limpo, seccionado longitudinalmente e fixado por imersão em solução de metacarnol (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético glacial).

3.10 Preparo do Extrato Cortical Renal

Um fragmento, correspondendo à cerca de 1/8 do córtex renal já livre de gordura e descapsulado, foi processado com a ajuda do bisturi e então homogeneizado, com politron, a 4°C com 1.5 ml de tampão de homogeneização (250 mM de sacarose, 30 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EGTA, 5 mM EDTA e 1 mM DTT, suplementado com um coquetel de indutores de protease {Completo, Boehringer Mannheim, Alemanha }). O homogenato foi então centrifugado em 11,000× g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado, sendo uma alíquota separada para determinação de proteína total pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). O restante do sobrenadante foi adicionado ao tampão de

Laemmli (LAEMMLI, 1970), fervido durante 5 minutos, aliquotado e armazenado a -80°C para posterior utilização nas análises de Western blot .

3.11 Imunohistoquímica

Para detectar o dano oxidativo causado ao DNA, através do 8-hydroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), secções de tecido renal ($4\text{ }\mu\text{m}$) fixadas em metacarnol e embebidas em parafina, foram desparafinizadas e rehidratadas, através da exposição das lâminas ao xilol a 60°C por 1 hora e subsequente exposição à diferentes concentrações de xilol e álcool. As lâminas foram então submetidas a recuperação antigênica. Para isso foram imersas em tampão citrato (10 mM, pH 6) e expostas à microondas através de equipamento doméstico (Panasonic Junior), em potência máxima, por 2 ciclos de por 5 minutos com descanso de 1 minuto a cada ciclo. Depois de resfriadas, as lâminas foram colocadas em 3% de H_2O_2 em metanol por 10 minutos para bloquear a peroxidase endógena. As lâminas foram então incubadas em leite desnatado a 1% em PBS por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida foi feita a incubação com o anti-corpo monoclonal de camundongo anti-8-OHdG na diluição 1:50, por toda a noite a 4°C . Depois de lavadas em PBS, um anti-corpo secundário anti-camundongo IgG biotinilado (Vector, Burlingame, CA) foi aplicado por 1 hora em temperatura ambiente. Nos anticorpos primário e secundário, foram adicionados 10% de plasma de rato normal como diluente, a fim de reduzir ligações inespecíficas. As lâminas foram então incubadas com o complexo reagente avidina-biotina (ABC)

(Dako, Glostrup, Denmark) em temperatura ambiente por 30 minutos. Novamente o tecido foi lavado em PBS, exposto a tetrahidroclorido de diaminobenzidina (DAB) (Sigma) e corado com hematoxilina. Depois de desidratadas com diferentes concentrações de álcool e xilol, as lâminas foram montadas em Entellan. As células tubulointersticiais contendo positividade nuclear para 8-OHdG foram contadas em seqüência de 50 campos aumentados em microscopia (400x).

3.12 Experimento de Western blot

O homogenato cortical renal foi utilizado para quantificar nitrotirosina, a subunidade NOX-4 da NAD(P)H oxidase e o colágeno IV.

As proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida SDS a 10% e eletroforeticamente transferidas para membranas de nitrocelulose usando o equipamento Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Ligações inespecíficas foram bloqueadas por incubação das membranas com leite desnatado a 5%, por 1 hora em temperatura ambiente, utilizando solução salina fosfato-tamponada contendo 0.1% Tween-20 (PBST). Em seguida as membranas foram incubadas em PBST contendo leite desnatado a 5% adicionado do anticorpo primário: anticorpo monoclonal anti-tirosina anti-camundongo (1:2000; clone 1A6, Upstate, Lake Placid, NY), anticorpo policlonal de coelho anti-NOX-4 (1:2,000; gentilmente fornecido pela Dra. Karen Block) ou anticorpo de cabra anti-colágeno tipo IV (1:500; Southern Biotech, Birmingham, AL, USA). Depois de lavadas com PBST as membranas foram incubadas com o

anticorpo secundário, de acordo com a origem do anticorpo primário (Santa Cruz). As bandas imunoreativas foram detectadas utilizando o método de quimiluminescência (Super Signal CL-HRP Substrate System; Pierce, Rockford, USA). Os filmes com a detecção das bandas, foram então escaneados com um densitômetro a laser (Bio-Rad) e analisados quantitativamente através do software para multi-análises Macintosh do Sistema de análise de imagens (Bio-Rad). β -actina e β -tubulina foram utilizadas para controle da carga de proteínas, a fim de assegurar que todas as amostras de um mesmo gel possuíam quantidades semelhantes de proteína.

3.13 Atividade da NAD(P)H oxidase

A atividade da NAD(P)H oxidase foi medida pelo método de quimiluminescência por lucigenina, como previamente descrito por Gorin et al. (GORIN et al, 2005) com algumas modificações (BISWAS et al, 2008). Para tanto, um pequeno pedaço de córtex renal congelado (cerca de 50 mg) foi homogeneizado em 1ml de tampão de lise (20 mM KH_2PO_4 , pH 7.0, 1 mM EGTA, 1 mM fenilmetilsulfonil fluorido, 10 μg de aprotinina/ml, e 40 $\mu\text{l/ml}$ de coquetel de inibidores de protease) usando um homogeneizador Dounce (100 movimentos) sobre o gelo. Os homogenatos foram centrifugados (800 x g, 10 min, 4°C) a fim de remover células íntegras e debris, e as alíquotas foram usadas imediatamente. O procedimento de leitura foi iniciado pelo preparo da solução contendo 50 μl de homogenato, 450 μl de tampão de reação (50 mM de tampão fosfato, pH 7.0,

contendo 1 mM de EGTA, 150 mM de sucrose), 5 de μ M lucigenina e 100 μ M NAD(P)H. A emissão de luz, expressa por unidades relativas de luminescência (RLU), foi medida a cada 20 segundos, por 10 minutos no luminômetro Tuner TD-20e. Na ausência de NAD(P)H ou de homogenato de tecido, não foram encontradas atividades mensuráveis. Para identificar outras vias envolvidas na produção de superóxido, os homogenatos de tecido foram pré-incubados em gelo com difenileneiodonio (DPI) e rotenona (nas concentrações finais de 20 μ M 100 μ M, respectivamente) por 10 minutos.

3.14 Análise Estatística

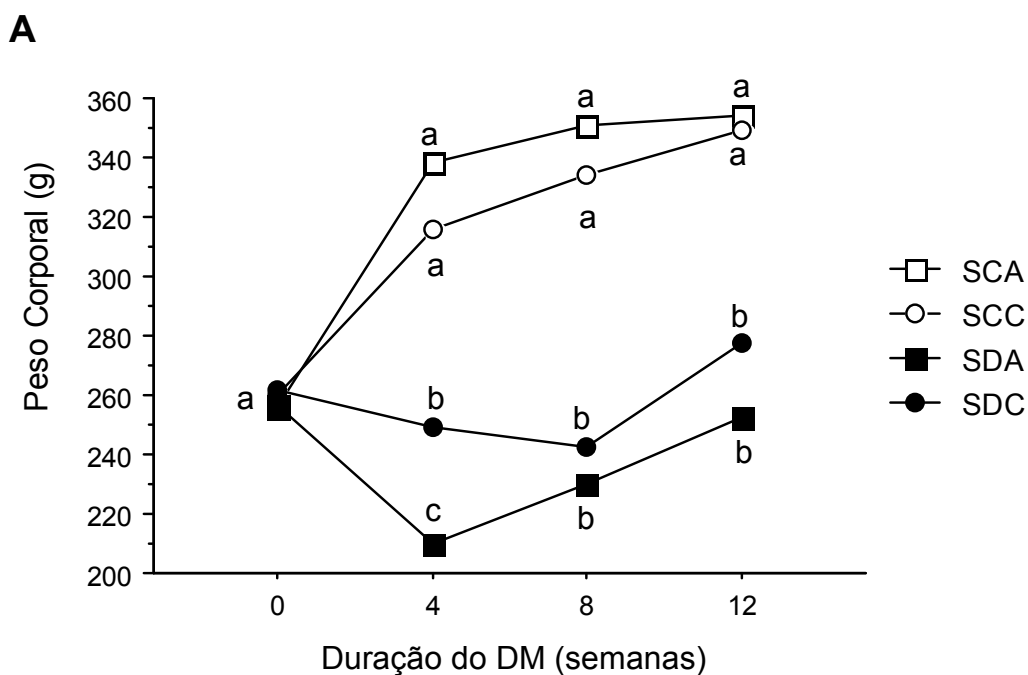
Os dados foram apresentados utilizando médias $\pm$ desvio padrão. Comparações entre os grupos foram feitas através de análises de variância de 2 fatores (ANOVA two-way) seguida pelo teste de Fisher para comparações dos grupos 2 a 2. Peso, Pressão e Glicemia foram avaliados por ANOVA de 2 fatores para medidas repetidas. Para avaliar a EUA foram realizadas médias geométricas dos valores obtidos de cada animal e em seguida de cada grupo, nos diferentes tempos. Em seguida foram calculados os valores da área sobre a curva (MATTHEW et al 1990) de cada grupo e estatisticamente avaliados pelos testes de Mann-Whitney U (para 2 grupos) e Kruskal-Wallis (para grupos múltiplos). Foram consideradas diferenças significativas aquelas com $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas utilizando o software StaView (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4. Resultados

4.1 Parâmetros físicos e metabólicos

4.1.1 Peso corporal e razão peso do rim / peso corporal

Conforme esperado, o ganho de peso corporal foi significativamente ($p < 0.001$) menor e a razão peso do rim-peso corporal marcadamente maior ($p < 0,05$) nos animais diabéticos, tanto tratados quanto não tratados, quando comparados aos animais SHR controle (não diabéticos). Não houve interação entre as variáveis DM e CV, tendo o DM agido de forma independente em ambas medidas.(Figura 1).



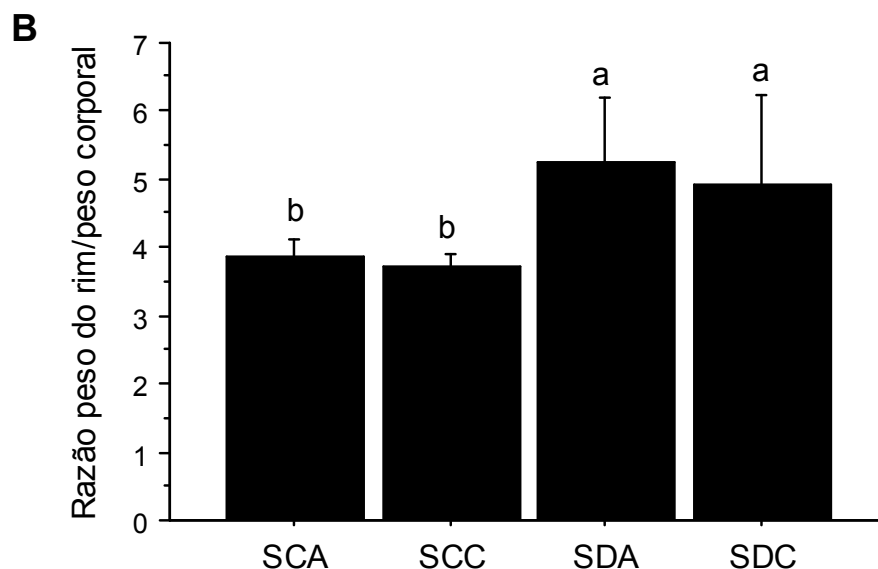


Fig. 1. Médias dos pesos corporais e da razão peso do rim-peso corporal . A Média dos pesos dos animais (em g) durante 12 semanas de observação. **B** Médias das razões peso do rim/peso corporais no sacrifício, nos animais, sendo SHR controle água (□ SCA, n = 8), SHR controle CV (○ SCC, n = 8), SHR diabético água (■ SCA n = 8), e SHR diabético CV. (● SCC n = 8). Os resultados são expressos em média ± DP, sendo $a > b > c$. As diferenças significativas são entre animais que possuem a letra subscrita diferente da sua. $p < 0,05$. A tabela acima das figuras A e B representam as respectivas análises de interação entre os fatores DMXCV.

