

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Avaliação do estresse oxidativo em modelo experimental de olho seco
e a resposta ao uso de antioxidantes ômega 3 e ácido lipoico

Dissertação de Mestrado

Alexey Santos de Andrade

Porto Alegre, junho de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Avaliação do estresse oxidativo em modelo experimental de olho seco
e a resposta ao uso de antioxidantes ômega 3 e ácido lipoico

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do centro de biotecnologia da UFRGS como um dos requisitos para a obtenção do grau de mestre em Biologia Celular e Molecular.

Aluno: Alexey Santos de Andrade

Orientadora: Profa. Dra. Mara da Silveira Benfato

À minha esposa, Claudia, pelo amor e à minha filha, Manuela, pela inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, minha orientadora Prof. Dra. Mara Benfato pelo acolhimento deste projeto, pela ajuda e ensinamentos durante todo período. Agradeço, principalmente, pela paciência e compreensão em face das inúmeras dificuldades encontradas, eliminando arestas dentro do laboratório que permitiram a realização deste estudo da melhor maneira possível.

Agradeço aos colegas de laboratório que colaboraram ativamente para conclusão dos ensaios e pela amizade: Artur Schüller, Camila Mahl, Camile Behling, Cléber Verona, Fernanda Hackenhaar, Giordana Sousa, Jordana Putti, Mélanie Natuane e Tássia Medeiros.

Ao colega Tiago Salomon pela amizade, compreensão e colaboração, ajudando nas inúmeras deficiências práticas de laboratório e sempre prestativo nos ensaios, na área de informática ou nos mais variados assuntos.

Agradeço à Zelma Almeida, técnica de laboratório do biotério, pela ajuda com o manuseio dos ratos, compreensão e paciência durante todo o estudo.

Aos professores integrantes da comissão de acompanhamento, Prof. Dr. Jorge Quillfeldt e Prof. Dr. Tarso Kist, pelas colocações ao longo do trabalho.

Aos Prof. Dr. Itabajara Vaz e Prof. Dr. Arthur Fett Neto pelo empréstimo de seus laboratórios para realização de ensaios.

À Profa. Dra. Fernanda Staniscuaski pela grande ajuda nos créditos didáticos, colaborando na estruturação das aulas e permitindo o uso de sua turma

de biologia molecular, pelas colocações na correção do artigo científico, para submissão, e como relatora da dissertação.

À secretaria do curso de biologia marinha do Ceclimar/UFRGS (Imbé) pela colaboração durante o estágio didático.

Agradeço, finalmente, minha esposa Claudia Webster e minha filha Manuela, por todo carinho e amor durante o período, permitindo que eu pudesse estudar, mesmo precisando de minha ajuda, e pela compreensão das horas de ausência nestes dois anos. Nada seria possível sem o carinho de vocês.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO.....	14
Estresse Oxidativo	14
Espécies Reativas.....	14
Sistemas de Eliminação de Espécies Reativas.....	19
Balanço Redox e Estresse Oxidativo	20
Danos Produzidos por Espécies Reativas	21
Ácidos Graxos Poli-Insaturados	22
Características Químicas	22
Funções dos Ácidos Graxos Poli-Insaturados.....	26
Ácido Lipoico.....	30
Hormônios Sexuais.....	33
Menopausa.....	35
Ciclo Estral	37
Indução da Estropausa e Estresse Oxidativo	39
Metabolismo do Óxido Nítrico.....	40
Olho Seco.....	41
Sistema Lacrimal.....	41
Mecanismos Neurais da Secreção Lacrimal	43
Composição do Filme Lacrimal	46

Doença da Superfície Ocular	47
Olho Seco e Estresse Oxidativo.....	50
Ácidos Graxos Poli-Insaturados e Olho Seco	53
Modelo Animal de Olho Seco.....	55
OBJETIVOS.....	58
Objetivo Geral	58
Objetivos Específicos.....	58
CAPÍTULO 1.....	60
Artigo Científico.....	60
DISCUSSÃO.....	103
CONCLUSÃO.....	111
PERSPECTIVAS.....	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
ANEXOS.....	124
CURRICULUM VITAE.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	ácido araquidônico
AAL	ácido alfa-linolênico
ACOt	aconitase total
ADL	ácido dihidrolipoico
AG	ácidos graxos
AGL	ácido gama-linolênico
AGM	ácidos graxos monossaturados
AGPI	ácidos graxos poli-insaturados
AGPI n-3	ácidos graxos poli-insaturados ômega 3
AGPI n-6	ácidos graxos poli-insaturados ômega 6
AL	ácido linolênico
ALP	ácido alfa-lipoico
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
CAT	catalase
COX2	2-cicloxigenase
CS	ceratoconjuntivite seca
CuZnSOD	cobre/zinco superóxido dismutase
DHA	ácido docosaheptaenoico
DNA	ácido desoxinucleico
DNPH	dinitrofenilhidrazina
DPA	ácido docosapentaenoico
EPA	ácido eicosapentaenoico

ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
FSH	hormônio folículo estimulante
GMPc	monofosfato de guanosina cíclico
GPx	glutaciona peroxidase
GSH	glutaciona reduzida
GSHt	glutaciona total
GSSG	glutaciona oxidada
GST	glutaciona s-transferase
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
LH	hormônio luteinizante
LOX5	5-lipoxigenase
MDA	malondialdeído
MnZNSOD	mangans/zinco superóxido dismutase
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NOs	óxido nítrico sintase
PG	prostaglandina
SODt	superóxido dismutase total
SOD-1	superóxido dismutase tipo 1
SS	síndrome de Sjögren
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa

TG triacilgliceróis

RESUMO

O filme lacrimal é o principal mecanismo de proteção da superfície ocular contra agentes externos e a quebra de sua homeostase pode levar à síndrome do olho seco, causando desde desconforto leve a dano severo na superfície ocular com prejuízo irreversível para a visão. A produção de lágrima pela glândula lacrimal está intimamente relacionada a fatores neuroendócrinos, hormonais e imunológicos e o estresse oxidativo pode ter um papel importante na sua regulação. Induzimos, neste estudo, o olho seco em modelo animal por supressão hormonal e realizamos a suplementação dietética com ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (AGPI n-3) e ácido lipoico, objetivando avaliar o estresse oxidativo e a resposta antioxidante na superfície ocular e glândula lacrimal e o papel destas substâncias no tratamento do olho seco. A produção lacrimal, medida através do teste de Schirmer, mostrou recuperação com a suplementação dietética com ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 e ácido lipoico. O estresse oxidativo foi levemente modificado pelo ômega 3, enquanto o ácido lipoico teve um efeito pró-oxidante e antioxidante sítio específico, com influência importante na preservação da integridade da superfície ocular e melhora do olho seco. O dano oxidativo em proteínas foi medido através da quantificação dos níveis de carbonil e a peroxidação lipídica pela formação de MDA, defesas antioxidantes enzimáticas através da atividade da SOD total e GPx, defesas não enzimáticas através dos níveis de vitamina C, glutatona total e medida indireta de óxido nítrico. De acordo com nossos achados, o estresse oxidativo na glândula lacrimal não tem um papel importante no desenvolvimento do olho seco através de espécies reativas de oxigênio, mas o ácido lipoico altera o metabolismo

de espécies reativas de nitrogênio e de vias de sinalização na superfície ocular ocasionando um aumento na atividade da peroxidase lacrimal e melhora da produção de lágrima com recuperação do teste de Schirmer.

ABSTRACT

The tear film is a major mechanism of ocular surface protection against harmful external agents and the breaking of its balance can lead to dry eye syndrome, causing from mild eye discomfort to scarring damage of the ocular surface with irreversible prejudice to vision. The production of tears by the lacrimal gland is closely related to neuroendocrine, hormonal and immunological factors and the oxidative stress can play an important role in its regulation. In this study, the dry eye was induced in an animal model by hormone suppression and the diet supplemented with omega 3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) and alpha-lipoic acid for evaluation of oxidative stress and antioxidant response in the ocular surface and lacrimal gland and the role of these substances in the treatment of dry eye. The lacrimal production, measured by the Schirmer test, showed recuperation when diet was supplemented with omega 3 polyunsaturated fatty acids and alpha-lipoic acid. PUFA omega 3 seems to have little oxidative stress effect while alpha-lipoic acid has site-specific pro-oxidant and antioxidant effect with important influence in ocular surface integrity preservation and dry eye improvement. Oxidative damage in protein was measured by carbonyl levels and lipids peroxidation by MDA production, enzymatic antioxidant defenses by tSOD and GPx activity, non-enzymatic defenses by vitamin C, glutathione and indirect oxide nitric levels. It appears that oxidative stress in the lacrimal gland does not play an important role in the dry eye through reactive oxygen species, but alpha-lipoic acid alters the metabolism of reactive nitrogen species and signaling pathways on the ocular

surface with increased activity of lacrimal peroxidase and improved in Schirmer test and lacrimal production.

INTRODUÇÃO

Estresse Oxidativo

Espécies Reativas

Espécies reativas são moléculas ou elementos químicos altamente reativos com capacidade de interagir com outros elementos, alterando sua estrutura e carga. Geralmente estão centradas no oxigênio, embora também possam existir espécies reativas de nitrogênio (ERN), cloro, bromo e carbono com grande importância biológica, podendo ser classificadas como radicalares e não radicalares (Tabela 1) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). A espécie reativa radicalar, ou radical livre, é qualquer espécie com capacidade de existência independente que contém um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita atômica ou molecular externa, enquanto as espécies reativas não radicalares não apresentam o elétron desemparelhado na sua última órbita atômica. Espécies reativas participam de reações com substâncias químicas inorgânicas ou orgânicas, proteínas, lipídios, carboidratos, moléculas de membranas celulares e ácidos nucleicos. Atuam também como mediadores químicos e sinalizadores celulares com diferentes papéis fisiológicos dentro das células (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Os radicais livres são muito instáveis e reativos, iniciando reações autocatalíticas onde as moléculas com as quais reagem são elas mesmas, convertidas em radicais livres para propagar a cadeia de danos (COTRAN *et al.*, 1998).

Tabela 1: Principais espécies reativas (modificado de HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007):

Radical livre	Não radical
Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) Superóxido, $O_2^{\cdot-}$ Hidroxil, OH^{\cdot} Hidroperóxil, HO_2^{\cdot} Carbonato, $CO_3^{\cdot-}$ Peroxil, RO_2^{\cdot} Dióxido de carbono, $CO_2^{\cdot-}$ Oxigênio singlet, $O_2^1\Sigma_g^+$	Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) Peróxido de hidrogênio, H_2O_2 Ozônio, O_3 Peróxidos orgânicos, ROOH Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) Ácido nitroso, HNO_2 Peroxinitrito, $ONOO^{\cdot a}$ Peroxinitrato $O_2NOO^{\cdot a}$
Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) Óxido nítrico, NO^{\cdot} Dióxido de nitrogênio, NO_2^{\cdot} Nitrato, NO_3^{\cdot}	Espécies Reativas de Cloro (ERC) Ácido hipocloroso, $HOCl^{\cdot a}$ Dióxido de cloro, ClO_2 Gás cloro, Cl_2
Espécies Reativas de Cloro (ERC) Cloro atômico, Cl^{\cdot}	Espécies Reativas de Bromo (ERB) Ácido hipobromoso, $HOBr^{\cdot a}$
Espécies Reativas de Bromo (ERB) Bromo atômico, Br^{\cdot}	Gás bromo, Br_2

^aPertencem também às espécies reativas de oxigênio

Nos organismos vivos e em condições normais, acima de 90% do oxigênio é consumido na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial via redução de quatro elétrons (Figura 1). Entretanto, menos de 5% do oxigênio consumido sofre redução parcial de um elétron, onde a adição de um elétron leva a formação de várias espécies reativas de oxigênio (ERRO) (LUSHCHAK & SEMCHYSHYN, 2012). A molécula diatômica de oxigênio também é considerada um radical livre porque possui dois elétrons desemparelhados em sua órbita externa com spins paralelos, o que dificulta sua reação com outros elementos que também teriam que ter dois elétrons de spins paralelos. Este é o estado mais estável do oxigênio, maneira pelo qual ele está difundido na atmosfera (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

De acordo com a Figura 1, o oxigênio normalmente sofre uma redução de quatro elétrons para H_2O , catalisada pela enzima citocromo oxidase. A presença de oxigênio intracelular, entretanto, também permite a produção inadvertida de

oxigênios intermediários tóxicos parcialmente reduzidos. Os três tipos mais importantes são o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íons hidroxila (OH^{\cdot}). A adição de um elétron ao oxigênio cancela a restrição de lei de Linus Pauling, na qual o nível orbitário de um átomo deve possuir dois elétrons com spins opostos ou antiparalelos, formando uma espécie mais reativa de oxigênio que é o radical livre $O_2^{\cdot-}$ (LUSHCHAK & SEMCHYSHYN, 2012).

