

# Efeitos do uso de antioxidantes do tipo ômega 3 e ácido lipoico na córnea e conjuntiva de ratas Wistar submetidas a um modelo experimental de olho seco

Jordana Salete Putti<sup>a</sup>, Mara S. Benfato<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Estresse Oxidativo, Departamento de Biofísica, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

## Introdução

A síndrome do olho seco pode ser caracterizada como um desequilíbrio entre os mecanismos de proteção e os agentes externos nocivos à superfície ocular. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio desempenham um papel importante na regulação do filme lacrimal, que é um dos principais mecanismos de proteção do olho. O uso de ácidos graxos de cadeia longa ômega-3 tem contribuído para o controle do estresse oxidativo na glândula lacrimal, córnea e conjuntiva. O ácido alfa-lipoico, é um componente que está presente em tecidos humanos em pequenas quantidades e possui efeitos biológicos como quelação de espécies reativas, interação e regeneração de outros antioxidantes como a vitamina C.

## Objetivos e Métodos

Avaliar o estresse oxidativo na córnea e conjuntiva de ratas Wistar submetidas à ovariectomia como modelo proposto de olho seco e a resposta destes tecidos ao tratamento com diferentes substâncias antioxidantes quando os animais forem tratados com ácidos graxos ômega-3 EPA (ácido eicosapentaenoico), DHA (ácido docosaenoico) e ácido lipoico.

### Ensaio

|                            |  |
|----------------------------|--|
| Aconitase                  | Formação de isocitrato, por espectrofotometria |
| Carbonil                   | Reação com DTNB por espectrofotometria         |
| Nitritos e Nitratos        | Reação de Griess por espectrofotometria        |
| Vitamina C                 | Cromatografia Líquida de Alta Performance      |
| Superóxido dismutase (SOD) | Kit comercial                                  |

O teste de Schirmer foi realizado através da colocação de papel filtro Whatman nº 40, confeccionado com 2 mm de largura por 30 mm de comprimento, em fundo de saco conjuntival durante 5 minutos e com leitura de umedecimento. Este teste foi realizado no pré-operatório e antes da retirada dos órgãos.

## Delineamento

### Animais

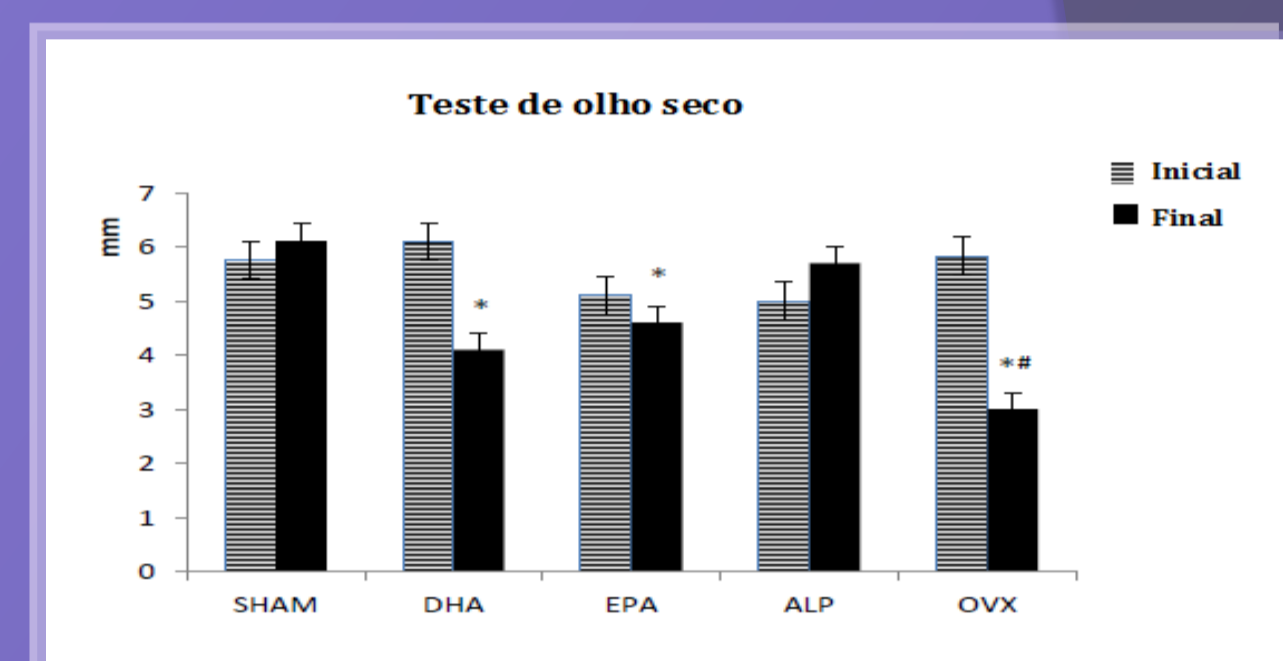
O estudo foi realizado com 50 ratas, com 3 meses de idade, que foram acondicionadas em caixas de polipropileno com 5 animais por caixa, mantidas em ciclo de claro/escuro de 12 h, temperatura de 23° C +/- 1° C e com umidade de 60% +/- 10%. As ratas foram separadas em 5 grupos com 10 animais em cada (sham, EPA, DHA, ácido lipoico e ovariectomizada - ovx) e receberam dieta *ad libidum* durante 30 dias para posterior retirada dos ovários. Realizou-se a ovariectomia bilateral através de incisão na linha média. Após estabilização hormonal de 1 semana iniciou-se a suplementação alimentar na ração com ácido ômega-3 EPA 1 g/kg peso por dia, DHA 1 g/kg peso por dia e ácido lipoico 180 mg/kg peso por dia, o que ocorreu durante 15 semanas. Após este período as ratas foram anestesiadas com xilazina (10 mg/kg) e quetamina (60 mg/kg) e perfundidas para retiradas dos tecidos, os quais foram congelados em nitrogênio líquido e conservados à -80° C.