4.1.2 Pressão arterial sistólica (PAS)

A PAS não se alterou seja pela presença do DM ou pelo tratamento com CV (Figura 2).

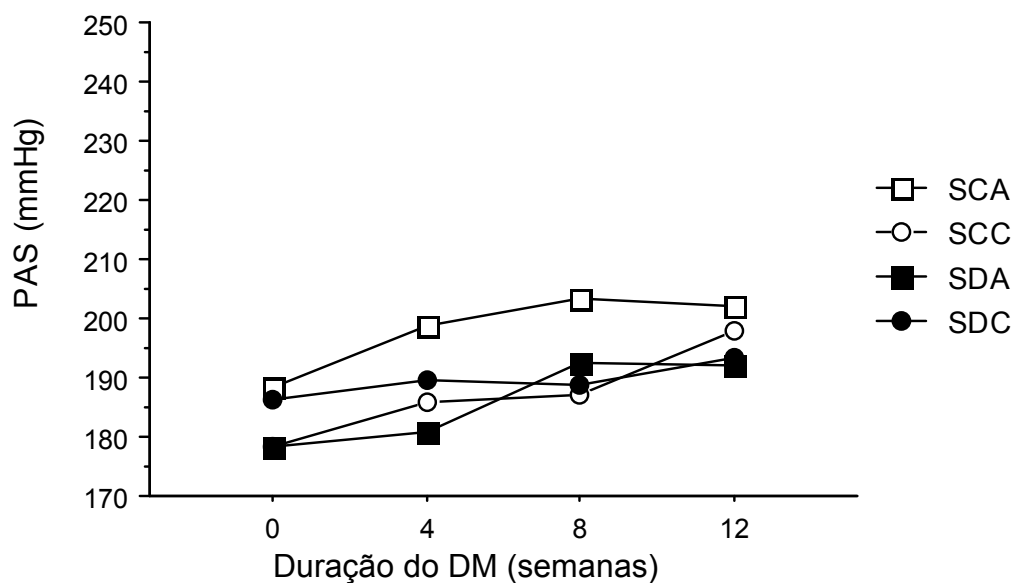


Figura 2. Pressão arterial sistólica dos grupos, sendo SHR controle recebendo água (□ SCA, n = 8), SHR controle recebendo chá verde (○ SCC, n = 8), SHR diabético recebendo água (■ SCA n = 8), e SHR diabético recebendo chá verde (● SCC n = 8). Os resultados representam a média de cada grupo.

4.1.3 Glicemia

Desde a indução do DM e durante todo o estudo os animais diabéticos apresentam as glicemias elevadas em relação aos não diabéticos. O tratamento com CV não afetou este parâmetro, tanto no grupo SHR controle quanto no diabético tendo o DM agido de forma independente ao tratamento (Tabela 1).

Tabela 1. Glicemia dos ratos SHR durante as 12 semanas de estudo.

	Glicemia (mg/dl)			
	Sem 0	Sem 4	Sem 8	Sem 12
SCA	155,6±18 ^b	187,3±55 ^b	148,5±36 ^b	154,5±22 ^b
SCC	158,9±11 ^b	172,9±45 ^b	156,7±30 ^b	161,1±25 ^b
SDA	451,7±54 ^a	476,0±65 ^a	626,2±87 ^a	464,1±68 ^a
SDC	433,1±73 ^a	502,4±117 ^a	580,9±156 ^a	485,7±81 ^a

Tabela 1. **Glicemia.** Glicemia dos diferentes grupos, ao longo das 12 semanas de seguimento, sendo SCA = SHR controle recebendo água; SCC = SHR controle recebendo chá verde; SDA = SHR diabético recebendo água; SCC = diabético recebendo chá verde. Os resultados são expressos em média ± DP, sendo a>b. As diferenças significativas são entre animais que possuírem a letra subscrita diferente da sua. $p < 0.001$.

4.2 O chá verde atenuou a geração de superóxido via NAD(P)H oxidase e a expressão de NOX-4 em SHR diabéticos

4.2.1 Produção de superóxido via NAD(P)H oxidase

A Figura 4A demonstra as alterações na reação da solução contendo homogenato cortical renal, ao longo dos 10 minutos subsequentes à adição da NAD(P)H. A Figura 4B apresenta a atividade da NAD(P)H oxidase nos últimos 5 minutos de reação, quando a mesma torna-se mais estável, representando mais seguramente a produção de superóxido em cada homogenato avaliado. A produção de superóxido via NAD(P)H oxidase, foi alterada tanto pelo DM quanto pelo tratamento com o CV. Apresentou-se significativamente maior nos animais diabéticos quando comparados aos controles (SCA $6,06 \pm 1,65$ versus SDA $8,80 \pm 2,56$ RLU/mg proteína, $p = 0,04$) e reduziu, também de forma significativa ($p = 0,03$), nos ratos diabéticos tratados CV (SDC $6,01 \pm 1,8$). A análise de interação entre os fatores DM e CV confirmou a ação dos dois fatores sobre o parâmetro avaliado, porém não houve interação entre eles, ou seja, a ação de um independe da existência do outro (Figura 3).

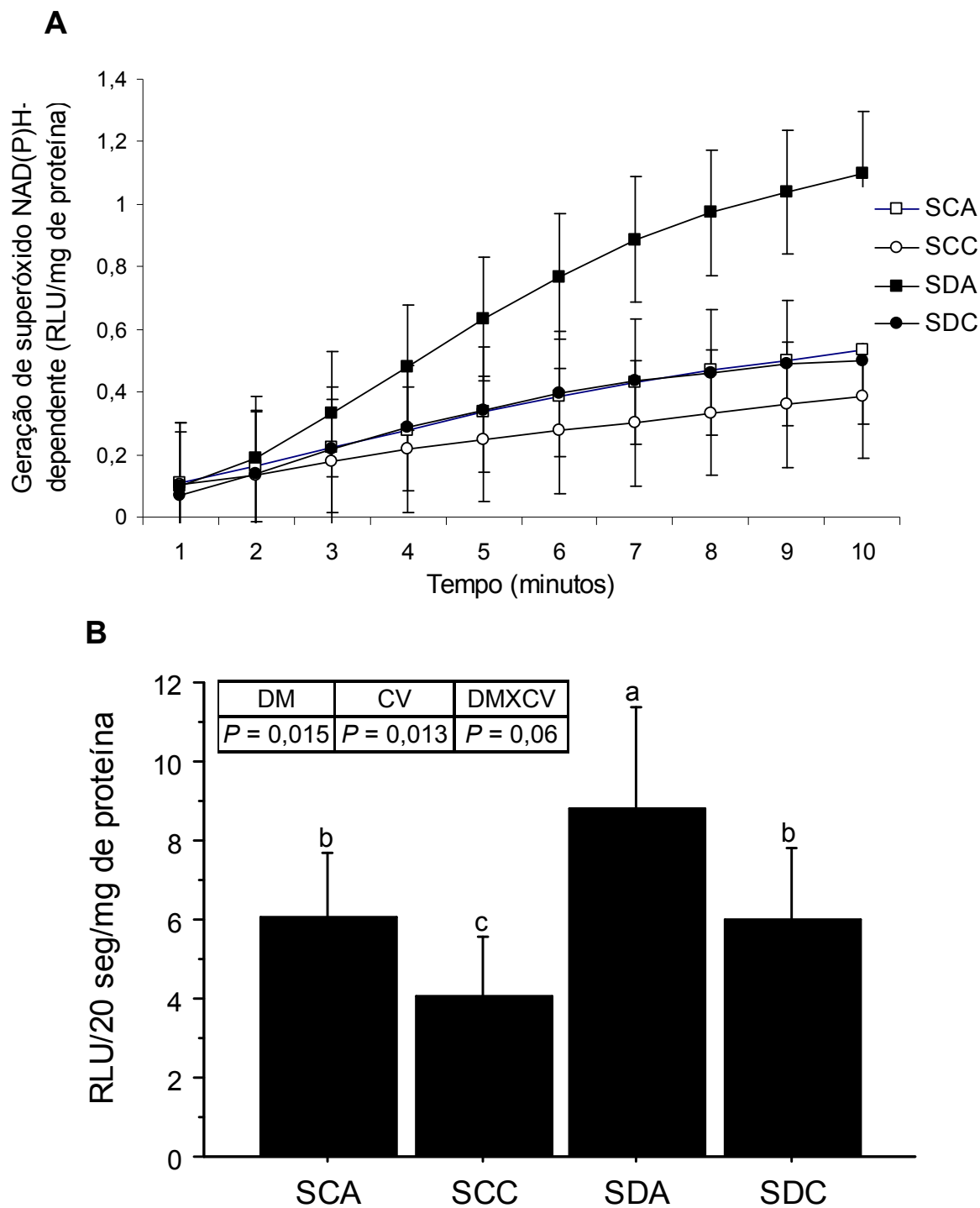


Figura 3. Produção de superóxido pela via NAD(P)H Oxidase. **A** Representação da cinética da reação de quimiluminescência por lucigenina, durante os 10 minutos da reação. Os pontos representam as média de cada grupo, sendo SHR controle recebendo água (□ SCA, n = 5), SHR controle recebendo chá verde (○ SCC, n = 5), SHR diabético recebendo água (■ SDA n = 5), e SHR diabético recebendo chá verde (● SDC n = 5). **B** Atividade da NAD(P)H oxidase. Os resultados são expressos em média $\pm$ DP, sendo $a > b > c$. As diferenças significativas são entre animais que possuem a letra subscrita diferente da sua, sendo o $p < 0.05$. A tabela acima da figura B representa a análise de interação entre os fatores DM e CV.

Para avaliar a formação de superóxido por outras vias, os homogenatos de córtex renal foram incubados com difenileneiodonio (DPI), o qual inibe a via NAD(P)H oxidase, e com rotenona, o qual inibe o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. A pré-incubação dos homogenatos com DPI (concentração final de 20 μ M) bloqueou completamente produção de superóxido induzida por NAD(P)H, enquanto a pré-incubação com rotenona (concentrações finais de 20 e 100 μ M) não afetou a produção de superóxido. Estes resultados indicam que a NAD(P)H oxidase consiste na maior fonte de superóxido em homogenato de córtex renal.

4.2.2 Análise da expressão da subunidade NOX-4 da NAD(P)H oxidase

Para estabelecer o envolvimento do sistema NAD(P)H oxidase na exacerbação da produção de superóxido no córtex renal dos ratos diabéticos, nós também avaliamos a expressão da NOX-4, um homólogo da subunidade gp91phox da NAD(P)H oxidase, a qual consiste na maior fonte de superóxido no córtex renal no diabetes (21). A expressão de NOX-4 foi significativamente maior ($p = 0,01$; $n = 3$ por grupo) no SHR diabético ($SDA = 3,18 \pm 1,23$) comparado com seu controle não diabético ($SCA = 0,95 \pm 0,72$). O tratamento com CV reduziu significativamente ($p = 0,048$) a expressão de NOX-4 no grupo SHR diabético ($SDC = 1,56 \pm 0,71$; figura 5). A expressão do NOX-4 no grupo SHR controle que recebeu CV (SCC) não foi alterada, estando este resultado de acordo com a análise de interação entre os fatores DM X CV, na qual observa-se que o efeito dependeu da coexistência de ambos (Figura 4). Este dado corrobora com

constatações do nosso laboratório, onde na presença exclusiva da HA a expressão de NOX-4 não se altera.