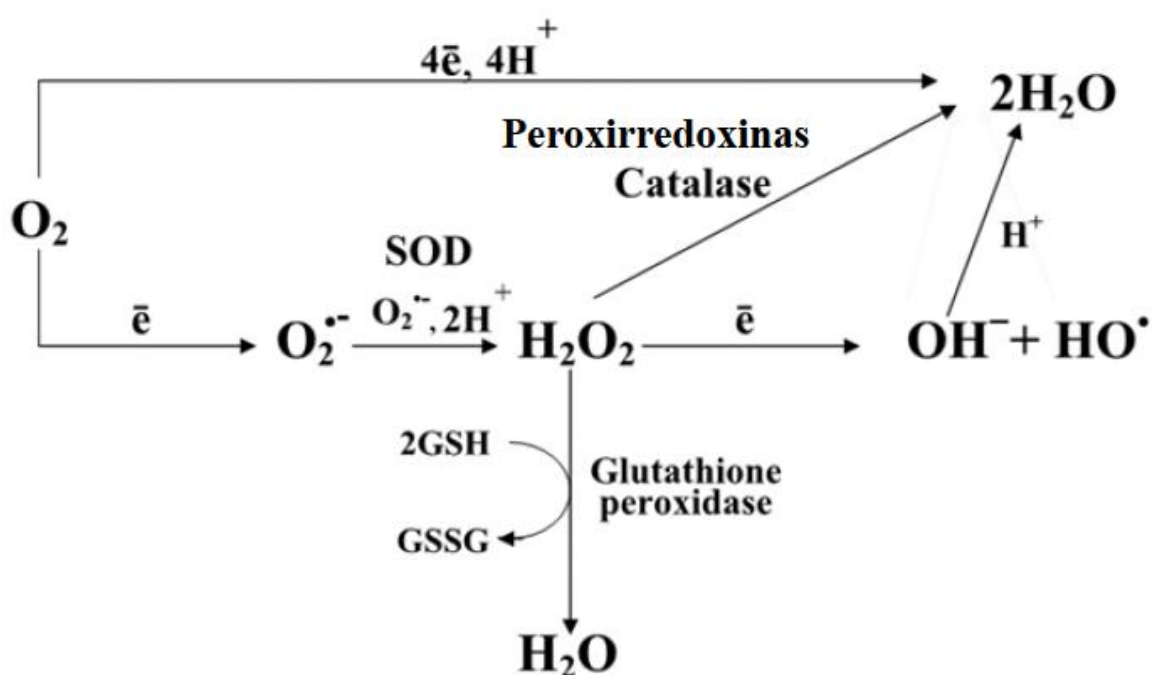
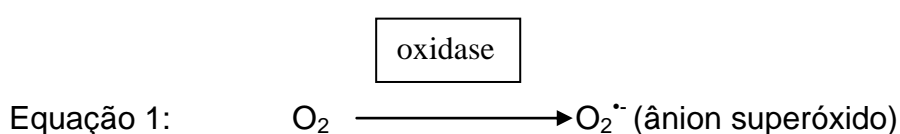
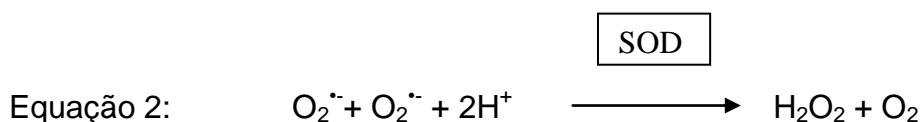


Figura 1. Redução do oxigênio molecular: a adição de um elétron à molécula de oxigênio resulta na formação do radical ânion superóxido. Tendo carga, o superóxido não pode atravessar membranas biológicas, mas sua protonação leva a formação do HO_2^{\cdot} , o qual cruza facilmente estas barreiras. Adição futura de um elétron ao superóxido leva a formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é uma molécula eletricamente neutra facilitando sua passagem por membranas biológicas. A redução de um elétron do peróxido de hidrogênio leva a formação do radical hidroxil (OH^{\cdot}) e ânion hidroxila (OH^-). A atividade química de espécies de oxigênio parcialmente reduzidas diminui na seguinte ordem: $OH^{\cdot} > O_2^{\cdot-} > H_2O_2$. A transformação espontânea de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 é acelerada substancialmente por enzimas chamadas de enzimas antioxidantes primárias. A transformação de $O_2^{\cdot-}$ para H_2O_2 é catalisada pela superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 é dismutado pela catalase e peroxirredoxina em oxigênio molecular e água enquanto a glutathione peroxidase usa a glutathione como cofator para reduzir o peróxido de hidrogênio a água. O OH^{\cdot} não possui sistemas enzimáticos específicos de transformação. (modificado de LUSHCHAK & SEMCHYSHYN, 2012).

As espécies reativas podem ser produzidas pela atividade de uma série de enzimas oxidativas em diferentes locais da célula como o citoplasma, mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos e membrana citoplasmática. O $O_2^{\cdot-}$ é produzido diretamente durante a auto-oxidação nas mitocôndrias, ou enzimaticamente pelas enzimas citoplasmáticas, tais como a xantina-oxidase, citocromo P-450 e outras oxidases (Equação 1) (COTRAN *et al.*, 1998).



Uma vez produzido, o $O_2^{\cdot-}$ pode ser inativado espontaneamente ou, mais rapidamente, pela enzima superóxido dismutase (SOD), formando H_2O_2 conforme a Equação 2:



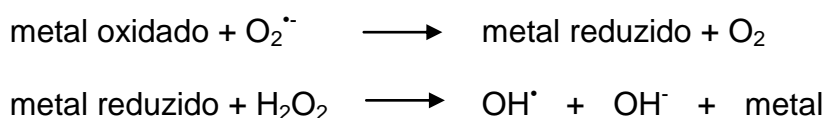
O H_2O_2 , além de produzido pela dismutação de $O_2^{\cdot-}$, pode ser produzido diretamente pelas enzimas oxidases nos peroxissomos, organelas que contêm catalase. Os radicais OH^{\cdot} são produzidos pela redução de um elétron do H_2O_2 e também na interação com metais transicionais (ex., ferro, cobre) na **reação de Fenton** (Equação 3). O OH^{\cdot} é o mais reativo dos intermediários, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima, e assim

influenciar enzimas, membranas ou ácidos nucleicos (LUSHCHAK & SEMCHYSHYN, 2012):

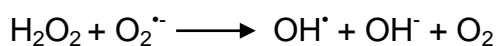


Os íons de metais de transição podem também catalisar a reação entre H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$, conduzindo à produção de OH^{\bullet} , a chamada **Reação de Haber-Weiss** (Equação 4):

Equação 4 (Reação de Haber-Weiss):



oxidado



O ferro é particularmente importante na lesão tóxica por oxigênio. A maior parte do ferro livre está sob a forma férrica (Fe^{+++}) que tem que ser reduzida para ferrosa (Fe^{++}) para ser ativa na reação de Fenton. Esta redução pode ser acentuada pelo $\text{O}_2^{\bullet-}$, e, portanto, as fontes de ferro e $\text{O}_2^{\bullet-}$ são necessárias para o dano oxidativo máximo. Outras espécies reativas de interesse são os oxigênios singlets, que são formas de oxigênio com spin alterado (COTRAN *et al.*, 1998).

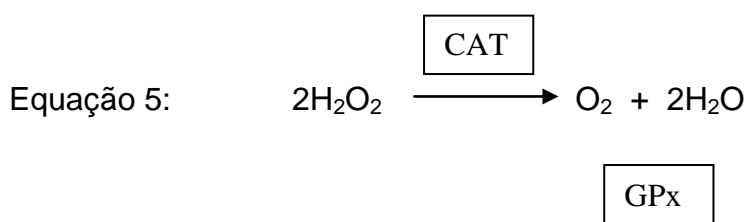
O óxido nítrico (ON), um importante mediador químico, pode agir como um radical livre e pode também ser convertido a um ânion peroxinitrito altamente

reativo (ONOO^-), bem como a NO_2^\cdot e NO_3^\cdot . A Tabela 1 mostra as principais espécies reativas radicalares e não radicalares.

Sistemas de Eliminação de Espécies Reativas

Uma vez que os radicais livres sejam formados eles podem se decompor espontaneamente. O O_2^\cdot , por exemplo, é instável e se decompõe espontaneamente em O_2 e H_2O_2 . Existem, entretanto, vários sistemas antioxidantes que contribuem para o término ou inativação dos radicais livres. Os sistemas antioxidantes podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

O sistema antioxidante enzimático é composto pelas seguintes enzimas: SOD, que catalisa a dismutação do O_2^\cdot a H_2O_2 e O_2 (Equação 2), catalase (CAT), que catalisa a decomposição do H_2O_2 a água e O_2 (Equação 5) e a glutathione peroxidase (GPx) que atua em peróxidos em geral, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como cofator e formando o dissulfeto glutathione oxidada (GSSG) (Equação 6). As principais formas de SOD em humanos são a cobre-zinco (Cu/ZnSOD) localizada no citoplasma, lisossomos, núcleo e espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria, manganês (MnSOD) localizada na mitocôndria e a EC-SOD (uma Cu/ZnSOD extracelular) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).





O sistema antioxidante não enzimático é composto por uma série de substâncias com capacidade de eliminação de elementos nocivos e incluem a glutathione, principal composto antioxidante intracelular, ascorbato (vitamina C), tocoferol (vitamina E), ácido úrico, betacaroteno, proteínas de transporte de metais de transição como a transferrina (transporte de ferro) e ceruloplasmina (transporte de cobre) e oxidação de ferro para ser captado pela transferrina. O sistema antioxidante enzimático e a glutathione estão localizados predominantemente no meio intracelular, enquanto o sistema antioxidante não enzimático encontra-se preferencialmente no meio extracelular (VASCONCELOS *et al.*, 2007). A glutathione é um sequestrador de radicais livres em condições fisiológicas ou sob ação de xenobióticos, podendo ter a participação da enzima glutathione S-transferase (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Balço Redox e Estresse Oxidativo

O parâmetro utilizado para entender a química das espécies reativas é chamado de **Potencial de Redução**, a quantidade termodinâmica que determina a facilidade e a direção das reações de oxidação e redução. Um composto é dito auto-oxidável quando sua forma reduzida pode ser oxidada pelo O₂. A reação de oxidação ocorre quando um elemento ou substância química ganha oxigênio, perde elétrons ou perde hidrogênio e a redução ocorre quando há perda de oxigênio, ganho de elétrons ou de hidrogênio. Os potenciais de redução padrões medidos em

voltagem podem prever se um sistema deve ser reduzido ou oxidado por outro. Um sistema com potencial de redução negativo deve reduzir (isto é, doar elétrons) para outro com potencial positivo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

O balanço redox em sistemas biológicos é determinado pela presença de pares redox responsáveis pelo fluxo de elétrons e mudanças neste balanço podem ocasionar o estresse oxidativo, onde concentrações de pró-oxidantes e antioxidantes estarão em desequilíbrio, com predomínio dos oxidantes e dano subsequente. O estresse oxidativo tem importância em sistemas fisiológicos e está envolvido em vários processos patológicos como envelhecimento celular, apoptose, processos inflamatórios e imunológicos, câncer e doenças degenerativas, entre outros (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Danos Produzidos por Espécies Reativas

Os danos das espécies reativas são amplos e ocorrem sobre todas as macromoléculas com açúcares, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, formando biomarcadores passíveis de mensuração. Em proteínas ocorre a formação de grupos carbonilados pela ação oxidativa no carbono central da cadeia peptídica. Em lipídios ocorre a peroxidação onde os ácidos graxos, preferencialmente os poli-insaturados (com ligações duplas) são vulneráveis aos ataques dos radicais livres derivados do oxigênio, particularmente pelo OH^\bullet . As interações lipídio-radical liberam peróxidos, que são em si espécies reativas, iniciando a subsequente redução de outro ácido graxo. Segue-se uma cadeia de reações autocatalíticas (chamada de propagação), resultando em extenso dano à membrana

citoplasmática e das organelas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). A modificação oxidativa aumenta a degradação de enzimas críticas por proteases neutras citosólicas, aumentando a destruição dentro da célula (COTRAN *et al.*, 1998). Lesões em DNA causam quebras unifilamentares atingindo, principalmente, a base guanina e formando 8-hidroxi guanina, com conseqüente transformação maligna da célula ou apoptose (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Ácidos Graxos Poli-Insaturados

Características Químicas

Os ácidos graxos (AG) são ácidos orgânicos carboxílicos representados pela fórmula RCO_2H , isolados inicialmente de fontes naturais como gordura e por isso são denominados ácidos graxos. O agrupamento R é, geralmente, uma cadeia hidrocarbônica longa com número par de átomos de carbonos variando de 4 a 36, podendo ou não ser saturada com átomos de hidrogênio. O grupo carboxila é a região polar da molécula e o agrupamento R a região não polar, proporcionando a característica anfipática dos AG, conferindo solubilidade em solventes orgânicos e menor solubilidade em água (GRAZIOLA *et al.*, 2002).

A estrutura química do AG apresenta a forma linear estendida nos saturados com hidrogênio, enquanto os AG insaturados possuem dobras fixas na sua cadeia carbônica em virtude das ligações covalentes duplas, causando um dobramento de 30° para cada ligação dupla presente (configuração *cis*). A presença de insaturação, portanto, restringe a rotação da cadeia hidrocarbônica, causando isomeria em torno da ligação dupla, denominada de isomeria com configuração *cis*

ou *trans*. Os óleos vegetais naturais contêm principalmente isômeros *cis*, mas a hidrogenação parcial produz a formação de isômeros *trans* como ocorre na indústria alimentícia, onde são produzidas gorduras hidrogenadas *trans* saturadas a partir de gorduras insaturadas (GRAZIOLA *et al.*, 2002). Os AG são encontrados principalmente esterificados à triacilgliceróis (TG), colesterol e fosfolipídios de membranas celulares (APPOLINARIO *et al.*, 2008).

A classificação dos AG pode ser feita pela presença ou não de saturação, pelo número de átomos de carbono ou pela posição da primeira ligação dupla a partir do radical metil terminal da cadeia de hidrocarbonetos. Os AG ômega 3 (n-3) possuem sua primeira ligação dupla no terceiro carbono a partir do terminal metil e o ômega6 (n-6) no sexto carbono (MARTINS *et al.*, 2011).