### Referências:

- DEMIR, Ü.; DEMIR, T. & ILHAN, N. The protective effect of alpha-lipoic acid against oxidative damage in rabbit conjunctiva and cornea exposed to ultraviolet radiation. *Ophthalmologica*, 219: 49-53, 2005.
- SULLIVAN, D.A.; BLOCH, K.J. & ALLANSMITH, M.R. Hormonal influence on the secretory immune system of the eye: androgen control of secretory component production by the rat exorbital gland. *Immunology*, 52: 239-247, 1984.
- CEJKOVÁ, J.; ARDAN, T.; SIMONOVÁ, Z.; CEJKA, C.; MALEC, J.; JIRSOVÁ, K.; FILIPEC, M.; DOTRELOVÁ, D. & BRUNOVÁ, B. Nitric oxid synthase induction and cytotoxic nitrogen-related oxidant formation in conjunctival epithelium of dry eye (Sjögren's syndrome). *Nitric Oxide*, 17: 10-17, 2007.
- WÄTHES, C.; ABAYASEKARA, R. E. & AITKEN, R. J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell. Biol Reprod*, 77: 190-201, 2007.

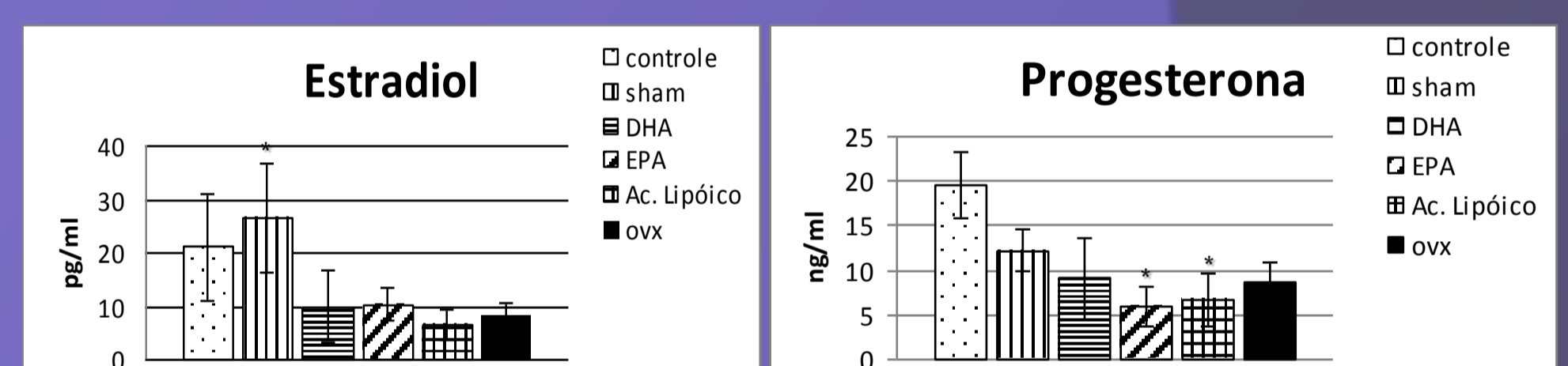
## Resultados

### Teste de Schirmer para olho seco



Resultados expressos em média ± desvio padrão. Significância determinada por ANOVA de medidas repetidas onde  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo. \* indica diferença estatística com relação ao grupo Sham no final do estudo. # indica diferença estatística no mesmo grupo no início e final do estudo.