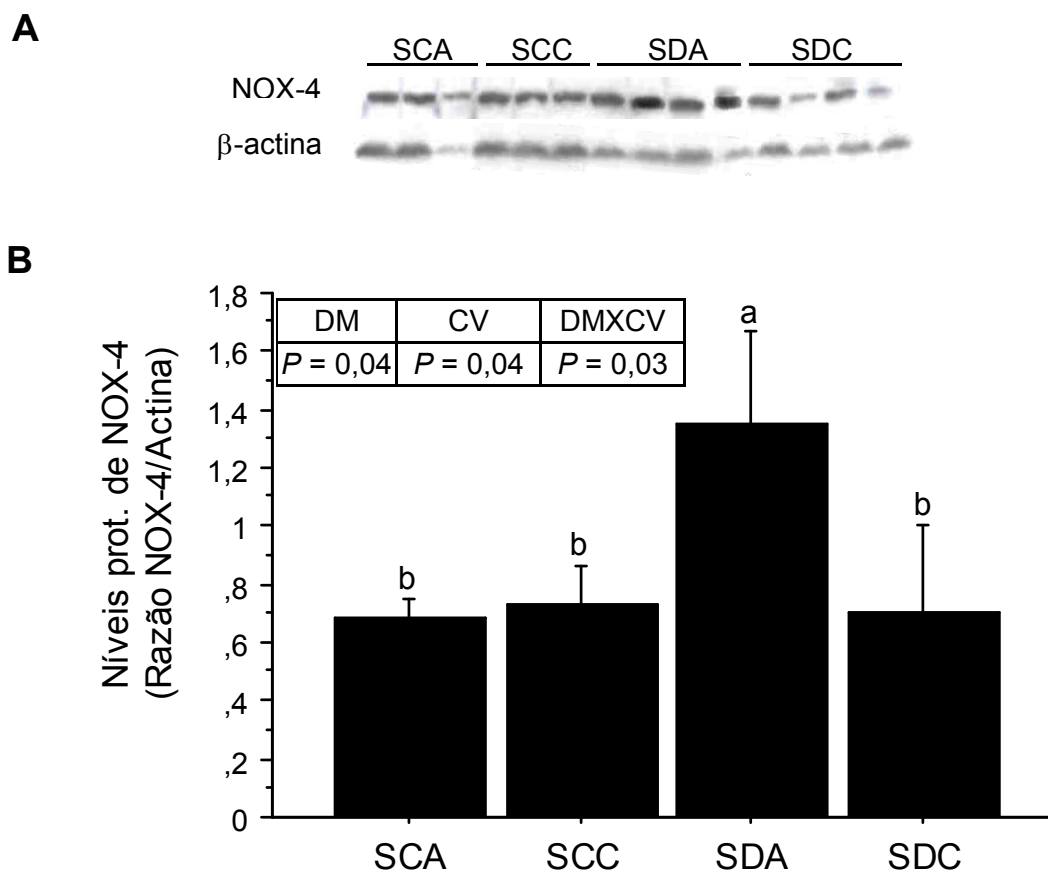


Figura 4. Análise da expressão do NOX-4 em córtex renal por Western blot **A.** Western blot representativo para os diferentes grupos de ratos. Para controle de uniformidade na aplicação das proteínas foi utilizada Actina. **B** Análise densitométrica das bandas, utilizada para determinas a razão NOX-4/actina, nos diferentes grupos., sendo eles SCA = SHR controle recebendo água; SCC = SHR controle recebendo CV; SDA = SHR diabético recebendo água; SCC = SHR diabético recebendo CV. As barras representam as médias $\pm$ DP de pelo menos 3 experimentos independentes ($n = 3$ a 4 ratos por grupo) sendo $a > b$. As diferenças significativas são entre animais que possuírem a letra subscrita diferente da sua. $p < 0,05$. A tabela acima do resultado B representa a análise de interação entre os fatores DM e CV.

4.3 O chá verde atenuou o estresse oxidativo em ratos SHR diabéticos

4.3.1 Determinação da expressão de nitrotirosina por Western blot

Para verificar se o aumento da produção de superóxido induzido pela NAD(P)H culminou em lesão oxidativa ao tecido, nós medimos a nitrotirosina e o 8-OHdG. O primeiro trata-se de um indicado de modificação protéica induzida por estresse oxidativo/nitrosativo. Já o 8-OHdG consiste em um marcador de modificação de DNA induzida pelo estresse oxidativo no tecido.

Os níveis de nitrotirosina foram significativamente elevados nos animais SHR diabéticos quando comparados aos SHR controle (SDA = $0,84 \pm 0,19$ vs. SCA = $0,24 \pm 0,23$, calculados como razão da expressão de nitrotirosina/actina em unidades densitométricas arbitrárias. $p = 0,003$, $n = 3$ por grupo), e o tratamento com CV significativamente ($p = 0,005$) reduziu esta expressão (SDC = $0,34 \pm 0,22$). As alterações deste parâmetro foram definidas pelas variáveis DM e CV de forma dependente. (Figura 5)

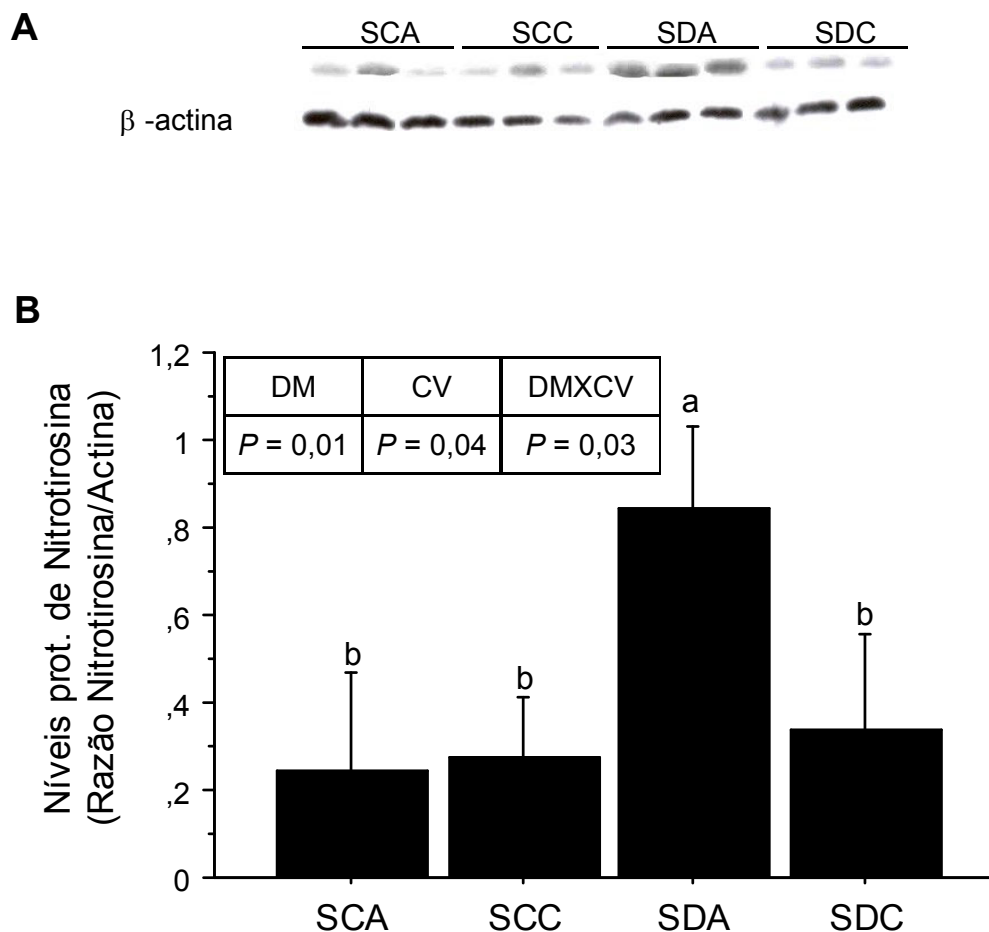


Figura 5. Análise da expressão de nitrotirosina cortical renal, por Western blot. A. Western blot representativos dos diferentes grupos de ratos, sendo a actina utilizada como controle do volume de proteínas. **B** Análise densitométrica das bandas pela razão nitrotirosina/actina nos diferentes grupos, onde SCA = SHR controle água ; SCC = SHR controle CV ; SDA = SHR diabético água; SDC = SHR diabético CV. As barras representam as médias $\pm$ DP de pelo menos 3 experimentos independentes ($n = 3$ ratos por grupo) sendo $a > b$. As diferenças são expressas entre os animais que possuírem uma letra subscrita diferente da sua. $p < 0,05$. A tabela acima da figura B representa a análise de interação entre os fatores DMXCV.

4.3.2 Marcação de lesão oxidativa em DNA de células renais, por 8-OHdG

A identificação da base 8-OHdG modificada no núcleo de células corticais renais, ocorre particularmente nos túbulos e na região cortical renal (BISWAS et al, 2008). A marcação cortical de núcleos 8-OHdG-positivos (em 50 campos) foi maior ($p < 0,0001$; $n = 3$ por grupo) nos SHR diabéticos (mediana 1083,3, range 932 - 1255) do que nos SHR controles (mediana 683,6, range 446 - 923). O tratamento com CV foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,0001$) o dano oxidativo causado ao DNA tanto nos animais SHR diabéticos (mediana 653,8 , range 588 - 785) quanto nos controles (mediana 410,1, range 310 - 489) SHR (figura 6).