Os AG saturados são provenientes, de uma maneira geral, da gordura animal e os insaturados da gordura vegetal. As gorduras saturadas contêm somente ligações covalentes simples entre os átomos de carbonos que estão saturados com átomos de hidrogênio, enquanto as gorduras insaturadas podem ser classificadas como ácidos graxos monoinsaturados (AGM), quando tem uma ligação covalente dupla e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), quando possuem duas ou mais ligações duplas. Os TG com AG essencialmente saturados são sólidos na temperatura ambiente e ocorrem, em geral, em tecidos animais e algumas plantas tropicais como o cacaueteiro, a palmeira e o coqueiro. Os AGM estão presentes em óleos de oliva e de amendoim e os AGPI em óleos de canola, milho, cardamomo, girassol e soja. Os AGPI de cadeia longa estão nos óleos provenientes de peixes incluindo o ômega 3 (GRAZIOLA *et al.*, 2002). Diferentes estudos mostram que os AGPI n-3 e n-6 têm efeitos distintos nas células, sendo o

primeiro associado a efeitos benéficos e o segundo, a efeitos deletérios. Conforme as Figuras 2 e 3, os ácidos linoleico (AL) (C18:2n-6) e alfa-linolênico (AAL) (C18:3n-3) são os precursores dos AGPI n-6 e n-3, respectivamente. São considerados essenciais por não serem sintetizados pelos tecidos de vertebrados, sendo necessária a ingestão pela dieta. (APPOLINARIO *et al.*, 2011).

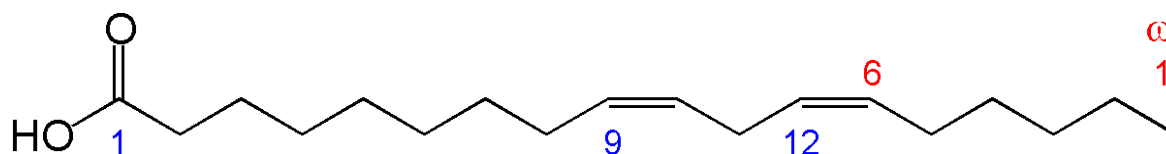


Figura 2: AL - ácido linoleico (C18:2 n-6) precursor dos AGPI n-6

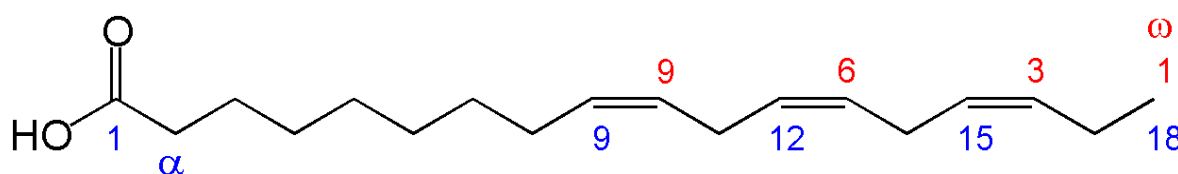
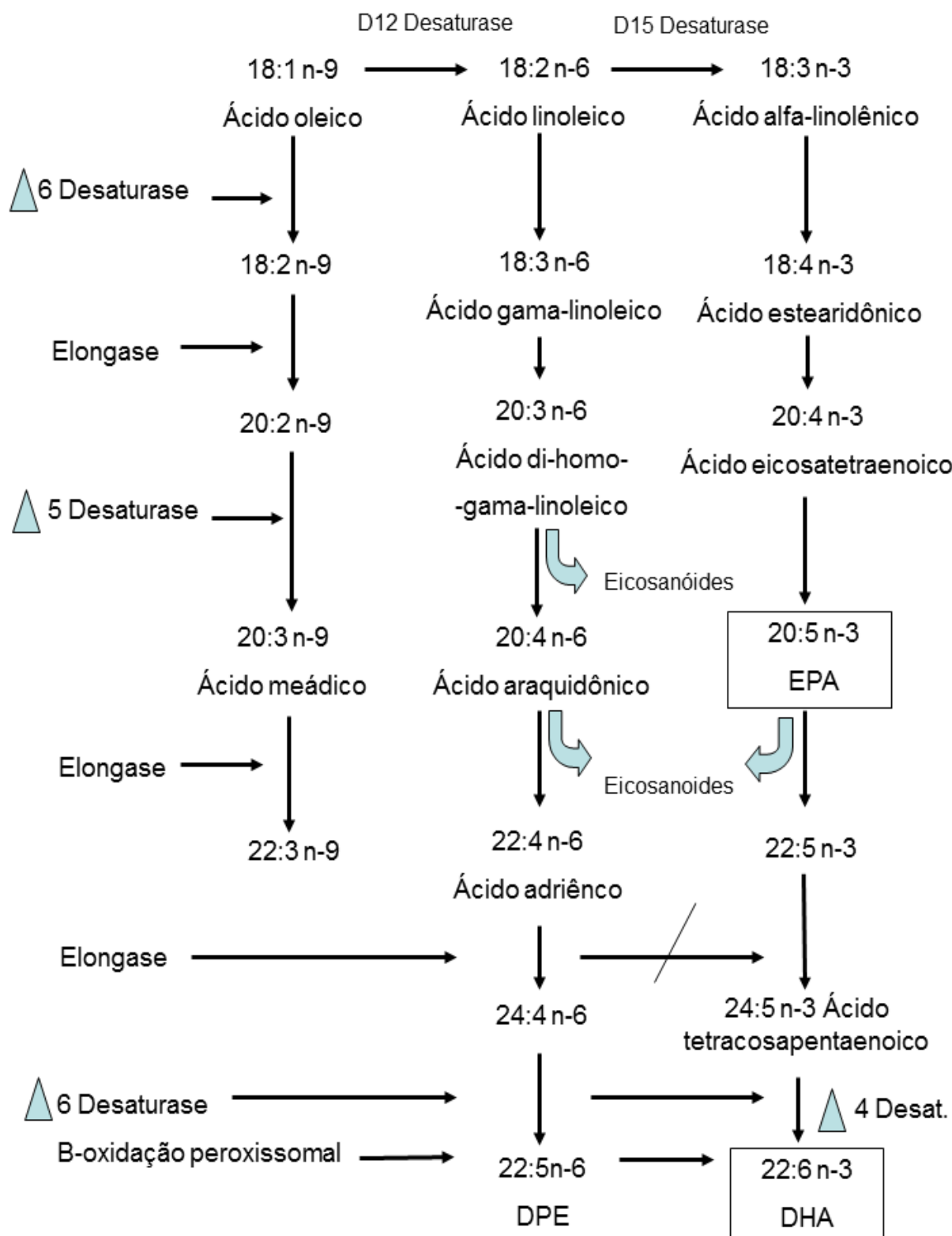


Figura 3: AAL – ácido alfa-linolênico (C18:3 n-3) precursor dos AGPI n-3

O AGPI n-3 é encontrado em peixes marinhos de água fria, principalmente, e em algumas sementes de plantas. O seu precursor, o AAL, dará origem, no ser humano, a dois importantes ácidos graxos de cadeia longa: o ácido docosahexaenóico (DHA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA) (MARTINS *et al.*, 2011). Ambos possuem importante papel no mecanismo regulatório fisiológico, cardiovascular, neurológico e como precursores de mediadores do processo inflamatório. Competem com o AGPI n-6 como constituintes dos fosfolipídios das membranas celulares e na formação destes mediadores químicos (CALDER,

2001). O Esquema 1 mostra as etapas de formação destes AG de cadeia longa e seus precursores pelos vertebrados.



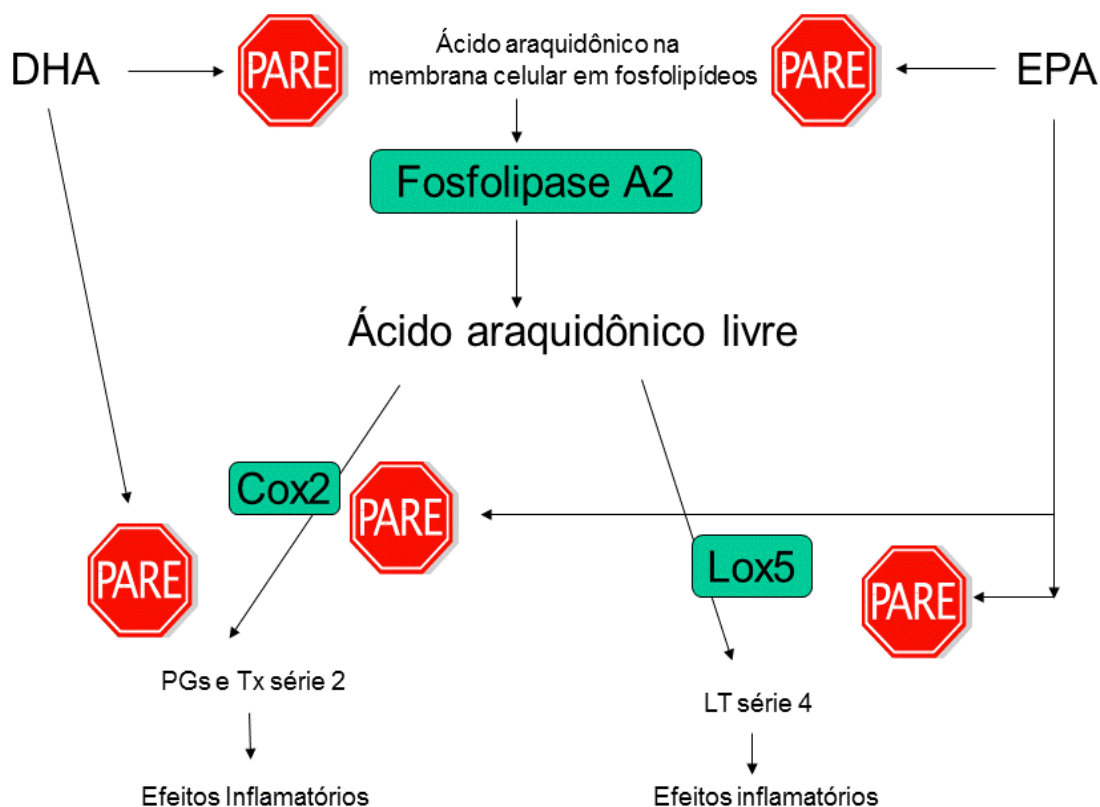
Esquema 1 – Formação do AGPI n-3 e n-6, modificado de Simopoulos, 2008.

Funções dos Ácidos Graxos Poli-Insaturados

A sociedade industrializada é caracterizada pelo aumento da ingestão de gordura animal do tipo ômega 6, típico das dietas ocidentais, com diminuição da relação com o ômega 3, a qual deveria ser de 1:1 e encontra-se em torno de 16:1 (SIMOPOULUS, 2008). O consumo de peixes e óleos vegetais aumenta a disponibilidade de AGPI n-3 e o consumo de carne animal e gorduras vegetais hidrogenadas aumentam a disponibilidade de AGPI n-6 (WATHES *et al.*, 2007). Humanos e outros mamíferos, exceto carnívoros como o leão, podem converter o AL para ácido araquidônico (AA) e AAL para EPA e DHA, num processo lento, havendo competição entre ômega 6 e ômega 3 pelas enzimas de desaturação. Ambas as enzimas delta 4 e delta 6 desaturases preferem AGPI n-3 em vez de AGPI n-6, mas uma ingestão aumentada de AL irá interferir com a desaturação e alongação do AAL, diminuindo a produção dos mediadores derivados ômega 3. Logo, a desaturase delta 6 é uma enzima limitante e que diminui sua atividade com a idade, diminuindo a capacidade de conversão do AAL para DHA e EPA. Células de mamíferos também não podem converter ômega 6 para ômega 3 pela ausência da enzima que os convertem, chamada *ômega 3 desaturase* (SIMOPOULUS, 2008).

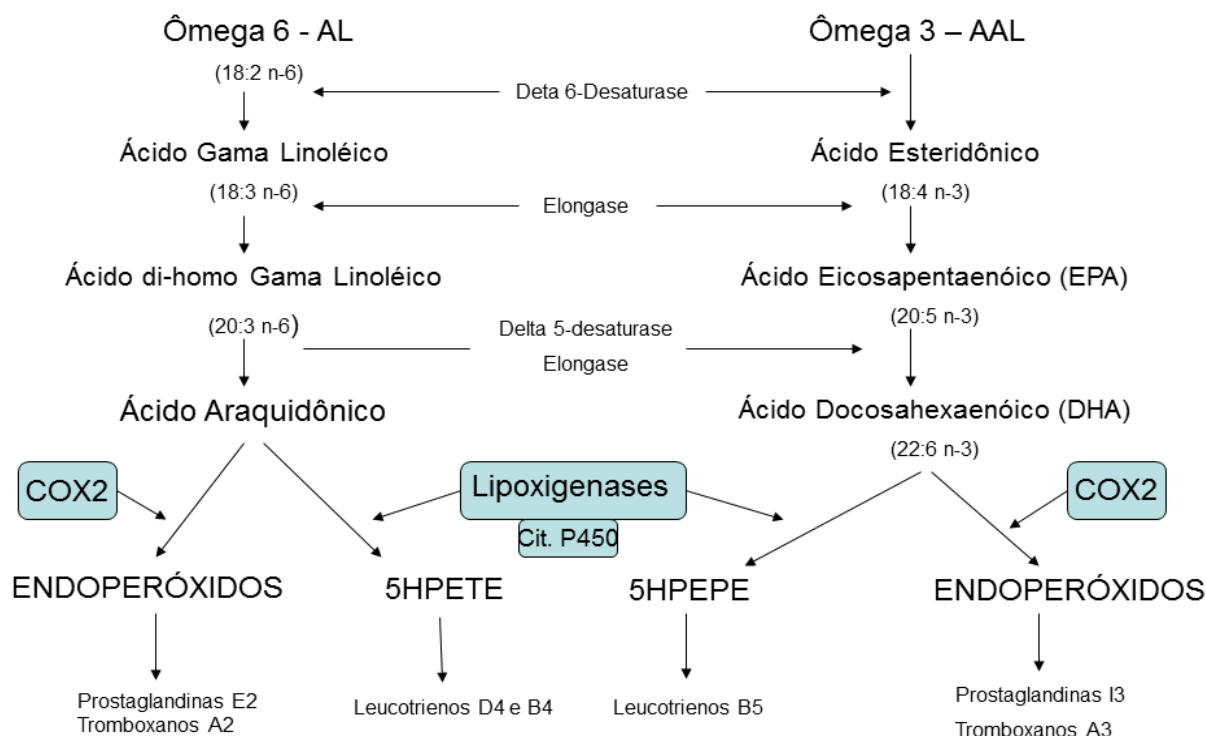
Estas duas classes de AGPI são metabolicamente diferentes e com funções fisiológicas opostas. O AGPI n-3 compete com o AA, derivado do ômega 6, na composição dos fosfolipídios de membranas celulares, uma vez que as proteínas celulares são determinadas geneticamente mas os AGPI das membranas celulares são dependentes somente do aporte dietético. O AA, o DHA e o EPA são os AG

precursores dos eicosanoides envolvidos na resposta inflamatória e também competem na produção dos mesmos (SIMOPOULUS, 2002, CALDER, 2006 & WATHES *et al.*, 2007). Conforme o Esquema 2, um aumento da complementação dietética com ômega 3 irá bloquear a síntese de eicosanoides inflamatórios originários do AA, através das enzimas 2-cicloxigenase (COX2) e 5-lipoxigenase (LOX5), proporcionando aumento da produção de mediadores com função anti-inflamatória (CALDER, 2006, SERHAN & CHIANG, 2008).