### Dosagem hormonal



\* Indica diferença estatisticamente significativa com  $p \leq 0,05$ . O estradiol mostrou-se elevado apenas no grupo Sham, ao passo que a progesterona mostrou-se significativamente menor nos grupos EPA e Ác. Lipoico, comparado com os demais grupos.

### Ensaio

|  |            | Sham             | DHA               | EPA               | Ác. Lip.         | OVX               |
|--|------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| SOD (U/mg proteína)                    | Córnea     | 424,958 ± 104,01 | 413,501 ± 107,77  | 360,084 ± 162,45  | 434,646 ± 135,62 | 348,316 ± 159,91  |
|  | Conjuntiva | 396,805 ± 178,54 | 494,592 ± 144,92  | 415,570 ± 46,28   | 302,244 ± 46,36  | 334,651 ± 101,16  |
| Vitamina C (mg/g proteína)             | Córnea     | 0,012 ± 0,003    | 0,053 ± 0,002*    | 0,010 ± 0,003     | 0,027 ± 0,017    | 0,008 ± 0,008     |
|  | Conjuntiva | 0,109 ± 0,06     | 0,122 ± 0,02      | 0,105 ± 0,07      | 0,170 ± 0,04*    | 0,0384 ± 0,05     |
| Carbonil (nmol/mg proteína)            | Córnea     | 0,203 ± 0,06     | 0,088 ± 0,04      | 0,070 ± 0,06      | 0,480 ± 0,20*    | 0,0829 ± 0,03     |
|  | Conjuntiva | 0,353 ± 0,18     | 0,286 ± 0,22      | 0,075 ± 0,06      | 0,308 ± 0,25     | 0,093 ± 0,04      |
| ACO (U/g proteína)                     | Córnea     | 1416,56 ± 194,05 | 1601,167 ± 244,64 | 1335,514 ± 340,62 | 994,418 ± 77,54  | 1017,413 ± 129,94 |
|  | Conjuntiva | 971,08 ± 155,05  | 1038,772 ± 119,07 | 1187,222 ± 211,93 | 949,537 ± 181,96 | 732,519 ± 59,09   |
| Nitritos e nitratos (nmol/mg proteína) | Córnea     | 32,82 ± 11,98    | 7,944 ± 4,81      | 6,55 ± 5,52       | 20,450 ± 22,25*  | 17,852 ± 7,54     |
|  | Conjuntiva | 30,853 ± 15,25   | 10,038 ± 5,71     | 7,106 ± 3,55      | 12,061 ± 5,49    | 9,447 ± 2,51      |

**Tabela 1** - Os dados foram exibidos em média ± desvio padrão. A significância foi determinada utilizando-se ANOVA de uma via com *post hoc* de Tukey onde  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo. \* indica que o grupo apresenta diferença estatisticamente significativa com relação aos demais grupos no mesmo órgão. Os parâmetros SOD e ACO não apresentaram diferença entre os grupos. A Vit. C foi maior no grupo DHA na córnea e no grupo Ác. Lip. na conjuntiva. A carbonilação de proteínas se mostrou mais elevada do grupo Ác. Lip. da córnea, sem diferença significativa na conjuntiva e os níveis de nitritos e nitratos foram maiores no grupo Ác. Lip. da córnea e não houve diferença significativa na conjuntiva.

## Conclusão

O modelo animal de olho seco por supressão hormonal demonstrou uma diminuição na produção lacrimal em ratas na estropausa. A suplementação dietética com ômega-3 restaurou parcialmente a produção lacrimal enquanto o Ácido Lipoico teve efeito restaurador total. Na dosagem em que foi utilizado podemos demonstrar um efeito importante do Ácido Lipoico na restauração do olho seco induzido pela supressão hormonal, sendo sua atuação no estresse oxidativo variável em diferentes tecidos e sistemas biológicos que compreendem a unidade funcional lacrimal.