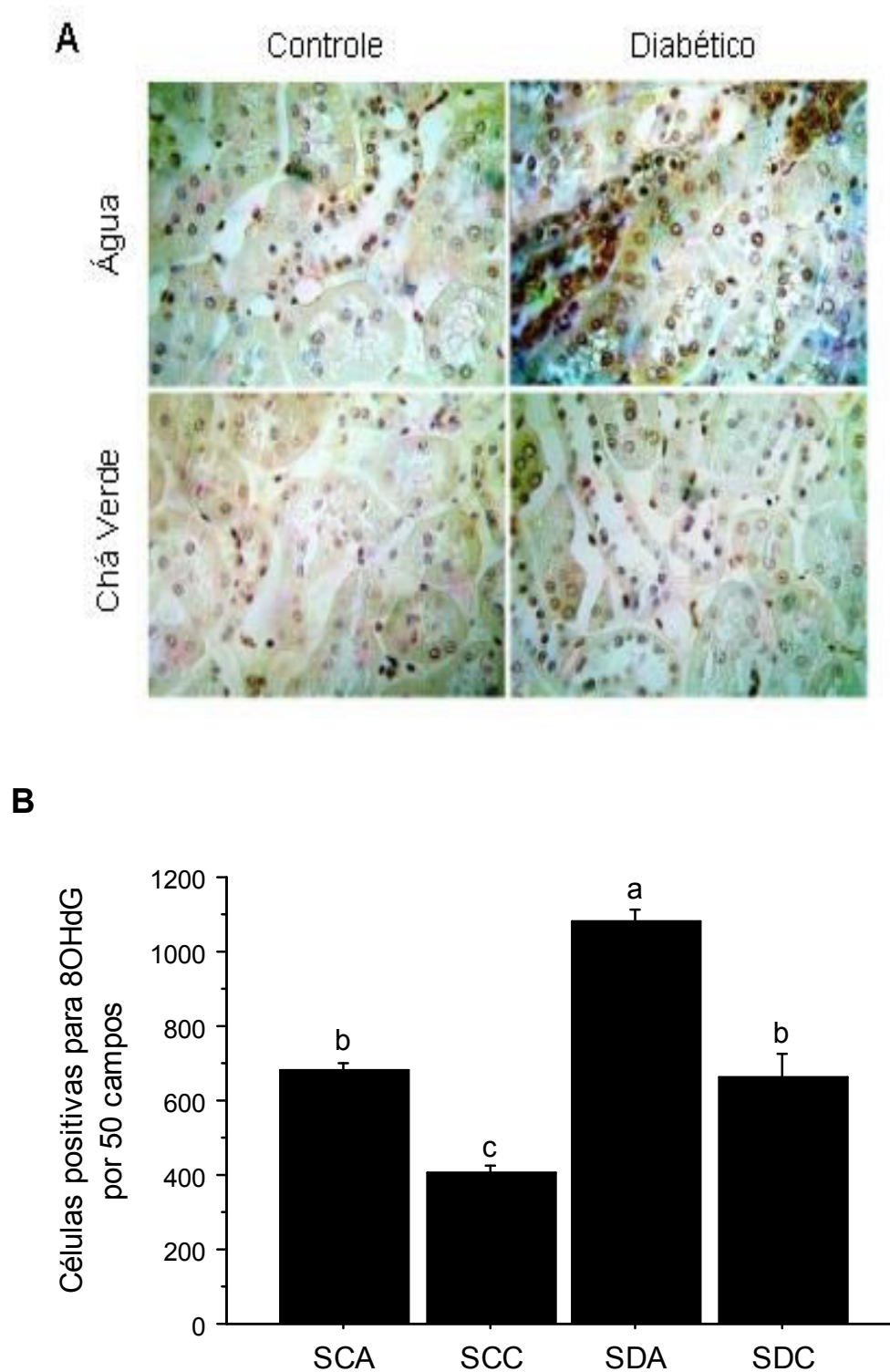


Figura 6. Detecção de dano oxidativo ao DNA por 8-OHdG. **A** Detecção de dano ao DNA induzido pelo estresse oxidativo, por imunohistoquímica, através da identificação de núcleos celulares corticais renais, contendo 8-OHdG, nos diferentes grupos de ratos. As células tubulointersticiais contendo 8-OHdG foram identificadas pelo núcleo marcado em marrom. Aumento de x400 e contra-corção com hematoxilina. **B** Mediana do número de núcleos 8-OHdG-

positivos por 50 campos e intervalo de confiança, onde $a > b > c$. Foram consideradas pelo menos 3 secções por rato (n = 5 por grupo) sendo SCA = SHR controle água; SCC = SHR controle CV; SDA = SHR diabético água; SDC = SHR diabético CV. As diferenças significativas são expressas entre os animais que possuem uma letra subscrita diferente da sua. $p < 0,05$.

4.4 O chá verde amenizou o dano renal em ratos SHR diabéticos

A excreção urinária de albumina (EUA) e o acúmulo renal de colágeno tipo IV foram usados como marcadores de dano funcional e morfológico, respectivamente, em SHR diabéticos.

4.4.1 Excreção urinária de albumina

A EUA foi significativamente ($p = 0.04$) elevada nos ratos diabéticos ($8,4 \pm 1,34$ mg/24 h) comparada aos SHR controle (SCA = $3,8 \pm 0,99$ e SCC = $3,6 \pm 1,21$). O tratamento com CV, nos SHR diabéticos, reduziu significativamente ($p = 0.04$) este parâmetro ($6,0 \pm 0,7$) a nível similar ao dos SHR controle (Figura 7).

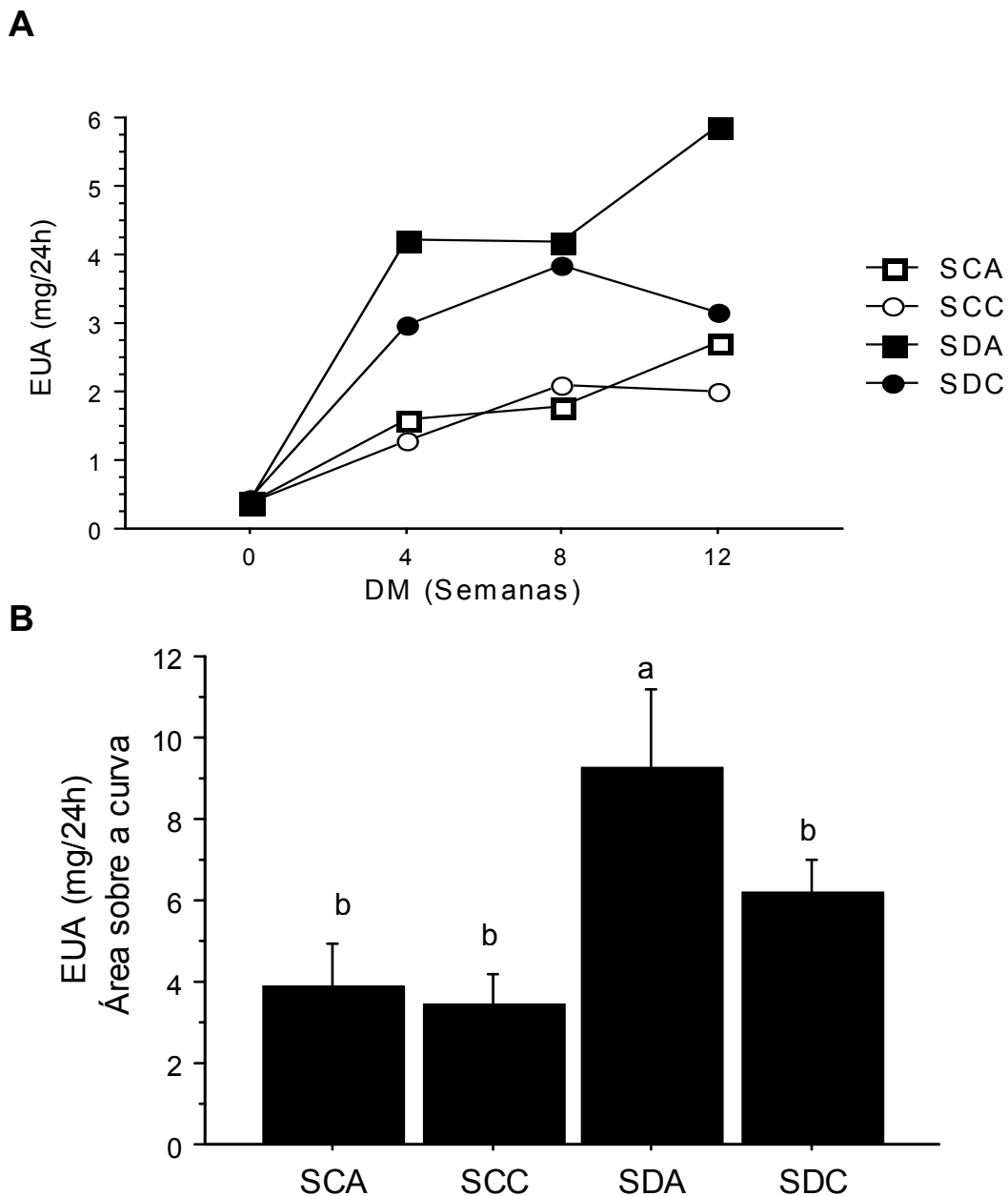


Figura 7. A Médias geométricas da excreção urinária de albumina ($\mu\text{g}/24\text{ h}$). EUA determinada durante as 12 semanas de observação dos diferentes grupos de ratos, sendo SHR controle recebendo água ($\square$ SCA), SHR controle recebendo chá verde ($\circ$ SCC), SHR diabético recebendo água ($\blacksquare$ SDA), e SHR diabético recebendo chá verde ($\bullet$ SDC). **B.** Gráfico representativo da área sobre a curva. Os valores representam as médias geométricas, onde $a > b$. As diferenças significativas são expressas entre os animais que possuem uma letra subscrita diferente da sua. $p < 0,05$.

4.4.2 Expressão cortical renal de colágeno IV

A expressão cortical renal do colágeno tipo IV foi significativamente maior ($p = 0.008$) no grupo SHR diabético (SDA = 2,25) quando comparado ao seu controle não diabético (SCA = 0,87). O tratamento com CV foi capaz de reduzir significativamente ($p = 0,01$) a expressão de colágeno IV no grupo diabético (SDC = 1.08 ± 0.31 ; figura 8). Este parâmetro demonstrou ser afetado pelo DM e pelo tratamento com CV, além de haver interação entre essas duas variáveis, mostrando uma maior ação benéfica do CV na presença do DM (Figura 8).

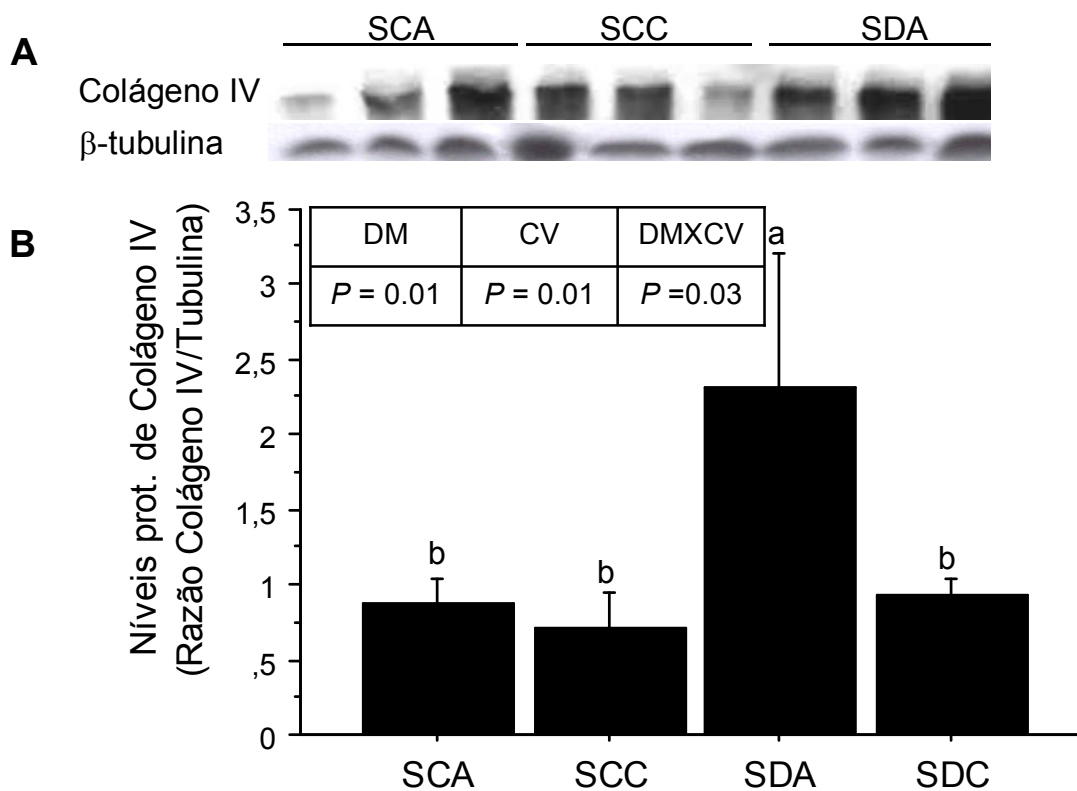


Figura 8. Análise da expressão de colágeno IV em proteína cortical renal, por Western blot. A. Blots representativos dos grupos de ratos, sendo a tubulina o controle do carga de proteínas. **B** Análise densitométrica das bandas pela razão colágeno IV/tubulina dos grupos, onde SCA = SHR controle água ; SCC = SHR controle CV ; SDA = SHR diabético água; SDC = SHR diabético CV. As barras representam as médias $\pm$ DP de pelo menos 3 experimentos independentes, sendo $a > b$. As diferenças significativas são expressas entre os animais que possuem uma letra subscrita diferente da sua. $p < 0,05$. A tabela acima da figura B representa a análise de interação entre os fatores DMXCV.