Esquema 2: Mecanismo clássico de ação anti-inflamatória dos AGPI n-3, modificado de Calder, 2006.
O EPA e o DHA diminuem a quantidade de ácido araquidônico disponível como substrato para os eicosanóides e também inibe o metabolismo do ácido araquidônico

O EPA e o DHA também agem como substrato para estas enzimas, mas dando origem a eicosanoides com estrutura levemente diferentes daqueles originados do AA e que são de 10 a 100 vezes menos potentes que os originários do AA (CALDER, 2006). Como mostra o Esquema 3, as mesmas enzimas COX2 e LOX5 utilizam o substrato ômega 6 e ômega 3, de acordo com o aporte de cada um, para confecção destes eicosanoides. Na competição do ômega 3 podemos notar que ocorrerá uma diminuição na produção de eicosanoides pró-inflamatórios da série 2 como a prostaglandina PGE2, tromboxano A2 (potente agregador plaquetário) e da série 4, como oleocotrieno B4 (indutor de inflamação, quimiotaxia e aderência de leucócitos) com aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios da série 3, como a PGI3 (inibidor da agregação plaquetária), tromboxano A3 (fraco agregador plaquetário) e da série 5 como o leucotrieno B5 (fraco agente quimiotáxico e indutor da inflamação) (SIMOPOULUS, 2002, CALDER, 2006). Da mesma maneira que o ômega 3, em altas doses, modula o metabolismo das prostaglandinas com atividade antitrombótica e anti-inflamatória, ele diminui os níveis de TG e colesterol. Segundo SIMOPOULUS (2002), o AGPI n-3 em pacientes saudáveis suprime a capacidade de monócitos de sintetizar mediadores inflamatórios IL-1, IL-6 e TNF α em vários estudos, o que pode contribuir para os efeitos benéficos em modelos inflamatórios crônicos.



Esquema 3 – Formação de eicosanóide série 2 e 4 originários do AGPI n-6 e série 3 e 5 originários do AGPI n-3, modificado de Simopoulos, 2008.

5HPETE – ácido 5 hidroperoxieicosatetranoico, 5HPEPE – ácido hidroxi-eicosapentaenóico

SERHAN *et al.* (2008) identificaram novos mediadores lipídicos endógenos (autacóides) com capacidade anti-inflamatória, chamados de lipoxinas, e pró-resolução, chamados de resolvinas, protectinas e neuroprotectinas. A lipoxina é sintetizada a partir do AA, as resolvinas da série E são derivadas do ácido EPA e as resolvinas da série D e as neuroprotectinas e protectinas do ácido DHA (SERHAN & CHIANG, 2008, KOHLI & LEVY 2009). Estes mediadores endógenos novos atuam na resolução do processo inflamatório através da mudança do perfil das células polimorfonucleares que são recrutadas no sítio inflamatório, bem como a mudança na produção de citocinas (SERHAN & CHIANG, 2008). A origem destes

mediadores endógenos a partir dos AGPI n-3 pode ajudar a explicar o mecanismo molecular do efeito anti-inflamatório do ômega 3.

Ácido Lipoico

O ácido α -lipoico (ALP) é um componente endógeno presente em tecidos humanos em pequenas quantidades, ligado a complexos enzimáticos. O ALP (ácido 1,2-dithiolane-3-pentanóico) é um cofator para complexos alfa-cetodehidrogenase e sua forma reduzida, o ácido dihidrolipoico (ADL), é um potente redutor sulfidril com atividade antioxidante (Figura 4). Os efeitos biológicos do ALP incluem o sequestro de ERO como radical peroxil e superóxido, interação e regeneração de outros antioxidantes como a vitamina C e a vitamina E, a regulação redox de proteínas do grupo tiol e influencia na conformação proteica e efeitos na expressão genética e apoptose (DEMIR *et al.*, 2005). A principal fonte vegetal de ALP é o espinafre seguido de brócolis e tomate e em tecidos animais é encontrado principalmente em rins, coração e fígado (MOINI *et al.*, 2002).

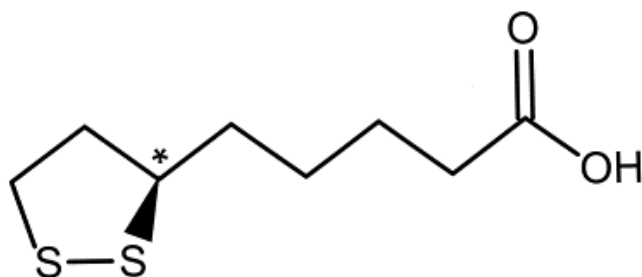


Figura 4: Estrutura química do ácido alfa-lipóico (ALP)

O ALP e sua forma reduzida preenchem todos os critérios para serem consideradas substâncias com uma potente atividade antioxidante (quelação de

metal, caráter anfifílico, bioviabilidade e segurança, interação com outros antioxidantes e regeneração metabólica). A forma predominante que interage com ERO é a reduzida, mas a forma oxidada também pode inativar radicais livres. Metais de transição como o ferro, cobre, mercúrio e cádmium podem induzir dano oxidativo em sistemas biológicos pela catalisação da decomposição de hidroxiperóxidos, gerando OH^{\bullet} altamente tóxico. Metabolicamente, o ALP é reduzido para ADL, que é um forte agente redutor, regenerando antioxidantes oxidados como ascorbato, glutathiona, coenzima Q e vitamina E. Além de poder ser regenerado por várias enzimas, tem características anfifílicas (solubilidade em água e membrana lipídica) podendo reduzir antioxidantes oxidados na interfase entre água e lipídios (PACKER *et al.*, 2001).

O tratamento com ALP aumenta a forma tiol da glutathiona reduzida *in vivo* e *in vitro*. Esta forma participa de muitos processos fisiológicos, incluindo a detoxificação de xenobióticos, modulação da transdução de sinais, metabolismo de prostaglandinas, regulação da resposta imune e atividades enzimáticas. A função do ALP é reduzir a cistina para cisteína, que é utilizada pela célula muito mais rapidamente que a cistina, resultando num aumento da biossíntese da GSH (PACKER *et al.*, 2001).

Em virtude do poder do ALP em suprimir a proteíno-cinase ativada por AMPc no cérebro (esta cinase age como um sensor celular que é ativado na depleção energética), ele sinaliza que os estoques energéticos estão completos e causa uma restrição da ingestão alimentar. Estudos demonstraram que o uso crônico do ALP administrado via oral em dose de 180 mg/Kg peso/dia para ratos causou diminuição da ingestão de comida e redução de peso em comparação ao grupo

controle, sem outros efeitos adversos, efeitos toxicológicos, carcinogênese ou alterações histopatológicas (CREMER *et al.*, 2006). Os mesmos autores confirmaram a segurança aguda e subcrônica do ALP sem apresentar efeitos adversos na dosagem de 31,6 ou 61,9 mg/Kg peso/dia (CREMER *et al.*, 2006).

Com potente atividade antioxidante o ALP diminuiu a peroxidação lipídica e produção de ON e aumentou a atividade das enzimas CuZnSOD, GPx e CAT em cérebro e retina de ratos induzidos ao estresse (AKPINAR *et al.*, 2008). Em razão do potencial da produção de radicais livres pelas enzimas mitocondriais, alguns nutrientes que parecem proteger as mitocôndrias do dano oxidativo são chamados de nutrientes mitocondriais, entre eles o ALP. Doenças neurodegenerativas têm mostrado melhora no declínio cognitivo quando tratadas somente com ALP ou associados com outros antioxidantes e anti-inflamatórios (LUI, 2008). Outros autores também mostraram ação protetora do ALP no dano oxidativo mitocondrial por peroxidação lipídica, principalmente em ratos velhos comparados a ratos jovens (PALANIAPPAN & DAI, 2007).

Apesar dos vários estudos mostrando o potencial da suplementação com ALP em reduzir o estresse oxidativo e restaurar níveis de outros antioxidantes *in vivo*, este efeito protetivo do ALP e ADL tem sido questionado. Evidências de outros trabalhos têm mostrado que o ALP e o ADL podem exercer atividade pró-oxidante. Em vários modelos animais o ALP e o ADL podem aumentar a produção de $O_2^{\cdot-}$ na mitocôndria de hepatócitos de ratos e causar a oxidação intracelular de proteínas, com conseqüente modificação em resíduos proteicos contendo o grupamento tiol. Incubação de adipócitos com ALP (0,25 mM) aumenta os níveis de GSH intracelular e diminui a captação de glicose, o que pode sugerir modificações

no metabolismo da glicose pelo ALP em virtude de alteração no balanço redox. A síntese de ON cerebelar foi restituída em ratos de 9 meses de idade em comparação a animais de 3 meses com a administração de ALP. A verdadeira função fisiológica de ERO e ERN como modulares de eventos celulares, as proteínas alvo do ALP e ADL e o nível intracelular que pode causar efeito pró-oxidante ainda são desconhecidos. O verdadeiro papel da atividade pró-oxidante do ALP e ADL ainda é desconhecido e sua atuação, de maneira benéfica ou nociva, vai depender do sistema biológico e do balanço redox celular (MOINI *et al.*, 2002).

A dose farmacológica ideal para o ALP ainda é desconhecida e é o ponto crítico de seu uso em doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Da mesma forma, o modo pelo qual o ALP e o ADL irão agir, se como antioxidante ou pró-oxidante, vai depender do tipo de estresse oxidativo envolvido e das circunstâncias fisiológicas. AKATAY (2006) tem mostrado que o ALP e ADL possuem importante atividade pró-oxidante em marcadores de oxidação proteica, como carbonilação de músculo cardíaco de ratos, e que o ADL altera o metabolismo de metais de transição aumentando a geração de radicais livres e peroxidação lipídica.

Hormônios Sexuais

Os estrógenos possuem ação biológica em todo o organismo com produção endógena e ocorrência na natureza através dos fitoesteróis que mimetizam muitas de suas ações. Os esteroides de ocorrência natural são o 17- β estradiol (E2),

estrona (E1) e estriol (E3), derivados do colesterol. A fonte natural de produção estrogênica são as células da camada teca e granulosa dos ovários sendo ambas capazes de produzir androgênios e estrogênios. A última etapa de formação do estrogênio ocorre através da aromatização por meio da enzima P450 aromatase mono-oxigenase, sendo a estrona originária da androstenediona e o estradiol da testosterona (Figura 5). A androstenediona produzida pelos ovários é secretada no plasma e convertida em estrogênios na célula da granulosa ou em testosterona no interstício da glândula suprarrenal. A aromatase existe em outros tecidos como músculos, tecido adiposo, tecido nervoso e células de Leydig e sua atividade aumenta com a idade e com o aumento de tecido gorduroso. A estrona é o principal hormônio feminino na menopausa originário da aromatização extragonadal de androgênios. Durante a vida fértil a produção hormonal é regulada pelo eixo hipotálamo-hipofisário. Os estrogênios possuem ação nuclear regulando a atividade transcricional através de receptores específicos na membrana nuclear ou através de efeitos não genômicos em tecidos alvo-específicos como estrogênio livre. Os receptores estrogênicos α (ER α) e β (ER β) estão distribuídos em vários tecidos de maneiras diferentes e a afinidade por estes receptores também é muito variável para cada tecido. Para sua ação não genômica o estrogênio usa receptores de membrana celular e agem, por exemplo, causando dilatação de artérias coronarianas, liberação de insulina por células pancreáticas e sinalização neuronal relacionada a vários fatores de crescimento (GRUBER *et al.*, 2002).

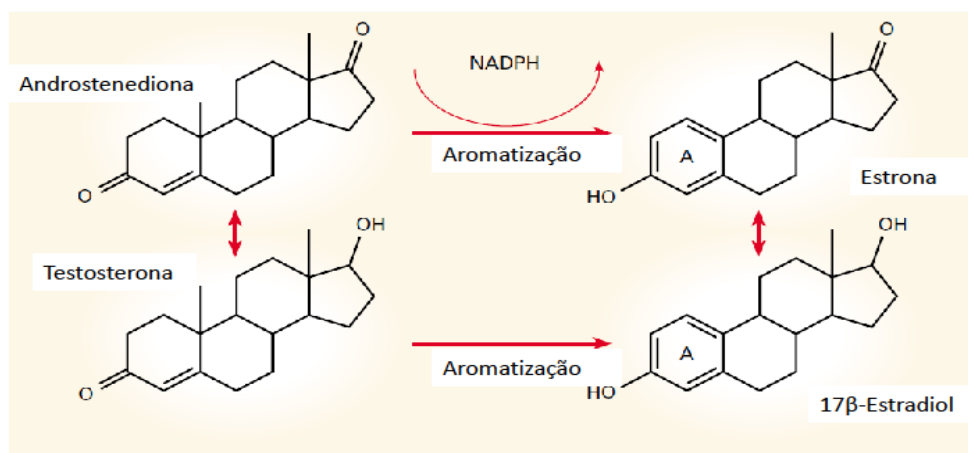


Figura 5: Estrutura e produção de estrógenos endógenos: androstenediona e testosterona são os precursores obrigatórios dos estrógenos e o complexo enzimático da aromatase P450 mono-oxigenase catalisa a conversão. No fígado, o estradiol pode ser convertido em estríol (não mostrado) (Adaptado de GRUBER *et al.*, 2002).