5. Discussão

Os resultados do presente estudo mostraram que o chá verde melhorou a albuminúria e acúmulo renal de colágeno IV, além de reduzir marcadores de estresse oxidativo renal, tanto em expressão quanto em lesão oxidativa ao DNA, em ratos SHR diabéticos. O mecanismo essencial destes efeitos benéficos aparentemente envolve a redução da expressão da subunidade NOX-4, da enzima NADP(P)H oxidase.

A prevenção da lesão renal no DM tem como metas centrais os controles glicêmico e pressórico (UK Prospective Group, 1998; The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1995; UK Prospective Group 38, 1998; PARVING et al, 1993). Neste sentido, estudos já demonstraram em ratos diabéticos efeito redutor da glicemia através da administração de chá verde ou de uma de suas catequinas, a EGCG (RENNO et al, 2008; YAMABE et al, 2006). Porém outros estudos, corroborando com os nossos achados, não encontraram influência do uso do chá verde na variável em questão (MUSTATA et al, 2005). Ao longo das 12 semanas de estudo, a administração de chá verde também não causou alterações na pressão arterial sistólica e no peso corporal dos ratos SHR tratados, comparando-os com seus respectivos controles. Havendo portanto a inexistência de efeito do tratamento sobre dois dos mais importantes determinantes da ND, a glicemia e a pressão arterial, nossas observações reforçam a hipótese de que o estresse oxidativo tenha tido um papel central na melhora observada nos animais diabéticos que receberam chá verde.

No tecido cortical renal dos animais SHR que receberam chá verde, observamos redução significativa da produção de superóxido pela via NAD(P)H

oxidase. Estes efeitos ocorreram de forma independente da presença do DM, sugerindo ação antioxidante ao chá verde independa da existência da doença. Os efeitos antioxidantes do chá verde há muito vêm sendo sugerido em estudos com animais e humanos. Em recente pesquisa realizada com homens que tiveram o estresse oxidativo induzido pelo exercício físico, a administração do chá verde foi capaz de reduzir a produção de espécies reativas, inibindo as enzimas xantina oxidase e a creatina cinase, além de diminuir a peroxidação lipídica (PANZA et al, 2008). Ainda, os indivíduos que receberam chá verde tiveram maior expressão do antioxidante endógeno glutathione reduzida (PANZA et al, 2008). Zhang et al demonstraram em cultura de células de retina, com estresse oxidativo induzido pela luz, que o tratamento com chá verde foi capaz de reduzir de forma muito significativa a marcação do dano oxidativo às células, diminuindo também o número de células em apoptose, mostrando a ação do chá verde na redução das ERO e seu reflexo na morte celular (ZHANG; RUSCIANO; OSBORNE, 2008)

A patogênese da doença renal no DM, tem no estresse oxidativo um fator de extrema importância (PRABHAKAR et al, 2007; BROWLEE, 2005; NISHIKAWA et al, 2000; GUZIK et al, 2002; GORIN et al, 2005; ASABA et al, 2007; CRAVEN et al, 2001). Além de reforçar esta afirmativa, nossos achados fortalecem a hipótese de que os efeitos benéficos do chá verde, vistos no tecido renal do modelo experimental utilizado, sejam mediados pela restauração do equilíbrio redox.

Apesar das fontes de aumento de produção de espécies reativas de oxigênio não serem bem conhecidas, o tecido vascular, córtex e células mesangiais podem ter na enzima NAD(P)H oxidase não fagocítica sua maior fonte de radicais livres (GUZIK et al, 2002; GEISZT et al, 2000). De acordo com nossas

observações, a produção de superóxido pela via NAD(P)H oxidase esteve aumentada na presença do diabetes e reduzida com a administração de chá verde. Ao adicionar-se um inibidor da via NAD(P)H oxidase ao meio de avaliação de produção de superóxido, esta foi completamente suprimida. Acrescentando-se, então, um inibidor da produção mitocondrial de superóxido, as leituras permaneceram inalteradas. Estes resultados demonstraram, portanto, a NAD(P)H oxidase sendo a maior fonte de radicais livres em tecido renal.

A subunidade homóloga da gp91phox da enzima NAD(P)H, a NOX-4, apresenta-se altamente expressa no rim (GORIN et al, 2005; GEISZT et al, 2000). Em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina a hiper expressão renal da NOX-4 demonstra-se um fenômeno central no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (GORIN et al, 2005; ETOH et al, 2003). No mesmo modelo de DM, Gorin et al (GORIN et al, 2005) demonstraram que a inibição da subunidade NOX-4 é capaz de suprimir completamente o estresse oxidativo renal. Este fenômeno ocorreu em concomitância com a redução da hipertrofia glomerular e do acúmulo de fibronectina. Semelhante a estes resultados, Fujii et al (FUJII et al, 2007) encontraram que a administração da pitavastatina, um tipo de estatina, à camundongos db/db melhorou a albuminúria e expansão mensangial pela redução da expressão da NOX-4. Em acordo com estes dados, estão nossas observações, nas quais em animais SHR diabéticos, a redução da expressão da NOX-4 resultante da administração de chá verde foi capaz de atenuar completamente o estresse oxidativo e o dano renal, avaliado pela redução da excreção urinária de albumina e da expressão de colágeno IV.

Os mecanismos envolvidos na regulação da NOX-4 ainda não são conhecidos, embora seja sugerido que as funções da NOX-4 independam da presença de subunidades regulatórias, diferente do que ocorre com as demais subunidades da NAD(P)H oxidase (MATRYN et al, 2006). Sugere-se que a atividade da NOX-4 possa depender da sua própria expressão (FUJII et al, 2007). O mecanismo molecular pelo qual o chá verde regulou a atividade da NOX-4 permanece por ser elucidado.

Apesar estarem listados cerca de 3.000 artigos referindo o chá verde no “Medline”, apenas 4 referem de alguma forma a nefropatia diabética. No entanto, nenhum destes 4 investigou os efeitos do chá verde na nefropatia em um modelo que combinasse hipertensão arterial e DM. Em 3 deles os autores observaram redução nas glicemias mediante uso de chá verde ou EGCG, atribuindo então ao chá a conquista deste benefício (RENNO et al, 2008; ETOH et al, 2003). Nossos resultados estão em acordo com os encontrados por Mustata et al (MUSTATA et al, 2005). Em seu estudo Mustata et al administraram chá verde durante 12 meses a ratos Lewis diabéticos induzidos por STZ e não encontraram qualquer efeito nos níveis glicêmicos. No entanto os autores observaram que o chá verde suprimiu o estresse oxidativo induzido pela mitocôndria, bem como os sinais clínicos de retinopatia diabética, como capilaridade acelular e pericitos fantasma. Neste último estudo, a avaliação dos efeitos do CV na nefropatia foi considerada “inconclusiva” uma vez que o modelo animal utilizado apresentou lesão renal muito leve.

6. Conclusão

Em ratos diabéticos e hipertensos, a chá verde melhorou o dano renal, inibindo o estresse oxidativo através da diminuição da expressão da NOX-4 . Estes achados sugerem que o consumo de chá verde possa vir à ser benéfico à pacientes nos quais diabetes e hipertensão arterial sejam doenças coexistentes.

7. Referências Bibliográficas

Amazonas RB, Lopes de Faria JB. Effects of tight blood pressure control on glomerular hypertrophy in a model of genetic hypertension and experimental diabetes mellitus. *Life Sci.* 2006; 79: 1235-1243.

Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Fujita T. Double-edged action of SOD mimetic in diabetic nephropathy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007; 49: 13-19.

Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Quinn MT, Fujita T, et al. Effects of NAD(P)H oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2005; 67: 1890-1898.

Biswas SK, Lopes de Faria JB. Which comes first: renal inflammation or oxidative stress in spontaneously hypertensive rats? *Free Radical Res.* 2007; 41: 216-224.

Biswas SK, Peixoto EB, Souza DS, Lopes de Faria JB. Hypertension increases pro-oxidant and decreases antioxidant defense in the kidney in early diabetes. *Am J Nephrol.* 2008; 28: 133-142.

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

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

Chabrashvili T, Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Quinn MT, Fujita T, et al. Expression and cellular localization of classic NAD(P)H oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension*. 2002; 39: 269-274.

Cooper ME, Allen TJ, O'Brien RC, Macmillan PA, Clarke B, Jerums G, et al. Effect of genetic hypertension on diabetic nephropathy in the rat – functional and structural characteristics. *J Hypertens*. 1988; 6: 1009-1016.

Craven PA, Melhem MF, Phillips SL, DeRubertis FR. Overexpression of $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ superoxide dismutase protects against early diabetic glomerular injury in transgenic mice. *Diabetes*. 2001; 50: 2114-2125.

Cui XL, Douglas JG. Arachidonic acid activates c-jun N-terminal kinase through NAD(P)H oxidase in rabbit proximal tubular epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 3771-3776.

Cusumano AM, Di Gioia C, Hermida O, Lavorato C; Latin American Registry of Dialysis and Renal Transplantation. The Latin American Dialysis and Renal Transplantation Registry Annual Report 2002. *Kidney Int Suppl*. 2005; 97: S46-52.

Etoh T, Inoguchi T, Kakimoto M, Sonoda N, Kobayashi K, Kuroda J, et al. Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX-4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventive insulin treatment. *Diabetologia*. 2003; 46: 1428-1437.

Fujii M, Inoguchi T, Maeda Y, Sasaki S, Sawada F, Saito R, et al. Pitavastatin ameliorates albuminuria and renal mesangial expansion by downregulating NOX-4 in db/db mice. *Kidney Int.* 2007; 72: 473-480.

Geiszt M, Kopp JB, Várnai P, Leto TL. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 8010-8014.

Giunti S, Barit D, Cooper ME. Mechanism of diabetic nephropathy: role of hypertension. *Hypertension.* 2006; 48: 519-526.

Gorin Y, Block K, Hernandez J, Bhandari B, Wagner B, Barnes JL, et al. NOX-4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney. *J Biol Chem.* 2005; 280: 39616-39626.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res* 2000; 86: 494-501.

Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Mechanism of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002; 105: 1656-1662.

Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003; 43: 89-143.

Hypertension in Diabetes Study (HDS): I. Prevalence of hypertension in newly presenting type 2 diabetic patients and the association with risk factors for cardiovascular and diabetic complications. *J Hypertens.* 1993; 11: 309-317.

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

Jones SA, Hancock JT, Jones OT, Neubauer A, Topley N. The expression of NAD(P)H oxidase components in human glomerular mesangial cells: detection of protein and mRNA for p47phox, p67phox, and p22phox. *J Am Soc Nephrol*. 1995; 5: 1483-1491.

Kayoa D, Haneda M, et al: Effects of antioxidantes in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats. *Am Soc Nephrol*. 2003; 14: S250-S253.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.

Lopes De Faria JB. Nefropatia Diabética. In: *Glomerulopatias: patogenia, clínica, tratamento*. São Paulo: Ed. Sarvier; 2006: 297-332.

Mancini GAO, Carbonaro JF: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*. 1999; 2: 235-254.

Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC, Knaus UG. Functional analysis of NOX-4 reveals unique characteristics compared to other NAD(P)H oxidases. *Cell Signal*. 2006; 18: 69-82.

Matthew JNS, Altman DG, Campbell MJ, Royston P. Analysis of serial measurements in medical research. *Br Med J*. 1990; 300: 230-35.

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. *Diabetes*. 2005; 54: 517-526.

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycemia damage. *Nature*. 2000; 404: 787-790.

Okamoto K, Tabei R, Fukushima M, Nosoka S, Yamori Y, Ichijima K, et al. Further observations of development of strain of spontaneously hypertensive rats. *Japan. Circ. Journ.* 1996, 30: 703-716.

Osawa T. Protective role of dietary polyphenols in oxidative stress. *Mechan of Ageing and Development* . 1999; 111: 133 -139.

Panza VS, Wazlawik E, Ricardo Schütz G, Comin L, Hecht KC, Da Silva EL. Consumption of green tea favorably affects oxidative stress markers in weight-trained men. *Nutrition*. 2008 ; 24, 5:433-424.

Paravancini TM, Touyz RH. NAD(P)H oxidase, reactive oxygen species, and hypertension. *Diabetes Care*. 2008; 31: s170-80.

Parving HH, Smidt UM, Hommel E, Mathiesen ER, Rossing P, Nielsen F, et al. Effective antihypertensive treatment postpones renal insufficiency in diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 1993; 22: 188-195.

Pavan MV, Ghini B, Castro M, Lopes de Faria JB. Prevention of hypertension attenuates albuminuria and renal expression of fibronectin in diabetic spontaneously hypertensive rats. *Am J Nephrol*. 2003; 23: 422-428.

Potenza MA, Marasciulo FL, Tarquinio M, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, et al. EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 292: E1378-E1387.

Prabhakar S, Starnes J, Shi S, Lonis B, Tran R. Diabetic nephropathy is associated with oxidative stress and decreased renal oxide production. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18: 2945-2952.

Renno WM, Abdeen S, Alkhalaf M, Asfar S. Effect of green tea on tubules of diabetic rats. *Br J Nutr*. 2008; 6: 1-8.

Righetti AE, Bacchi CE, Pinto GA, Lopes de Faria Jb: The genetics of hypertension simulate early renal accumulation of fibronectin in experimental diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2001; 41: 2088 – 2091.

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: 1529-1534.

Soc. Bras. de Nefrologia, Censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia. In: www.sbn.org.br. Censo SBN 2006. 2006.

The Diabetes Control and Complications (DCCT) Trial Research Group. Effect of intensive therapy on the development of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Kidney Int.* 1995; 47: 1703-1720.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) 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.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Study Group. *Br Med J* .1998; 317: 703-713.

US Renal Data System. The United State Renal Data System. In: www.usrds.org , Annual data report, 2007.

Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B. Mechanism of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2006; 2: 582-593.

Wu L, Noyan Ashraf MH, Facci M, Wang R, Paterson PG, Ferrie A, et al: Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in cardiovascular system. *PNAS.* 2004; 101: 7094-7099.

Yamabe N, Yokozawa T, Oya T, Kim M. Therapeutic potential of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate on renal damage in diabetic nephropathy model rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 319: 228-236.

Zhang, B , Rusciano, D, Osborne, NN. Orally administered epigallocatechin gallate attenuates retinal neuronal death in vivo and light-induced apoptosis in vitro. Brain Res. 2008; 10: 141-152.

8. Apêndices

8.1 Tabela de parâmetros fisiológicos

Tabela 2: Parâmetros fisiológicos medidos mensalmente nos SHR durante as 12 semanas de estudo.

	Sem 0	Sem 4	Sem 8	Sem 12	Efeito ²	P
Peso corporal (g) ¹						
SCA	256,6±20,4	338,6±44,3	350,8±33,5	354,3±37,1	D	<0,0001
SCC	259,9±16,1	315,9±16,4	333,8±18,3	349,3±21,8		
SDA	256,4±23,6	210,2±47,4	229,6±30,9	252,3±24,6		
SDC	261,5±23,7	249±25,5	242,9±56,8	277,5±52,2		
Pressão arterial sistólica (mmHg) ¹						
SCA	188,2±15,4	198,7±13,9	203,2±13,8	202,2±13,3	D X T	0,038
SCC	178,2±11,3	185,9±12,4	186,9±14,5	197,9±7,9		
DAS	178,4±11,1	180,7±9,4	192,5±16,4	192,1±16,3		
SDC	186,3±13,3	189,6±17,5	188,9±22,3	193,2±16,5		
Glicemia (mmol/L) ¹						
SCA	8,6±1,0	10,4±3,0	8,2±2,0	8,6±1,2	D	< 0,0001
SCC	8,8±0,6	9,6±2,5	8,7±1,7	8,9±1,4		
SDA	25,1±3,0	26,4±3,6	34,8±4,8	25,8±3,8		
SDC	24,1±4,1	27,9±6,5	32,3±8,7	27,0±4,5		
Volume urinário (ml/24h) ¹						
SCA	25,9±12,1	32,0±8,8	40,9±6,5	37,3±22,6	D	< 0,0001
SCC	23,0±1,4	36,4±14,5	34,8±9,9	30,3±7,1		
SDA	24,1±7,4	75,4±15,0	86,6±19,0	65,6±25,5		
SDC	22,4±8,6	86,3±13,4	83,4±18,0	69,6±35,2		

Albuminúria ($\mu\text{g}/24\text{h}$)³

SCA	383,0 $\pm$ 1,25 ^a	1486,9 $\pm$ 23,79 ^b	1526,2 $\pm$ 4,07 ^b	2510,5 $\pm$ 38,99 ^b
SCC	357,5 $\pm$ 1,64 ^a	1268,7 $\pm$ 7,58 ^b	1978,3 $\pm$ 24,78 ^b	1900,0 $\pm$ 22,40 ^b
SDA	404,8 $\pm$ 1,99 ^a	4189,2 $\pm$ 17,14 ^a	3927,0 $\pm$ 70,89 ^a	5735,7 $\pm$ 44,12 ^a
SDC	452,9 $\pm$ 2,02 ^a	2720,4 $\pm$ 39,21 ^a	3326,7 $\pm$ 54,81 ^a	2798,8 $\pm$ 30,08 ^b

Razão peso do rim/peso corporal¹

SCA	3,8 $\pm$ 0,3	D	< 0,0001
SCC	3,7 $\pm$ 0,2		
SDA	5,2 $\pm$ 1,0		
SDC	4,9 $\pm$ 1,3		

¹ Valores expressos como média $\pm$ DP. Valores em uma mesma coluna sem uma letra sobrescrita comum, são diferentes, $P < 0,05$ (Fisher's test), $n=8$ ratos/grupo.

² Efeitos significantes determinados por ANOVA de 2 fatores, D: diabetes, T: tratamento, D X T: efeito interativo.

³ Albuminúrias são expressas como média geométrica e intervalo de confiança.

8.2 Artigo Publicado:

The Journal of Nutrition: January 2009, Volume 139, Number 1.

Green tea (*Camellia sinensis*) attenuates nephropathy by downregulating Nox4 NADPH oxidase in diabetic spontaneously hypertensive rats

Pérola D.B. Ribaldo¹, Denise S. Souza¹, Subrata K. Biswas¹, Karen Block²,
Jacqueline M. Lopes de Faria¹ and José B. Lopes de Faria¹

¹Laboratory of Renal Pathophysiology, Nephrology Unit, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, 13084-971 Brazil;

²Department of Medicine, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX 78229-3900

Address correspondence and reprint requests to Dr. José B. Lopes de Faria, Renal Pathophysiology Laboratory, Nephrology Unit, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), PO Box 6111, Campinas, SP, Brazil, CEP 13084-971. Telephone: +55-19-3521-7499, fax: +55-19-3521-7366, e-mail: jblfaria@fcm.unicamp.br

Key words: albuminuria; diabetic nephropathy; green tea; Nox4 NADPH oxidase; oxidative stress.

Running head: Green tea in diabetic nephropathy

Abstract

Green tea (GT) by its antioxidant properties may be useful to treat or prevent human diseases. Since several lines of evidence suggest that oxidative stress contributes to the pathogenesis of diabetic nephropathy, we tested the hypothesis that GT prevents diabetes and hypertension-related renal oxidative stress, attenuating renal injury. Spontaneously hypertensive rats (SHR) with streptozotocin-induced diabetes and non-diabetic SHR were treated daily with tap water or freshly prepared GT (13.3 g/L). After 12 wk, the systolic blood pressure did not differ between treated and untreated non-diabetic or diabetic rats. However, body weight was significantly ($P < 0.05$) less and glycemia greater in diabetic SHR than in non-diabetics. Renal oxidative stress variables such as 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and nitrotyrosine expression, NADPH oxidase-dependent superoxide generation and the expression of renal cortex Nox4 were significantly ($P < 0.05$) greater in diabetic rats that received water (DW) than in non-diabetic rats that received water (CW). The 8-OHdG and NADPH oxidase-dependent superoxide generation were significantly less in rats treated with GT. Nitrotyrosine and Nox4 expression were significantly less in diabetic rats that received GT (DGT) than in DW. Likewise, the indices of renal injury, albuminuria and renal expression of collagen IV were significantly greater in DW than in CW. These differences were significantly less in DGT than in DW. GT reestablished the redox state and reduced the indicators of nephropathy without altering glycemia and blood pressure levels in diabetic SHR. These findings suggest that the consumption of GT may ameliorate nephropathy in diabetic hypertensive patients.

Introduction

Hypertension and diabetes frequently coexist and the presence of these two conditions significantly magnifies the risk of nephropathy (1). Accordingly, blood glucose and blood pressure are among the most effective maneuvers for the treatment and prevention of diabetic renal disease (2-5). Likewise, the presence of hypertension in experimental diabetes mellitus (DM) aggravates and anticipates renal abnormalities (6) that can be prevented by antihypertensive therapy (7).

Diabetic nephropathy is primarily metabolic and hemodynamic in origin and results from interaction between genetic susceptibility and environmental factors (8). There is considerable evidence that oxidative stress has a role in the pathogenesis of diabetic nephropathy (9). Hyperglycemia and hypertension can activate multiple pathways that lead to increased generation of superoxide anions and other reactive oxygen species (ROS) (reviewed in 10, 11). Some of these pathways include enhanced activity of the mitochondrial electron transport chain induced by hyperglycemia (12), increased expression and “uncoupling” of endothelial nitric oxide (NO) synthase (eNOS) leading to greater production of superoxide relative to NO (9), and activation of the reduced forms of NADPH (13-15). The latter system is present in different renal cell types (16, 17) and may contribute to renal damage in the presence of diabetes or hypertension (18, 19). In addition, we have recently shown that hypertension increases renal oxidative stress by elevating NADPH-dependent superoxide production and decreasing antioxidant defenses in

spontaneously hypertensive rats (SHR) with streptozotocin (STZ)-induced diabetes (19).

Strategies that reduce superoxide formation via NADPH oxidase and/or increase the activity of antioxidant defense systems can attenuate hyperglycemia-induced renal injury (18, 20-22). For instance, phosphorothioated antisense oligonucleotides for Nox4, a homolog of the gp91phox subunit of NADPH oxidase, inhibits NADPH-dependent ROS generation in the renal cortex and reduces glomerular hypertrophy and the expression of renal fibronectin (20).

Green tea (*Camellia sinensis*; GT) is a rich source of polyphenols, particularly flavonoids that have beneficial effects in the treatment of certain forms of cancer, arthritis and cardiovascular disorders (reviewed in 23). The administration of epigallocatechin gallate, a polyphenol that accounts for ~30% of the dry weight of GT, to SHR improves endothelial function and insulin sensitivity and reduces blood pressure (24). In rats with STZ-induced diabetes, the administration of GT in the drinking water improves renal function and reduces the blood glucose and glycated protein concentrations (25). GT also attenuates the retinopathy and renal mitochondrial ROS production in this same model (26). Although most of the biological actions of GT have been attributed to its antioxidant properties (23), there has been no systematic study of its efficacy in preventing oxidative stress caused by hypertension and hyperglycemia, thereby protecting against renal injury.

In this work, we tested the hypothesis that green tea attenuates renal injury in diabetic hypertensive rats. In addition, to explore the underlying molecular mechanisms the effects of GT on the expression of NADPH oxidase Nox4, which is a major source of ROS production in the kidney (20), was examined.