Menopausa

A menopausa é uma alteração natural em mulheres no processo de envelhecimento, caracterizada como cessação permanente do período menstrual que ocorre naturalmente ou induzida por cirurgia, quimioterapia ou radiação. A menopausa inicia com irregularidade dos ciclos menstruais e culmina com o fim da menstruação em consequência da perda de atividade ovariana. Entre os distúrbios da menopausa temos anovulação e infertilidade, distúrbios vasomotores, atrofia dos tecidos genitourinários, diminuição da lubrificação ocular e de mucosas, déficit cognitivo, distúrbios de humor, osteoporose e aumento do risco de doenças cardiovasculares (EDWARDS & LI, 2013).

Pela atrofia dos folículos ovarianos no início da menopausa temos um aumento significativo do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio

luteinizante (LH) nos três primeiros anos com posterior queda gradativa. Os ovários mantêm secreção pós-menopausa de androstenediona e testosterona, mas a androstenediona produzida na pós-menopausa é derivada principalmente da glândula adrenal e uma pequena quantidade dos ovários. A produção de testosterona diminui em 25% após a menopausa embora o ovário pós-menopausa secrete mais testosterona que o ovário pré-menopausa em virtude dos elevados níveis de gonadotrofinas induzirem a produção de testosterona pelo estroma ovariano residual. A diminuição dos níveis de testosterona na menopausa também ocorre pela redução de 60% da sua conversão periférica da androstenediona, principal fonte da mesma (EDWARDS & LI, 2013). Os níveis de estradiol diminuem, mas se mantem em torno de 10 a 20 pg/mL devido a conversão periférica da estrona. A estrona, por sua vez, é derivada da conversão periférica da androstenediona. Os níveis circulantes de estrona na menopausa (30 a 70 pg/mL) geralmente são maiores que os de estradiol. Os níveis de estrogênio podem ser significativos na menopausa em função da conversão extraglandular para estrogênio da androstenediona e testosterona. O grau de produção extraglandular é dependente de vários fatores, principalmente do peso corporal, em virtude da aromatização dos androgênios no tecido adiposo (EDWARDS & LI, 2013).

A perda da atividade funcional ovariana desencadeia inúmeras alterações em mediadores sanguíneos inflamatórios e na homeostase fisiológica. Segundo SITES *et al.* (2002) a menopausa se caracteriza pelo aumento de TNF- α e de proteína C reativa, associada ao aumento do risco cardiovascular em mulheres com aumento de gordura intrabdominal. HENRIQUES *et al.* (2010) demonstrou melhora significativa dos níveis de lipoproteínas sanguíneas em ratas

ovariectomizadas que receberam suplementação com tibolona e com efeito positivo sobre a perda de peso corporal.

Com o envelhecimento também temos uma elevação de 2 a 4 vezes no nível plasmático de mediadores inflamatórios como citocinas e mediadores da fase aguda da inflamação. Os fatores que estão relacionados com estas alterações são a quantidade aumentada de tecido adiposo, diminuição da produção de hormônios sexuais, fumo, infecções subclínicas e aumento do estresse oxidativo com acúmulo de espécies reativas (KRABBE *et al.*, 2004). Desta maneira, existe uma correlação positiva entre a menopausa, envelhecimento e estresse oxidativo que podem contribuir para as alterações fisiopatológicas da menopausa que contribuem para aumento de doenças características desta fase da vida.

Ciclo Estral

O ciclo reprodutivo em ratas é chamado de ciclo estral e dividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro (diestro I) e diestro (diestro II). A ovulação ocorre entre o início do proestro e fim do estro, tendo o ciclo estral duração média de 4 dias e se mantendo estável por 10 a 12 meses. Durante o ciclo a prolactina, FSH e LH permanecem baixos e aumentam no final da tarde do proestro, o estradiol começa a aumentar no diestro I, atingindo o pico durante o proestro e voltando ao valor basal no estro. A secreção de progesterona também aumenta durante o diestro I atingindo um segundo pico no fim do proestro (SMITH *et al.*, 1975). A Figura 6 mostra a grande variação de estradiol e progesterona durante as diversas fases do ciclo estral, modificando-se rapidamente dentro de cada fase durante o

dia. O estudo da fase estral pode ser feito através do esfregaço vaginal onde a caracterização de cada fase do ciclo é baseada na proporção entre três tipos de células: células epiteliais, leucócitos e células queratinizadas (MARCONDES *et al.*, 2002).

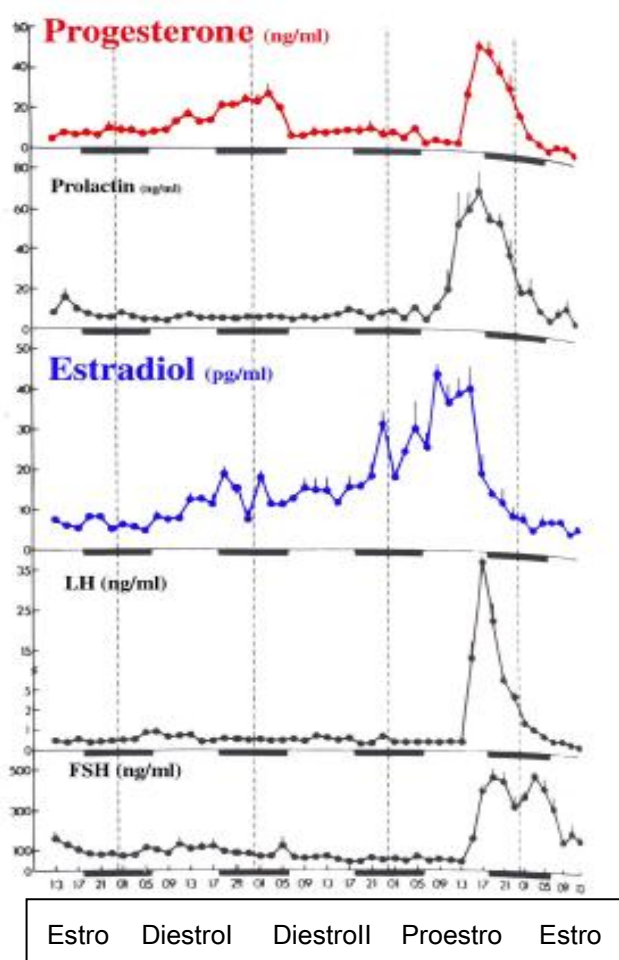


Figura 6: Curva de variação hormonal sanguínea diária de ratas durante o ciclo estral (Adaptado de SMITH *et al.*, 1975).

Indução da Estropausa e Estresse Oxidativo

A menopausa tem sido associada ao aumento do estresse oxidativo e desordens metabólicas. O desequilíbrio redox similar ao observado pelas mulheres durante a menopausa pode ser obtido experimentalmente em ratas com ovariectomia bilateral. A ovariectomia causa atrofia do tecido uterino, aumento de peso corporal e alteração dos níveis de lipoproteínas plasmáticas (BEHR *et al.*, 2012). Segundo HALLIWELL & GUTTERIDGE (2007), os estrógenos possuem importante ação antioxidante na proteção cardiovascular e no metabolismo de lipoproteínas plasmáticas, impedindo a formação de ERO e a peroxidação lipídica, da mesma maneira que modulam enzimas antioxidantes endógenas.

Ratas ovariectomizadas têm aumento dos níveis de lipoperoxidação e peróxidos de hidrogênio e diminuição dos níveis de antioxidantes enzimáticos como SOD, GPx e GST (MUTHUSAMI *et al.*, 2005). De acordo com os estudos de BEHR *et al.* (2012), a perda do aporte hormonal ovariano causa aumento de peso, atrofia uterina, aumento da atividade de peroxidase sanguínea (catalase e GPx), diminuição de defesas antioxidantes não-enzimáticas plasmáticas, diminuição dos níveis de tiol reduzido (SH) em proteínas e aumento da carbonilação. Estas alterações em ratas foram revertidas com a suplementação com vitamina A.

Os hormônios sexuais parecem desempenhar um papel importante como antioxidante endógeno diminuindo os níveis de peróxidos lipídicos no sangue e fígado e regulando a secreção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e TNF- α (KIREEV *et al.* 2010). A administração hormonal conseguiu inibir a indução de citocinas pró-inflamatórias e iNOS e

diminuir o nível de marcadores de estresse oxidativo no fígado com a administração de diferentes hormônios. Nestes mesmos animais verificou-se que o estresse oxidativo e a inflamação hepática induzidos pela idade foram mais marcantes em ratas ovariectomizadas que em ratas com ovários preservados.

Metabolismo do Óxido Nítrico

O ON é formado pela quebra da L-arginina em L-citrulina através de uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (ONs), a qual apresenta três isoformas chamadas de neuronal (ONn), com importante atividade no tecido neuronal e esquelético, endotelial (ONe), com regulação do tônus vascular e induzível (ONi), isolada em macrófagos e com função em diversas células como miócitos cardíacos, músculo liso vascular e células gliais em processos inflamatórios (MICHEL & FERON, 1997; CEJKOVÁ *et al.*, 2007), Vários estudos têm demonstrado que o metabolismo do ON está relacionado ao metabolismo estrogênico, ou seja, quanto maior a concentração estrogênica maior também o metabolismo do ON e maior sua liberação pelas células endoteliais, aumentando sua função vascular (GRUBER *et. al*, 2002; HERNÁNDEZ *et. al*, 2000). Nitrito e nitrato (NO_2 e NO_3) são produtos do metabolismo endógeno do ON e representam uma reserva endógena intracelular de ON com atividade biológica, sendo reciclados no sangue e tecidos para formar ON. Em situações de hipóxia tecidual, quando temos comprometimento da atividade da ONs, o ON pode ser formado pela redução do NO_2 a partir de outras vias envolvendo mioglobina, hemoglobina, xantina oxidoreductase, ascorbato, polifenóis e prótons. O ON reduz

competitivamente as ERO formadas pelas enzimas oxidativas limitando a formação de $O_2^{\cdot-}$ e, conseqüentemente, pela menor reação destas espécies reativas com o ON, aumenta a biodisponibilidade do mesmo. NO_3 pode também agir como sinalizador celular e modificar grupos tiol em proteínas, agindo na modulação da inflamação, inibição da respiração mitocondrial e suas ERO derivadas e comandar a sinalização via GMPc em condições de anóxia (LUNDEBERG *et. al*, 2008). Em condições fisiológicas, pequenas quantidades de ON são produzidas pela ONn ou ONe e seus efeitos biológicos incluem sinalização celular, vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo ocular com redução da pressão intraocular, redução da quimiotaxia de polimorfonucleares com prevenção da agregação plaquetária e supressão da atividade inflamatória. Em condições patológicas inflamatórias, uma grande quantidade de ON é gerada pela ONi, podendo esse ON reagir com ERO para formar $ONOO^{\cdot}$ e outros radicais livres que irão interagir com grupos tiol de várias enzimas, alterando sua atividade biológica, causando dano ao DNA e resultando em apoptose e neurotoxicidade (CHIOI, 2001).

Olho Seco

Sistema Lacrimal

A integridade óptica e o funcionamento normal do olho dependem de uma adequada liberação de fluido que cubra sua superfície, com manutenção que depende de um mecanismo secretor e de um mecanismo excretor. A camada lacrimal tem como função manter a superfície da córnea opticamente uniforme,

nutrida, varrendo os corpos estranhos da córnea mecanicamente ou através de proteínas com capacidade de defesa (MILDER, 1980).

O filme lacrimal é uma mistura fluídica complexa secretada pelas glândulas lacrimal principal e acessórias (glândulas de Krause e Wolfring), glândulas sebáceas palpebrais de Meibomius, células caliciformes da conjuntiva, epitélio superficial da córnea e conjuntiva e vasculatura da conjuntiva (CHONG *et al.*, 2008). A eliminação das secreções lacrimais depende do movimento lacrimal sobre o olho, favorecido pela piscada, e um sistema de drenagem composto pelos pontos lacrimais, os canalículos, o saco lacrimal e o conduto nasolacrimal (MILDER, 1980). Falhas no sistema de produção lacrimal ou de algum de seus componentes e aumento na evaporação são responsáveis pela diminuição do filme lacrimal desencadeando alterações fisiológicas importantes na superfície ocular.