Materials and Methods

Animals and experimental protocol

This study complied with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (CEEa/IB/UNICAMP, protocol number 1119-1). SHR (Taconic, Germantown, NY, USA) bred in our animal facility were used in this study. Experimental diabetes was induced in 12-wk-old hypertensive male SHR (~250 g) by a single intravenous (tail vein) injection of streptozotocin (STZ; 50 mg/kg; dissolved in sodium citrate buffer, pH 4.5; Sigma, St. Louis, MO, USA) after overnight food deprivation. Non-diabetic SHR received only vehicle (citrate buffer). Seventy-two hours after the injection of STZ or citrate buffer, blood glucose concentrations were measured with a colorimetric enzymatic GOD-PAP assay (Merck, Darmstadt, Germany) in rats deprived of food for 4 h. Rats with blood glucose concentrations ≥ 15 mmol/L were considered diabetic for these experiments. Diabetic and non-diabetic SHR were randomly assigned to groups of eight rats each that received only water [non-diabetic water (CW, $n = 8$) and diabetic water (DW, $n = 8$)] or GT [non-diabetic GT (CGT, $n = 8$) and diabetic GT

(DGT, n = 8)] as their sole source of drinking water for 12 wk. All of the rats were housed in groups of 4 and were fed nonpurified, pelletized rat diet containing 22% protein, 55% carbohydrate and 4.5% fat (Nuvital Nutrientes S/A, Paraná, Brazil). Diabetic rats received 2 U of long-acting insulin (Novo Industry A/S, Copenhagen, Denmark) three times each week. Japanese green tea (Midori Indústria de Chá Ltda., São Miguel Arcanjo, SP, Brazil) was prepared daily as described by the manufacturer: 10 g of dry tea was added to 750 mL of deionized boiled tap water cooled to 90°C and then brewed for 3 min, decanted, filtered, placed on ice, and protected from light with aluminum foil.

Variables measured

Body weight, plasma glucose, systolic blood pressure (SBP) and albumin excretion rate (AER) were measured at 0, 4, 8 and 12 wk. The rats were euthanized by CO₂ asphyxia 12 wk after the induction of diabetes. The abdomen was opened via a midline incision and the right kidney was immediately removed, decapsulated, weighed and processed for homogenization of the cortical tissue. The left kidney was similarly removed and cut longitudinally into two halves: one half was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C, and the other half was fixed by immersion in methacarn (60% methanol, 30% chloroform and 10% glacial acetic acid).

Systolic blood pressure measurements

SBP was measured by tail-cuff plethysmography with an MK III physiograph (Narco Bio-System, Houston, TX, USA) in unanesthetized rats before

randomization (five determinations per rat) and every four wk throughout the experiment.

Albumin excretion rate (AER)

Before the induction of diabetes mellitus and every four wk throughout the experiment urine samples were collected by placing each rat in a metabolic cage for 24 h. The urine samples were analyzed by single radial immunodiffusion to determine the AER, as previously described (7, 19).

NADPH oxidase activity

NADPH oxidase activity was measured by the lucigenin-enhanced chemiluminescence method as previously described by Gorin et al (20), with few modifications (19). Superoxide production was measured every 20 s for 10 min and expressed as relative luminescence units (RLU)/20s/mg of protein. Diphenyleneiodonium, an inhibitor of flavin-containing oxidases, and rotenone, an inhibitor of complex I of the mitochondrial respiratory chain, were used to identify the source of superoxide production. Protein concentrations were measured using the Bradford dye-binding method (27) with bovine serum albumin as the standard.

Western blot

Renal cortical homogenates were prepared as described elsewhere (19) and were used to quantify nitrotyrosine (an indicator of oxidative/nitrosative stress-induced protein modifications), collagen IV and Nox4 (a homolog of the gp91phox subunit of NADPH oxidase) by western blot analysis (19). Molecular weight markers

(PageRuler™, Fermentas Life Sciences) were used as standards. The proteins were separated on 10% polyacrylamide gels and electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes. After blocking with 5% non-fat milk, the membranes were incubated with the following primary antibodies: mouse monoclonal anti-nitrotyrosine antibody (1:2,000; clone 1A6, Upstate, Lake Placid, NY), goat anti-type IV collagen antibody (1:500; Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) or rabbit polyclonal anti-Nox4 (1:2,000) (20). After washing with PBST (phosphate buffer saline containing 0.1% Tween-20), the membranes were incubated with appropriate horseradish peroxidase–conjugated secondary antibodies (Santa Cruz). Immunoreactive bands were visualized using the enhanced chemiluminescence method (Super Signal CL-HRP Substrate System; Pierce, Rockford, IL, USA). The uniformity of protein loading and the transfer efficiency were assessed by reprobing the membranes for actin (goat polyclonal anti-actin antibody, 1:1000, Santa Cruz) or β -tubulin (anti- β -tubulin mouse mAb DM1B, 1:1000, Calbiochem). Exposed films were scanned with a laser densitometer (Bio-Rad) and were analyzed quantitatively with Multi-Analyst Macintosh Software for Image Analysis Systems (Bio-Rad).

Immunohistochemistry

Oxidative stress-induced DNA base modification was assessed by immunohistochemistry for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG, a DNA base-modified product) in 4- μ m-thick sections of methacarn-fixed, paraffin-embedded renal tissue, using a mouse monoclonal anti-8-OHdG antibody (N45.1; Japan

Institute for the Control of Aging, Japan), as previously described (19). Tubulointerstitial cells containing 8-OHdG-positive nuclei were counted in 50 sequential high power microscopic fields (x400) by an observer unaware of the study group from which the section was derived.

Statistical analysis

The results were expressed as the mean $\pm$ SD. Two-way ANOVA was used to analyze the data. For body weight, SBP, glycemia and urine volume two-way ANOVA for repeated measures was used. Nonparametric data such as the number of positive cells for 8-OHdG were analyzed after conversion to rank. When the diabetes x green tea interaction was significant, Fisher's protected least significant difference test was performed. Differences in albuminuria between groups were assessed as the area under the curve and the results compared using Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests (28). Statistical significance was set at $P < 0.05$. All analyses were done using StatView software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results

Physiological variables

Body weight gain was less ($P < 0.0001$) in diabetic SHR than in controls. The kidney weight (g/100g body) was markedly greater ($P < 0.0001$) in DW (0.52 ± 1.0)

and DGT (4.9 ± 1.3) than in controls (CW = 3.8 ± 0.3 , CGT = 3.7 ± 0.2). The systolic blood pressure was similar in all groups. The blood glucose concentration was greater in diabetic than in controls but was not affected by GT (Table 1).

NADPH-dependent superoxide generation, Nox4 expression and oxidative stress markers

NADPH-dependent superoxide production was greater ($P = 0.01$) in renal cortical homogenates of DW rats compared to the controls, and was less ($P = 0.01$) in GT treated groups (Figure 1). Pre-incubation of renal cortical homogenates with diphenyleneiodonium (final concentration, $20 \mu\text{mol/L}$) completely blocked NADPH-induced superoxide production whereas pre-incubation with rotenone (final concentrations of 20 and $100 \mu\text{mol/L}$) did not affect superoxide production (data not shown). These results indicated that NADPH oxidase was the most likely source of superoxide anion.

The expression of Nox4 was significantly greater ($P = 0.04$) in DW compared with CW and it was reduced to the levels of both control groups in the DGT (DM x GT, $P=0.03$) (Figure 2 A, B).

The nitrotyrosine concentration was significantly greater in DW than CW and CGT groups ($P = 0.01$), and it was significantly ($P = 0.04$) reduced to both non-diabetic levels in DGT SHR (DM x GT, $P = 0.03$) (Figure 2 C, D).

The number of renal cortical cells with 8-OHdG-positive nuclei was greater ($P < 0.01$) in DW than in CW, and it was reduced by GT treatment ($P < 0.01$) (Supplemental Figure 1).

Renal injury indices

The urinary albumin excretion rate (AER) and the accumulation of kidney collagen IV were used as markers of functional and morphological renal injury, respectively. The AER estimated as the area under the curve was ($P = 0.048$) greater in DW than CW and was less in DGT than in DW (Figure 3). Western blotting showed that renal cortical expression of collagen IV was greater ($P = 0.01$) in DW than in non-diabetic SHR, and was reduced to the levels of both non-diabetic groups in the DGT (DM x GT, $P = 0.03$) (Figure 4 A, B).

Discussion

The results of this study show that GT ameliorates the albuminuria and renal accumulation of collagen IV and reduces markers of renal oxidative stress in diabetic SHR. The underlying mechanism of these beneficial effects apparently involves the downregulation of NADPH oxidase Nox4 expression.

The adequate control of blood pressure and blood glucose concentration is central to the treatment and prevention of renal lesions in diabetes (2-5). GT and epigallocatechin gallate, the main polyphenolic component of GT, reduce blood glucose in diabetic rats (25, 29), although this effect is not always observed (26). Our findings agree with the latter study since GT did not affect the blood pressure

or blood glucose concentrations of SHR. This observation further supports the importance of oxidative stress in the renal injury seen here and strengthens the supposition that the beneficial effects of GT in renal tissue were mediated by restoration of the redox status.

Nox4, a homolog of the gp91phox subunit of NADPH, is highly expressed in the kidney (20, 30). Overexpression of Nox4 in the kidney of diabetic rats with STZ-induced diabetes may play an important role in increased ROS production (20, 31). Gorin et al (20) reported that downregulation of Nox4 induced by antisense oligonucleotides completely attenuated oxidative stress in the kidneys of rats with STZ-induced diabetes and that there was a concomitant reduction in glomerular hypertrophy and the accumulation of fibronectin. Similarly, Fujii et al (32) found that the administration of a statin, pitavastatin, to db/db mice ameliorated the albuminuria and renal mesangial expansion by downregulating Nox4. In agreement with these findings, the downregulation of Nox4 by GT completely attenuated oxidative stress and renal injury in diabetic SHR. The molecular mechanism by which GT regulates Nox4 activity remains to be elucidated.

In conclusion, GT ameliorates renal injury in diabetic hypertensive rats by inhibiting oxidative stress through downregulation of Nox4 expression. These findings suggest that GT consumption may be beneficial in diabetic hypertensive patients.

Acknowledgments

We thank Sergio Magalhães for technical assistance and Kamila C. Silva, Renata Serrer, Elisa B. M. Peixoto, Bruno S. Pessoa, Camila C. Pinto, Mariana Rosales, Christine Marinho, Felipe Val and Adriana Matos for help with various laboratory procedures. We also thank Stephen Hyslop for editing the manuscript.

Figure legends

Figure 1. NADPH oxidase activity in renal cortical homogenates from non-diabetic and diabetic SHR that consumed water or green tea for 12 wk. **A** Superoxide anion generation measured every 20 s for 10 min. **B** Mean NADPH oxidase activities during the last 5 min were used for comparison among the groups. Bars represent the mean $\pm$ SD, $n = 5-8$. Means without a common letter differ, $P < 0.05$.

Figure 2. Representative western blots of the renal cortical expression from non-diabetic and diabetic SHR that consumed water or green tea for 12 wk of **A** Nox4 and **C** nitrotyrosine. Densitometric analysis of both bands was used to determine the **B** Nox4/actin ratio and **D** nitrotyrosine/actin ratio, presented as arbitrary units (AU). Bars represents the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments ($n = 3 - 4$ rats per group). Means without a common letter differ, $P < 0.05$.

Figure 3. Albumin excretion rate from non-diabetic and diabetic SHR that consumed water or green tea for 12 wk. Histogram representative of albuminuria

accessed as the area under the curve, $n = 8$ per group. Means without a common letter differ, $P < 0.05$.

Figure 4. A Representative western blots of the renal cortical expression from non-diabetic and diabetic SHR that consumed water or green tea for 12 wk of collagen IV and **B** densitometric analysis of both bands was used to determine the collagen IV/ β -tubulin ratio, presented as arbitrary units (AU). Bars represents the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments ($n = 3 - 4$ rats per group). Means without a common letter differ, $P < 0.05$.