Classicamente o sistema secretor lacrimal tem sido dividido anatômica e funcionalmente em duas partes: (1) a secreção basal (células caliciformes, glândulas lacrimais acessórias e glândulas oleosas) e (2) secreção reflexa (glândula lacrimal principal). A glândula lacrimal principal é uma glândula exócrina localizada superotemporalmente na órbita dividida em dois lobos. Os ácinos secretam os componentes aquosos lacrimais básicos e os dutos secretórios modificam a concentração de água e eletrólitos na lágrima. Células mioepiteliais contráteis envolvem os ácinos lacrimais (CHONG *et al.*, 2008). Receptores para neurotransmissores parassimpáticos como a acetilcolina e peptídeo vasointestinal (VIP) e para hormônios sexuais têm sido encontrados nestas células, mas seu papel preciso na regulação da secreção ainda precisa ser elucidado (ZOUKHRI, 2006). Sabe-se que fibras parassimpáticas controlam a secreção reflexa da

glândula lacrimal principal e as fibras simpáticas controlam a secreção básica palpebral e conjuntival. O papel desempenhado pelo sistema neurogênico deve ocorrer através da regulação do fluxo sanguíneo para a glândula lacrimal, influenciando indiretamente sobre a secreção. A evidência que fundamenta o papel eferente das fibras parassimpáticas se acha nas respostas farmacológicas da glândula lacrimal, já que os parassimpaticomiméticos diretos, como a pilocarpina, causam um aumento do fluxo lacrimal e os inibidores como a atropina e escopolamina reduzem o mesmo (MILDER, 1980).

Mecanismos Neurais da Secreção Lacrimal

A secreção lacrimal é controlada por mecanismos neuro-hormonais que primariamente são sinalizados pela quantidade e composição do filme lacrimal (ZOUKHRY, 2006). Conforme a Figura 7, a secreção inicia pela estimulação de nervos sensoriais na córnea e conjuntiva que levam impulsos ao cérebro e para fibras parassimpáticas e simpáticas aferentes que irão inervar os ácinos da glândula lacrimal. Enzimas de proteção ocular como lisozima, lactoferrina e peroxidase são secretadas pela glândula em resposta ao estímulo neuronal e parece que diminuem com a idade, indicando um declínio neuronal da glândula lacrimal. Os nervos parassimpáticos são o maior estímulo para secreção proteica, eletrólitos e água pelo neurotransmissor acetilcolina (Ach) e pelo peptídeo intestinal vasoativo (VIP). A Ach causa secreção após ligar-se a receptores muscarínicos M3 e ativar a fosfolipase C para aumentar o cálcio intracelular e estimular a atividade da proteína-cinase C. O VIP estimula a secreção via proteína-cinase A. A inervação

simpática libera norepinefrina que se liga ao receptor adrenérgico α_1D e estimula a ONe a produzir ON, o qual ativa a guanilatociclase a produzir GMPc, o qual estimula a secreção. Receptores β -adrenérgicos causam secreção pela produção de AMPc. A estimulação neural para secreção proteica parece não estar relacionada ao sexo, ao passo que a secreção proteica de peroxidase diminui em função do envelhecimento, independentemente da via de sinalização (ROCHA *et al.*, 2008).

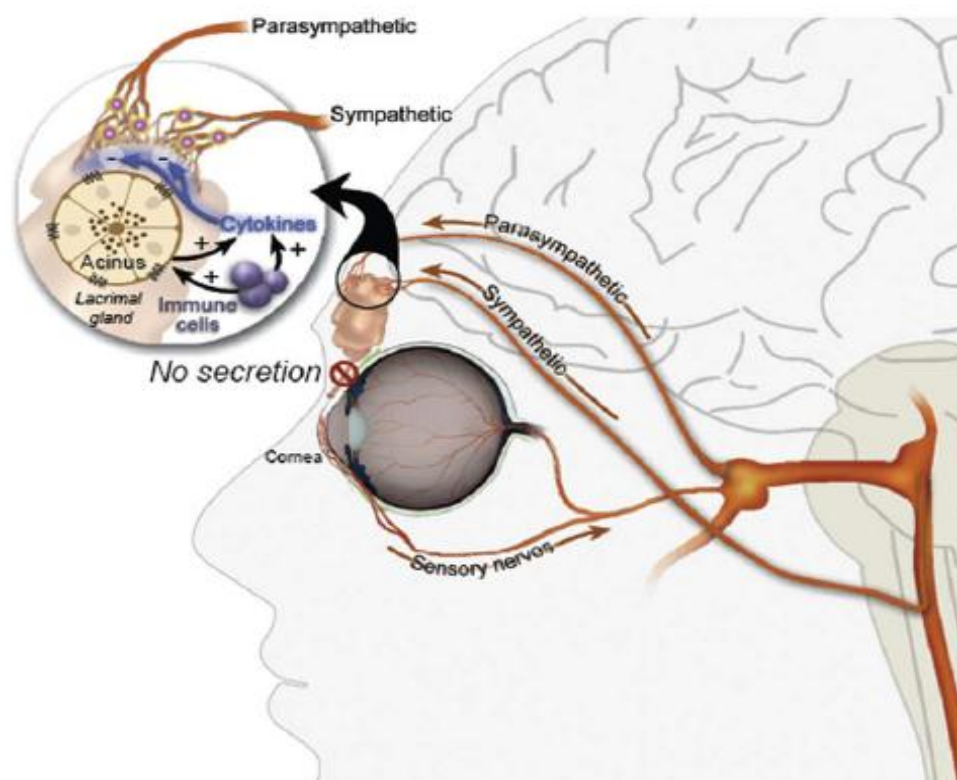


Figura 7: Representação da regulação neural da secreção lacrimal por fibras simpáticas e parassimpáticas e seu bloqueio por citocinas inflamatórias que podem levar a uma inadequada secreção aquosa e olho seco (Adaptado de DARTT, 2009).

O acúmulo de lipofuscina na glândula lacrimal sugere que o estresse oxidativo possa danificar a secreção lacrimal, acompanhados da liberação de mediadores pró-inflamatórios (Figura 8). Em modelo animal de olho seco autoimune, a marca principal é a infiltração linfocitária e produção de citocinas pró-inflamatórias prejudicando a função neural e causando perda funcional simultânea, enquanto no processo de envelhecimento a perda da função ocorre muito antes destas alterações, sugerindo um mecanismo diferente na perda da função secretória lacrimal (ROCHA *et al.*, 2008). De acordo com SARIRI & GHAFORI (2008), a secreção de peroxidase lacrimal pode ser utilizada como um indicador de atrofia da glândula lacrimal que ocorre pelo envelhecimento, sendo sua atividade muito maior na glândula lacrimal de ratos que de humanos.

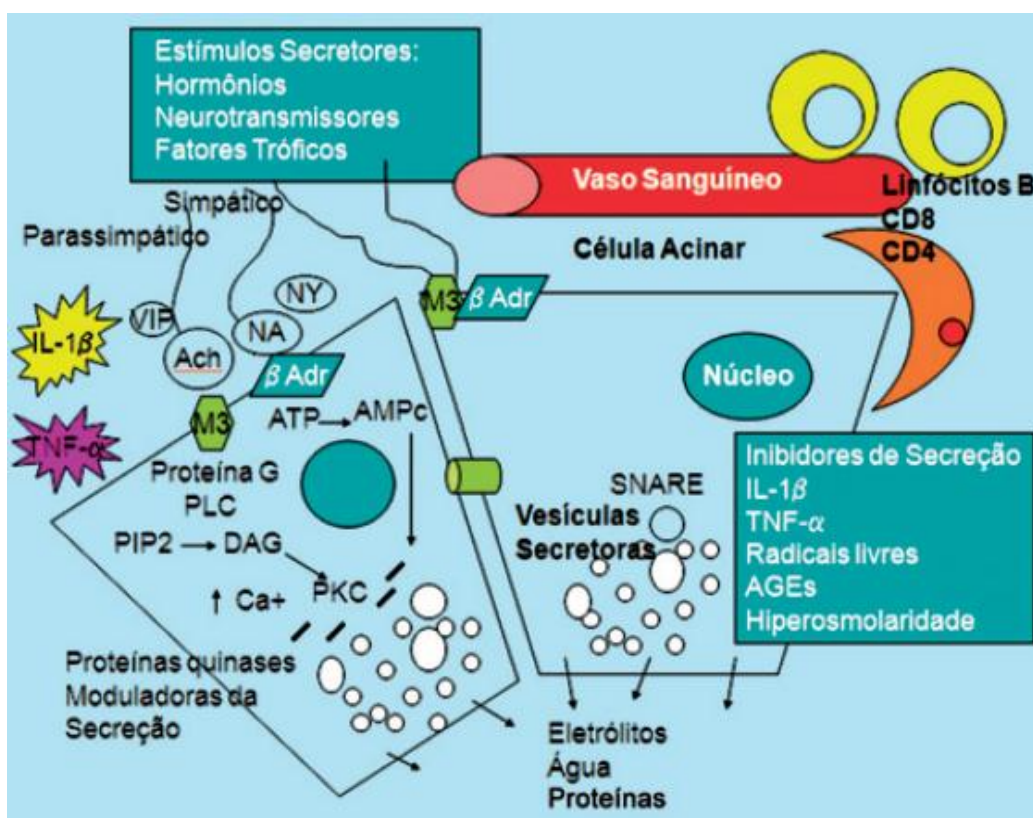


Figura 8: Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na secreção das células acinares da glândula lacrimal onde estímulos secretores estimulam vias de sinalização intracelular e estímulos inibidores diminuem a secreção e levam a inflamação celular e apoptose (Adaptado de FONSECA *et al.*, 2010).

Composição do Filme Lacrimal

A composição do filme lacrimal pode variar entre indivíduos saudáveis, entre raças e sexo e também pela idade. O filme lacrimal é composto de água, eletrólitos, moléculas antimicrobianas, imunoglobulinas, imunomoduladores, fatores de crescimento como o fator de crescimento epitelial (EGF) e do fibroblasto, fibrinogênio, neuropeptídios e mucina. A lágrima possui uma composição eletrolítica única que difere do humor aquoso e do soro. Outros componentes do filme lacrimal incluem ácido ascórbico, ácidos graxos livres e triglicerídeos, albumina, glicose, apolipoproteína D, ceruloplasmina, estrógeno, fosfolipase A2, histamina, interleucina 1 α , interleucina 1 β , interleucina 8, lactoferrina, leucotrienos, enzimas lisossomiais, lisozima, peroxidase, plasminogênio, prolactina, prostaglandina E₂, ácido retinóico, componente secretório (SC), imunoglobulinas A, testosterona e transferrina (CHONG *et al.*, 2008). A lágrima possui fraca atividade da enzima antioxidante SOD-1 (CuZnSOD), de qualquer forma a atividade antioxidante lacrimal está relacionada a antioxidantes não enzimáticos de baixo peso molecular como glutathione, ácido ascórbico, ácido úrico, cisteína, tirosina e grande quantidade de lactoferrina que irá quelar ferro (SHOHAM *et al.*, 2008).

Classicamente, o filme tem sido descrito como uma estrutura de três camadas com a camada lipídica externa (0,1 μm de espessura), camada aquosa média (7 a 10 μm espessura) e camada interna de mucina (0,2 a 1 μm de espessura). Conforme a Figura 9, esta visão da arquitetura trilaminar vem sendo trocada pelo conceito de um gel integrado de mucina e água com uma gradual

concentração de mucina sobre uma camada lipídica dinâmica (CHONG *et al.*, 2008).

O International Dry Eye Workshop (DEWS) incluiu, em 2007, a hiperosmolaridade lacrimal como parte da definição de olho seco e fator importante no diagnóstico e severidade do olho seco (JULIO *et al.*, 2012).

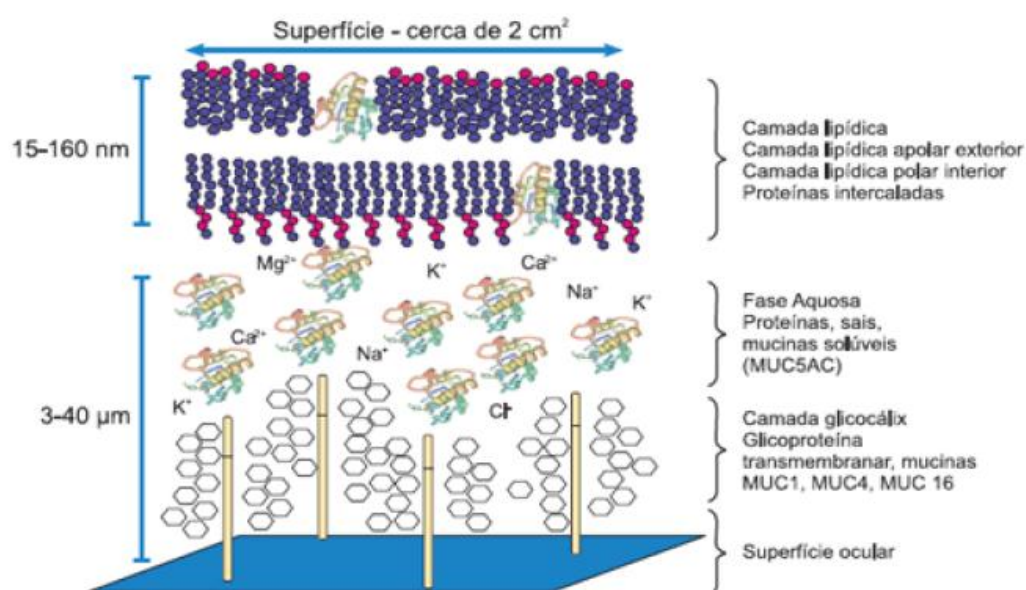


Figura 9: Arquitetura do filme lacrimal e composição de suas diferentes camadas que protegem a superfície ocular (Adaptado de NICHOLS *et al.*, 2011).

Doença da Superfície Ocular

A diminuição da produção lacrimal é a principal causa da síndrome do olho seco ou ceratoconjuntivite seca (CS). É definida como uma doença multifatorial da lágrima e superfície ocular resultando em sintomas de desconforto ocular, distúrbio visual e instabilidade do filme lacrimal com potencial dano a superfície ocular.

Segundo o DEWS (2007), o olho seco vem acompanhado de aumento da osmolaridade do filme lacrimal e inflamação da superfície ocular (BARABINO *et al.*, 2012).

A CS é atualmente reconhecida como uma doença da **unidade funcional lacrimal (UFL)**, sistema integrado que compreende a superfície ocular (filme lacrimal, epitélio corneano e conjuntival e glândulas de Meibomius), glândulas lacrimais e inervação. De acordo com o DEWS (2007), baseado em fatores etiológicos que podem afetar este sistema, a CS tem sido dividida em olho seco por deficiência lacrimal e olho seco evaporativo com produção aquosa normal (BARABINO *et al.*, 2012). A maioria dos pacientes com olho seco evaporativo sofre de disfunção das glândulas de Meibomius com deficiência da camada lipídica lacrimal, problemas anatômicos palpebrais, por fatores ambientais como baixa umidade e aumento do fluxo de ar, uso de medicação tópica e deficiência de vitamina A (PFLUGFELDER, 1996).

Diversos estudos têm atribuído, como causa da CS, desordens inflamatórias de origem imunológicas que podem resultar de doenças autoimunes como a síndrome de Sjögren, doença hospedeiro versus doador (GVHD), sarcoidose ou somente como um processo de envelhecimento (BRIGNOLI *et al.*, 2003; ZOUKHRY, 2006; GUMUS & CAVANAGH, 2009). O olho seco por deficiência na produção lacrimal é classificado em olho seco por **síndrome de Sjögren (SS)** e olho seco por não síndrome de Sjögren (PFLUGFELDER, 1996; BARABINO *et al.*, 2012).

A superfície ocular é considerada uma unidade funcional lacrimal e visual e também faz parte de uma unidade imunológica. A superfície ocular tem habilidade

para responder a estímulos externos e internos e modular esta resposta para evitar consequências negativas nos componentes desta resposta como uma ativação exagerada ou crônica do sistema imune. A ausência de vasos linfáticos e sanguíneos corneanos permite um privilégio imunológico e angiogênico, retardando o aparecimento de células apresentadoras de antígenos ao compartimento linfático e retardando o acesso de células à córnea. Este mecanismo único de controle endógeno modula e suprime o sistema imune-inflamatório regulando a resposta imune (alça aferente) e a chegada de células e moléculas (alça efetora) (BARABINO *et al.*, 2012).

Além do controle neural e imunológico, a secreção lacrimal está sob influência hormonal, principalmente androgênica, com importante papel na distinção do quadro de olho seco entre homens e mulheres (AZZAROLO *et al.*, 1999, SULLIVAN *et al.*, 1984). Sabe-se que os andrógenos regulam a produção lipídica pelas glândulas de Meibomius e os estrógenos, em alguns trabalhos, mostraram diminuição dos sintomas de olho seco, enquanto em outros parecem induzir a expressão de genes inflamatórios (BARABINO *et al.*, 2012). Hipofisectomia com quebra do eixo hipotálamo-hipofisário resulta em atrofia da glândula lacrimal com diminuição na secreção de fluido, proteínas e consequente apoptose celular (AZZAROLO *et al.*, 1995). Receptores para outros hormônios têm sido identificados no tecido lacrimal, incluindo prolactina, estrogênio, progesterona, glicocorticoides, ácido retinoico e insulina. Muitos sinais de transdução orientam a regulação da secreção lacrimal e a regulação neuro-hormonal interage com o sistema imune. Células adicionais na glândula lacrimal incluem linfócitos CD4 e CD8, células dendríticas, macrófagos e mastócitos (CHONG *et al.*, 2008).

MARCOZZI *et al.* (2003) demonstrou melhora dos sintomas de desconforto ocular em mulheres na menopausa com aumento da peroxidase lacrimal, enzima antioxidante e antimicrobiana envolvida na proteção da superfície ocular, quando receberam terapia de reposição hormonal.

Olho Seco e Estresse Oxidativo

O mecanismo de proteção ocular palpebral é muito importante para prevenir danos externos, uma vez que a superfície ocular está sob constante agressão de microorganismos. A exposição ocular ao dano do oxigênio atmosférico e a radiação ultravioleta (UV) têm sido estudadas como causa de dano oxidativo à superfície ocular e envolvidos na fisiopatologia do olho seco (DEMIR *et al.*, 2005; NAKAMURA *et al.*, 2007).

A radiação ultravioleta compreende a radiação eletromagnética com comprimento de onda situado abaixo do limite visível pelo olho humano e pode causar danos aos tecidos expostos. Os tecidos oculares como córnea e conjuntiva absorvem a radiação UV que pode induzir a formação de ERO, causando danos ao DNA celular, lipídeos de membranas e a síntese de proteínas (DEMIR *et al.*, 2005). O estresse oxidativo tem sido envolvido em várias doenças oculares incluindo a degeneração macular relacionada à Idade (DMRI), indução de catarata e pela exposição prolongada à radiação solar (WANG *et al.* 2003; DEMIR *et al.*, 2005; CEJKOVÁ *et al.* 2007).

O ON, expresso sob influência de mediadores inflamatórios, tem importante participação no dano à superfície ocular (CEJKOVÁ *et al.*, 2007). Irradiação UVA e UVB aumenta o dano do ONOO⁻ na superfície corneana e a formação de ONOO⁻ e peroxidação de lipídios na superfície ocular é mais pronunciada em olhos de pacientes com CS por Síndrome de Sjögren do que em pacientes com olhos normais (CEJKOVÁ *et al.*, 2007). O ONOO⁻ e o O₂⁻ podem modificar resíduos de tirosina e inativar proteínas. Células acinares de glândula lacrimal cultivadas com citocinas pró-inflamatórias, como Interleucina-1B, aumentam a produção de ON, e hormônios sexuais, como testosterona, dihidrotestosterona, dihidroepiandrosterona e 17B-estradiol inibem a síntese de ON induzido pela IL-1B, sugerindo que na deficiência desses esteroides - como ocorre na mulher pós-menopausa - danos celulares pelo estresse oxidativo podem ocasionar a diminuição da proteção ocular pela lágrima e conseqüente olho seco (BEAUREGARD & BRANDT, 2004).

A apoptose é reconhecida como a morte celular programada que está sob a influência de hormônios, fatores de crescimento e citocinas que controlam o processo de eliminação celular geneticamente programado (HAANEN & VERMES, 1995). A morte celular ocasionada por danos físicos, químicos ou induzida pelo estresse oxidativo causa a liberação tecidual de conteúdo celular com a ativação de granulócitos para o sítio da inflamação. O acúmulo de neutrófilos e a liberação de enzimas e radicais de oxigênio aumentam a reação inflamatória (HAANEN & VERMES, 1995). De acordo com os relatos de BAUDOUIN & LIANG (2005), a principal citocina envolvida nas doenças de superfície ocular mediando a inflamação e apoptose celular é o TNF- α , uma vez que esta citocina e seus receptores estão superexpressados nas doenças oculares.

Em circunstâncias normais as espécies reativas que são produzidas durante os processos oxidativos celulares são eliminadas pelos sistemas antioxidantes, em perfeito equilíbrio. Doenças crônicas e inflamatórias possuem um mecanismo oxidativo deletério relacionado ao acúmulo de ERO que são produzidas continuamente durante o curso de processos metabólicos. A perda da função da glândula lacrimal que ocorre pelo estresse oxidativo é acelerada pela idade e parece estar relacionada ao aumento da produção de superóxido mitocondrial, aumentando o dano a proteínas, lipídios e DNA na superfície ocular em modelo animal de olho seco (UCHINO *et al.*, 2012).

BATISTA *et al.* (2012) demonstrou que mudanças bioquímicas e estruturais que ocorrem na glândula lacrimal com a idade afetam mecanismos secretores e antioxidantes, os dois mecanismos principais de manutenção da homeostasia e fisiologia da glândula lacrimal. Estas alterações aumentam a exposição ao estresse oxidativo com consequente redução da função secretora da glândula lacrimal e com possível participação no desenvolvimento de olho seco.

Em pacientes com síndrome de Sjögren, o papel do estresse oxidativo é crucial no desenvolvimento de olho seco. Os resultados de WAKAMATSU *et al.* (2013) mostraram uma relação importante na produção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica como causadores de danos em membranas celulares durante o processo inflamatório do olho seco. Segundo os autores, a produção de ERO pode ser uma consequência do processo inflamatório do olho seco, mas também pode ser um desencadeante do processo quando a peroxidação lipídica de membrana perturba a função das células epiteliais da superfície ocular.

Ácidos Graxos Poli-Insaturados e Olho Seco

A administração oral do AGPI n-6 mostrou resultados benéficos em pacientes com SS, aumentando a produção de PGE1, um eicosanoide de conhecida atividade anti-inflamatória, e melhorando os sintomas e sinais de desconforto ocular nestes pacientes (ARAGONA *et al.*, 2005). PINNA *et al.* (2007) verificou melhora dos sinais de inflamação ocular da margem palpebral com a administração de ômega 6 via oral por 180 dias em pacientes com disfunção das glândulas de Meibomius..

Em ensaio clínico, MACSAI (2008) demonstrou a diminuição da proporção plasmática e na membrana de hemácias de ômega 6/ômega 3 em pacientes com suplementação dietética de ômega 3, melhorando o resultado dos testes clínicos para disfunção de filme lacrimal e olho seco. WOJTOWICZ *et al.* (2010), em um estudo piloto prospectivo, randomizado, duplo cego com suplementação via oral com óleo de peixe contendo 450 mg de EPA e 300 mg de DHA para pacientes portadores de olho seco, verificou aumento na produção lacrimal média e no volume lacrimal pelo teste de Schirmer e fluorfotometria, tendo melhora significativa dos sintomas de olho seco. Este estudo, no entanto, não verificou alteração na composição lipídica produzida pelas glândulas de Meibomius entre o grupo controle e o suplementado.

Os AGPI n-3 são capazes de inibir a expressão de genes apoptóticos (p53, Bax e fator indutor de apoptose) e prevenir a inflamação de células pancreáticas induzidas pelo estresse oxidativo ao serem expostas ao peróxido de hidrogênio (PARKS *et al.*, 2009). Estudos de suplementação dietética com altas doses de EPA

+ DHA têm demonstrado a redução de 30 a 55% na produção de ERO ($O_2^{\cdot-}$ ou H_2O_2) por neutrófilos e monócitos (CALDER, 2006).

Modelo animal de olho seco mostrou que a deficiência de AGPI n-3 na dieta não está relacionada com a severidade do olho seco (VIAU *et al.*, 2011), ao passo que suplementação com AGPI n-3 na dieta colabora com a incorporação dos mesmos na glândula lacrimal, alterando sua homeostase lipídica e interfere no curso do olho seco parcialmente, mas sem alterar a produção de prostaglandinas pela glândula lacrimal (VIAU *et al.*, 2009). Neste estudo os resultados foram significativos somente com a associação de ômega 3 e ômega 6 quando comparados com o uso de ômega 3 isoladamente.

A hipóxia subclínica da superfície ocular que ocorre em usuários de lentes de contato e durante o fechamento palpebral no sono induz ao desenvolvimento da inflamação corneana mediada por eicosanoides derivados do ácido araquidônico (BONAZZI *et al.*, 2005). A ativação de células polimorfonucleares, como neutrófilos e macrófagos, induz à fagocitose de partículas, liberação de mediadores lipídicos e proteicos com produção de ERO e ERN. Os neutrófilos contêm a enzima NADPH-oxidase geradora de $O_2^{\cdot-}$, a qual é estimulada diretamente pelo ácido araquidônico. Dietas ricas em ômega 3 e ômega 6 diminuem a produção de ERO em neutrófilos estimulados (POMPÉIA *et al.*, 2000).

Modelo Animal de Olho Seco

Diversos modelos animais de olho seco têm sido desenvolvidos com o intuito de estudar e simular os possíveis mecanismos envolvidos na patogênese da

síndrome do olho seco. Estes modelos tentam refletir a multiplicidade dos mecanismos que causam a diminuição da produção de lágrima e da inflamação da glândula ocular (bloqueio da estimulação neural para secreção lacrimal, defeitos na expressão de mucina e disfunção da glândula de Meibomius) (BARABINO & DANA, 2004).

Cada modelo animal tem características únicas que dificilmente irão mimetizar o quadro complexo da secreção lacrimal e olho seco, mas podem colaborar com a pesquisa de diferentes estímulos envolvidos na secreção lacrimal. Utilizam-se modelos em camundongos, ratos, macacos, coelhos e cães.

Os modelos animais de olho seco podem ser classificados conforme o mecanismo envolvido: insuficiência lacrimal simulando o modelo inflamatório e imunológico da SS; controle mecânico da secreção lacrimal; controle endócrino da secreção lacrimal como a *ovariectomia*; controle neural da secreção lacrimal; modelo evaporativo de olho seco; modelos combinados de insuficiência lacrimal e olho seco evaporativo (BARABINO & DANA, 2004). Modelos relacionados ao uso excessivo de computadores e sistemas de condicionamento de ar que desencadeiam olho seco têm sido propostos por NAKAMURA *et al.* (2010) com resultados bastante promissores.

Aspectos da insuficiência da produção lacrimal relacionados à idade devem ser considerados em modelos animais de olho seco em virtude da perda funcional da glândula lacrimal com a senescência. Entretanto, ainda não são conhecidos mecanismos que induzem as alterações que ocorrem na glândula lacrimal com a idade como alteração estrutural e funcional. Estudos recentes mostram que a

estimulação neural da secreção proteica é atingida precocemente, acompanhada de infiltração celular e acúmulo de lipofuscina, onde o estresse oxidativo parece ter papel crucial na perda da função da glândula lacrimal com a idade (ROCHA *et al.*, 2008). Alterações em vias de sinalização molecular relacionadas à insulina também podem aumentar a transcrição de citocinas inflamatórias envolvidas em doenças crônicas autoimunes da glândula lacrimal e em virtude da idade, podendo colaborar para disfunção lacrimal em pacientes idosos (ROCHA *et al.*, 2003).