Literature Cited

1. Hypertension in Diabetes Study (HDS). I. Prevalence of hypertension in newly presenting type 2 diabetic patients and the association with risk factors for cardiovascular and diabetic complications. *J Hypertens.* 1993; 11: 309-17.
2. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) 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: 837-53.
3. The Diabetes Control and Complications (DCCT) Trial Research Group. Effect of intensive therapy on the development of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Kidney Int.* 1995; 47: 1703-20.
4. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Study Group. *Br Med J.* 1998; 317: 703-13.
5. Parving HH, Smidt UM, Hommel E, Mathiesen ER, Rossing P, Nielsen F, Gall MA. Effective antihypertensive treatment postpones renal insufficiency in diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 1993; 22: 188-95.

6. Cooper ME, Allen TJ, O'Brien RC, Macmillan PA, Clarke B, Jerums G, Doyle AE. Effect of genetic hypertension on diabetic nephropathy in the rat – functional and structural characteristics. *J Hypertens*. 1988; 6: 1009-16.
7. Amazonas RB, Lopes de Faria JB. Effects of tight blood pressure control on glomerular hypertrophy in a model of genetic hypertension and experimental diabetes mellitus. *Life Sci*. 2006; 79: 1235-43.
8. Giunti S, Barit D, Cooper ME. Mechanism of diabetic nephropathy: role of hypertension. *Hypertension*. 2006; 48: 519-26.
9. Prabhakar S, Starnes J, Shi S, Lonis B, Tran R. Diabetic nephropathy is associated with oxidative stress and decreased renal oxide production. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18: 2945-52.
10. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 54: 1615-25.
11. Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B. Mechanism of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006; 2: 582-93.
12. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, et al. Normalizing mitochondrial superoxide

- production blocks three pathways of hyperglycemia damage. *Nature*. 2000; 404: 787-90.
13. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Mechanism of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002; 105: 1656-62.
14. Chabrashvili T, Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Quinn MT, Fujita T, Welch WJ, Wilcox CS. Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension*. 2002; 39: 269-74.
15. Biswas SK, Lopes de Faria JB. Which comes first: renal inflammation or oxidative stress in spontaneously hypertensive rats? *Free Radical Res*. 2007; 41: 216-24.
16. Cui XL, Douglas JG. Arachidonic acid activates c-jun N-terminal kinase through NADPH oxidase in rabbit proximal tubular epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 3771-76.
17. Jones SA, Hancock JT, Jones OT, Neubauer A, Topley N. The expression of NADPH oxidase components in human glomerular mesangial cells:

- detection of protein and mRNA for p47phox, p67phox, and p22phox. *J Am Soc Nephrol.* 1995; 5: 1483-91.
18. Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Quinn MT, Fujita T, Wilcox CS. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2005; 67: 1890-98.
19. Biswas SK, Peixoto EB, Souza DS, Lopes de Faria JB. Hypertension increases pro-oxidant and decreases antioxidant defense in the kidney in early diabetes. *Am J Nephrol.* 2008; 28: 133-42.
20. Gorin Y, Block K, Hernandez J, Bhandari B, Wagner B, Barnes JL, Abboud HE. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney. *J Biol Chem.* 2005; 280: 39616-26.
21. Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Fujita T. Double-edged action of SOD mimetic in diabetic nephropathy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007; 49: 13-19.
22. Craven PA, Melhem MF, Phillips SL, DeRubertis FR. Overexpression of Cu²⁺/Zn²⁺ superoxide dismutase protects against early diabetic glomerular injury in transgenic mice. *Diabetes.* 2001; 50: 2114-25.

23. Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003; 43: 89-143.
24. Potenza MA, Marasciulo FL, Tarquinio M, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Kim JA, Quon MJ, Montagnani M. EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 292: E1378-87.
25. Renno WM, Abdeen S, Alkhalaf M, Asfar S. Effect of green tea on tubules of diabetic rats. *Br J Nutr.* 2008; 6: 1-8.
26. Mustata GT, Rosca M, Biemel KM, Reihl O, Smith MA, Viswanathan A, Strauch C, Du Y, Tang J, et al. Paradoxical effects of green tea (*Camellia sinensis*) and antioxidant vitamins in diabetic rats. *Diabetes.* 2005; 54: 517-26.
27. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.

28. Matthew JNS, Altman DG, Campbell MJ, Royston P. Analysis of serial measurements in medical research. *Br Med J*. 1990; 300: 230-35.
29. Yamabe N, Yokozawa T, Oya T, Kim M. Therapeutic potential of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate on renal damage in diabetic nephropathy model rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 319: 228-36.
30. Geiszt M, Kopp JB, Várnai P, Leto TL. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 8010-14.
31. Etoh T, Inoguchi T, Kakimoto M, Sonoda N, Kobayashi K, Kuroda J, Sumimoto H, Nawata H. Increased expression of NADPH oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventive insulin treatment. *Diabetologia*. 2003; 46: 1428-37.
32. Fujii M, Inoguchi T, Maeda Y, Sasaki S, Sawada F, Saito R, Kobayashi K, Sumimoto H, Takayanagi R. Pitavastatin ameliorates albuminuria and renal mesangial expansion by downregulating NOX4 in db/db mice. *Kidney Int*. 2007; 72: 473-80.

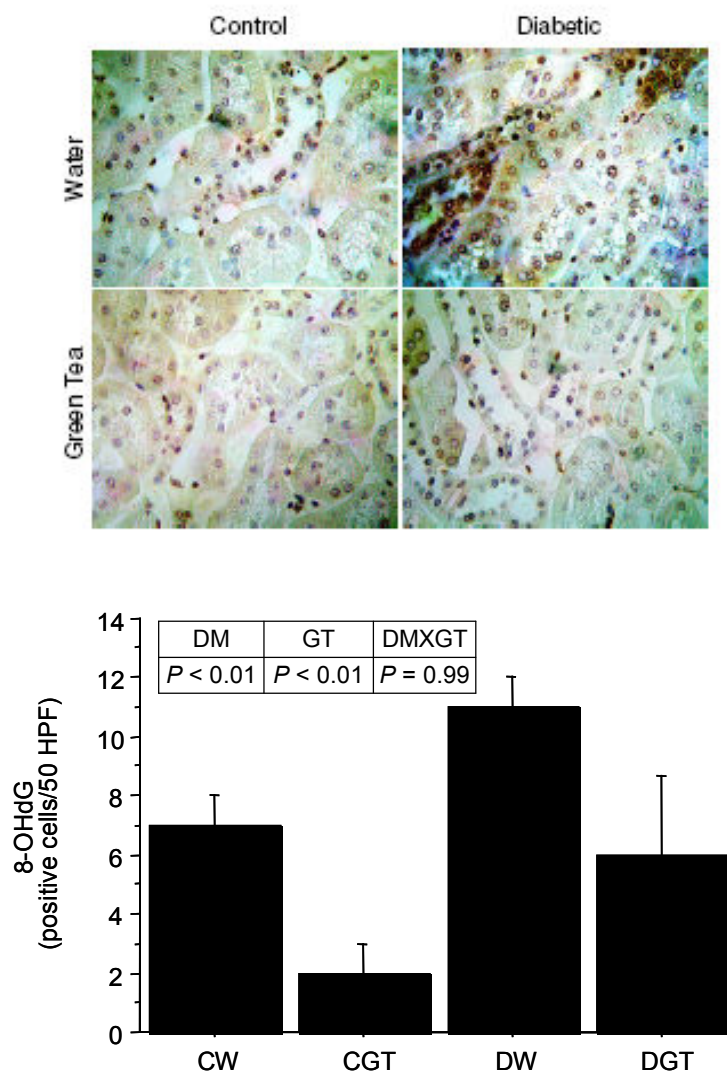
Table 1: Physiological variables measured monthly from non-diabetic and diabetic SHR that consumed water or green tea for 12 wk¹.

	wk 0	wk 4	wk 8	wk 12	Effect ²	P
Body weight (g)						
CW	256±20.4	338.6±44.3	350.8±33.5	354.3±37.1	DM	<0.0001
CGT	259.9±16.1	315.9±16.4	333.8±18.3	349.3±21.8		
DW	256.4±23.6	210.2±47.4	229.6±30.9	252.3±24.6		
DGT	261.5±23.7	249±25.5	242.9±56.8	277.5±52.2		
Systolic blood pressure (mmHg)						
CW	188.2±15.4	198.7±13.9	203.2±13.8	202.2±13.3	DM X GT	0.038
CGT	178.2±11.3	185.9±12.4	186.9±14.5	197.9±7.9		
DW	178.4±11.1	180.7±9.4	192.5±16.4	192.1±16.3		
DGT	186.3±13.3	189.6±17.5	188.9±22.3	193.2±16.5		
Blood glucose (mmol/L)						
CW	8.6±1.0	10.4±3.0	8.2±2.0	8.6±1.2	DM	< 0.0001
CGT	8.8±0.6	9.6±2.5	8.7±1.7	8.9±1.4		
DW	25.1±3.0	26.4±3.6	34.8±4.8	25.8±3.8		
DGT	24.1±4.1	27.9±6.5	32.3±8.7	27.0±4.5		
Urine volume (mL/24 h)						
CW	25.9±12.1	32.0±8.8	40.9±6.5	37.3±22.6	DM	< 0.0001
CGT	23.0±1.4	36.4±14.5	34.8±9.9	30.3±7.1		
DW	24.1±7.4	75.4±15.0	86.6±19.0	65.6±25.5		
DGT	22.4±8.6	86.3±13.4	83.4±18.0	69.6±35.2		

¹ Values are expressed as the mean ± SD, n = 8.

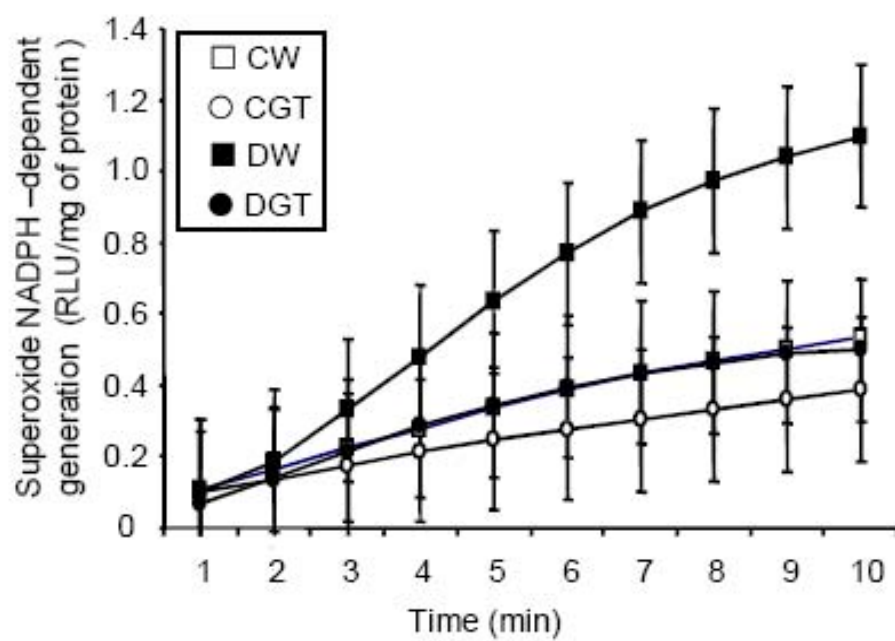
² Significant effects detected in repeated measures two-way ANOVA. DM: diabetes, GT: green tea, DM X GT: interaction between DM and GT.

Online Supporting Material



Supplemental Figure 1. A Immunohistochemical detection of oxidative stress-induced DNA damage from non-diabetic and diabetic SHR that consumed water or green tea for 12 wk. Tubulointerstitial cells containing 8-OHdG were identified by their brown-colored (darker) nuclei. Original magnification x400. Counterstained with hematoxylin. **B** The median number of tubulointerstitial 8-OHdG-containing cells per 50 high-power fields (HPF). At least three sections were stained and evaluated for each rat, n = 5.

A



B