Outro aspecto importante em modelo animal é saber qual o animal que tem estrutura lacrimal mais aproximada com a do ser humano. Parece que os coelhos possuem histoarquitetura de glândula lacrimal mais próxima da glândula humana, embora camundongos e ratos sejam animais mais fáceis e economicamente viáveis para estudos em laboratório. De qualquer forma, já se conhece a heterogeneidade do sistema secretor lacrimal de todas as espécies e sabe-se que ratos, camundongos e coelhos mostram uma combinação similar no transporte transcelular de íons e seus mecanismos imunorregulatórios, pontos importantes de futuros estudos (SCHECHTER *et al.*, 2010).

Dificuldades em mimetizar a cronicidade e complexidade do quadro imunoinflamatório do olho seco não permitem que os modelos existentes consigam estudar o intrincado arranjo fisiopatológico desta doença. Estudos futuros precisarão utilizar fatores intrínsecos (imunológico, endócrino e neural) e extrínsecos de olho seco, incluindo animais transgênicos e uso de imunomoduladores que permitam combinar os diversos fatores envolvidos na gênese do olho seco.

Preferimos utilizar em nosso estudo a supressão hormonal pela ovariectomia bilateral para simular a falência hormonal ovariana durante a menopausa em humanos, quando ocorre uma maior prevalência de olho seco. Estudos de BARP *et al.*, (2002) mostraram que uma semana após a ovariectomia bilateral os níveis de estradiol diminuíram significativamente em ratas causando a estropausa. Esta diminuição estrogênica mimetizando a menopausa levará a alterações alvo-específicas desta restrição, sendo ponto importante para nossa avaliação de olho seco relacionado com a menopausa.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o estresse oxidativo na glândula lacrimal e tecidos oculares de ratas Wistar submetidas à ovariectomia como modelo animal proposto de olho seco e a resposta destes tecidos ao tratamento com diferentes substâncias antioxidantes.

Objetivos Específicos

Avaliar o dano oxidativo e a resposta ao estresse oxidativo da glândula lacrimal e tecidos oculares quando os animais forem tratados ou não com DHA, EPA e ácido lipoico.

Analisar a produção de lágrima pela glândula lacrimal principal através do teste de Schirmer modificado nos animais tratados ou não com DHA, EPA e ácido lipoico.

Avaliar os parâmetros de dano oxidativo em lipídios através das análises bioquímicas de MDA e em proteínas através dos grupos carbonil nos animais tratados ou não com DHA, EPA e ácido lipoico.

Avaliar a resposta ao estresse oxidativo pela formação de nitrito e nitrato como medida indireta das reservas intracelulares de óxido nítrico nos animais tratados ou não com DHA, EPA e ácido lipoico.

Analisar a atividade de antioxidantes enzimáticos através das análises bioquímicas da superóxido dismutase total (SODt) e glutaciona peroxidase (GPx) nos animais tratados ou não com DHA, EPA e ácido lipoico.

Analisar a atividade de antioxidantes não enzimáticos através das análises bioquímicas de vitamina C e glutaciona total nos animais tratados ou não com DHA, EPA e ácido lipoico.

Avaliar a atividade mitocondrial através da análise bioquímica da aconitase total (ACOt) nos animais tratados ou não com DHA, EPA e ácido lipoico.

Avaliar através da microscopia eletrônica de varredura a estrutura celular epitelial da córnea nos animais tratados ou não com DHA, EPA e ácido lipoico.

CAPÍTULO 1

Artigo Científico a ser submetido à revista "FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE".

Evaluation of oxidative stress in a rat dry eye model and response to treatment with n-3 PUFA and alpha-lipoic acid

Alexey S. Andrade^{a,b}, Tiago B. Salomon^{a,b}, Camile S. Behling^{a,b}, Camila D. Mahl^{a,b},
Fernanda S. Hackenhaar^{a,b}, Jordana Putti^b, Mara S. Benfato^{a,b}

^aGraduate Program in Molecular and Cellular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^bOxidative Stress Laboratory, Department of Biophysics, Institute of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

All authors contributed equally to this work

Correspondence author: Profa. Dra. Mara Silveira Benfato

Department of Biophysics, Institute of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 9500, Bento Gonçalves av., Building 43422, Room 204. Porto Alegre, RS, Brazil, 91501-970. Phone: 55 51 33087603; Fax: 55 51 3308-7003; E-mail: mara.benfato@ufrgs.br

Abstract

The tear film is a major mechanism of ocular surface protection against harmful external agents and the breaking of its balance can lead to the dry eye syndrome, causing from mild eye discomfort to scarring damage of the ocular surface with irreversible vision impairment. The production of tears by the lacrimal gland is closely related to neuroendocrine, hormonal and immunological factors, and reactive species of oxygen and nitrogen play an important role in its regulation. The objective of this study is to assess the effect of oxidative stress, antioxidant defenses and its response in the lacrimal gland and ocular surface in ovariectomized rats supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) and alpha-lipoic acid (ALP). There was restoration of lacrimal production with improvement in the dry eye Schirmer test in all supplemented groups. N-3 PUFA does not seem to influence oxidative stress, while alpha-lipoic acid has site-specific pro-oxidant and antioxidant effect with important influence in the ocular surface dry eye improvement. As an index of proteins and lipids oxidative damage were measured the levels of carbonyl and malondialdehyde (MDA), respectively. The enzymatic antioxidant defenses were measured by total superoxide dismutase (tSOD) and glutathione peroxidase (GPx) and non-enzymatic defenses by vitamin C, total glutathione and indirect oxide nitric levels. It appears that oxidative stress in the lacrimal gland does not play an important role in dry eye through reactive oxygen species, but alpha-lipoic acid alters the metabolism of reactive nitrogen species and signaling pathways on the ocular surface with increased activity of lacrimal peroxidase and improvement in the Schirmer test and lacrimal production.

Keywords: oxidative stress, dry eye, n-3 PUFA, alpha-lipoic acid, Schirmer test, nitric oxide, antioxidants, lacrimal peroxidase.

Highlights

- Animal model of dry eye and oxidative stress in ocular surface
- Dietetic supplementation with n-3 PUFA and ocular oxidative stress
- Alpha-lipoic acid restores dry eye via oxidative mechanisms

Introduction

The dry eye syndrome or keratoconjunctivitis sicca (KS) is defined as a multifactorial disease of the tears and ocular surface resulting in symptoms such as ocular discomfort, visual disturbance and tear film instability, with potential damage to the ocular surface. According to the Dry Eye Workshop (DEWS), 2007, dry eye is the main cause of decreased tear production and is accompanied by increased osmolarity of the tear film and ocular surface inflammation [1]. Tear secretion is influenced by neural and hormonal control and also suffers with the process of aging, increased oxidative stress and inflammatory disorders of autoimmune origin, such as Sjögren syndrome [2-4]. The involvement of sex hormones and menopause in the pathogenesis of dry eye is quite controversial, although the androgen regulation is well established [5, 6]. The ocular exposure to atmospheric oxygen damage and ultraviolet (UV) light have been investigated as a cause of oxidative stress to the ocular surface and it also appears to be involved in the pathophysiology of dry eye [7, 8]. Under normal circumstances, the reactive species that are produced during the oxidation processes are eliminated by cellular antioxidant systems in equilibrium, while chronic inflammatory diseases have a deleterious oxidative mechanism related to accumulation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) that are produced continuously during the course of metabolic processes. The loss of the lacrimal gland function that seems to be associated with oxidative stress and aging is accelerated by an increased mitochondrial superoxide production and an increased damage to proteins, lipids and DNA on the ocular surface in the dry eye animal model [9].

In patients with Sjögren syndrome, an autoimmune disorder of exocrine glands like the lacrimal and salivary glands, the role of oxidative stress appears to be crucial in the development of dry eye, indicated by a relationship of ROS generation, lipid peroxidation and damage to cell membranes in ocular surface inflammation in dry eye [10]. The nitric oxide (NO) and its byproducts, RNS, are more highly expressed under the influence of inflammatory mediators such as interleukin-1B (IL-1B), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and TNF- α , causing damage to the ocular surface. At the same time the reaction of NO with superoxide anion to form toxic peroxynitrite and lipid peroxidation are more pronounced in corneal surface irradiated with UVA and UVB and in patients with dry eye caused by Sjögren syndrome [11]. Lacrimal gland acinar cells cultured with pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1B, have an increased NO production, and sex hormones repressed this NO synthesis, suggesting that the deficiency of these steroids - such as occurs in menopause - leads to cellular damage by oxidative stress with increased RNS which, in turn, may lead to decreased tear production and consequent dry eye [12]. NO and its metabolic byproducts like nitrite and nitrate, on the other hand, are related with estrogen deficiency and can act as antioxidant defense in some dry eye models, playing an important role in its development. In postmenopausal women who received hormone replacement therapy, it was demonstrated an improvement in the symptoms of ocular discomfort with the increase of lacrimal peroxidase, an antioxidant and antimicrobial enzyme involved in protection of the ocular surface [13]. In rats, hormonal suppression by ovariectomy is the reason of increased blood levels of hydrogen peroxide and lipid peroxidation, with consequent impairment of enzymatic antioxidant defenses such

as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S transferase(GST), showing the relationship of ovariectomy and oxidative stress [14].

The long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) are mainly found in cold watermarine fish. The consumption of fish oil results in the omega 3 by products docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) competing with omega-6 polyunsaturated fatty acids (n-6 PUFA) from animal fat, like arachidonic acid, in the formation of phospholipid of cellular membrane. Omega-3 fatty acids play an important role in the cardiovascular, neurological and physiological regulatory mechanisms, and as precursors of mediators of inflammation are involved in the inflammatory response [15]. Macsai [16] showed a decrease in the plasma and red blood cells membrane omega 6/omega 3 ratio in patients with dietary supplementation of omega-3 and improvement of clinical tests for tear film dysfunction. Animal models of dry eye showed that the deficiency of n-3 PUFA in the diet is not correlated with the severity of dry eye [17], whereas n-3 PUFA supplementation in the diet contributes to their incorporation in the lacrimal gland, altering the lipid homeostasis and partially interfering in the course of dry eye, without altering prostaglandin production by the lacrimal gland [18]. Wojtowicz [19] showed an increase in the average tear production, as measured by the Schirmer test, and improvement of the dry eye symptoms with oral supplementation of fish oil containing EPA and DHA in patients with dry eye.

The alpha-lipoic acid (ALP) is an endogenous component present in small amounts in human tissues bound enzyme complexes with antioxidant and pro-oxidant activity, related with different biological systems and dosage [20]. The biological effects of ALP include sequestration of ROS, interaction and regeneration

of other antioxidants such as vitamin C and vitamin E, redox regulation and conformation of thiol group protein and effects on gene expression and apoptosis [7]. As an antioxidant, ALP decreased lipid peroxidation and nitric oxide production and increased the activity of the enzymes CuZnSOD, GPx and catalase in brain and retina of rats after induced stress [21]. Neurodegenerative disorders have shown improvement in cognitive decline when treated with ALP alone or associated with other antioxidants and anti-inflammatory drugs [22]. Some authors also showed protective action of ALP in mitochondrial oxidative damage by lipid peroxidation, especially in old rats when compared to young rats [23]. The role of ALP in hormonal regulation and nitric oxide metabolism is still unknown and the use for the treatment of lacrimal deficiency is not described.

Several animal models have been proposed for the study of dry eye, but because of the different mechanisms involved in its pathogenesis, as well as the difficulty in reproducing all the mechanisms involved in the aging process, hormonal regulation and redox balance, no ideal model could mimic all these aspects. As a result of the higher prevalence of dry eye in postmenopausal women, this study aims to evaluate the role of dietary supplementation with DHA, EPA and ALP in an animal model of hormonal suppression for induction of dry eye. We evaluate the antioxidant enzymatic and non-enzymatic responses and oxidative damage in lacrimal glands and ocular surface tissues and their participation in the redox balance of these tissues during estropause.

Materials and Methods

Animals

This study employed 50 three-month-old Wistar females rats (*Rattus norvegicus*). The rats were housed in polypropylene cages with five animals per cage and all animal studies followed the rules from the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institute of Health (DHEW Publication No. (NIH) 85-23, revised in 1996, Office of Science and Health Reports, Division of Research Resources/NIH, Bethesda, MD, USA) and were approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. The animal house was kept on a 12 h light/dark cycle and at temperature of 24 ± 1 °C, with standard lab chow and drinking water *ad libitum*.

The rats were divided into five groups of ten animals each. Four groups were subjected to bilateral ovariectomy and one group was operated, but without removal of the ovaries (SHAM group). The surgical procedure was performed under general anesthesia with a combination of xylazine (10 mg/Kg) and ketamine (60 mg/Kg) i.p.. Right after the surgery and still under anesthesia, the rats received a combination of antibiotics (procaine benzilpenicillin G 10.000.000 UI + benzatine benzilpenicillin G 10.000.000 UI + dihidrostreptomycin 10.500 mg) associated with anti-inflammatory (piroxican 1.000 mg) i.m. 0.1 mL/100 g (PPU Pencivet Plus ®, Intervet / Schering-Plough Animal Health). After surgery, the animals were kept in an atmosphere heated by the light source until anesthesia recuperation and received analgesia with acetaminophen (Paracetamol®, MSD) at a dose of 200 mg/Kg, diluted in the drinking water for 3 days. After the period of study of 16 weeks, the animals were anesthetized again for removal of the main lacrimal gland and eye tissues and

withdrawal of blood for hormonal dosage. Tissues were separated and identified as the lacrimal gland, cornea and conjunctiva of the eye. Estral cycle phases in rats were determined by examining the vaginal smear, which was made before surgery in all groups and before euthanasia in the SHAM group, in order to perform the study assays at the same hormonal stage (diestrous) [24].

Diets

Animals were acclimated to a nutritionally balanced diet comprising 22% proteins, 5% cellulose, 4% fatty acid, 1.4 % calcium, 0.8 % phosphorus and 60% starch with added vitamins, minerals and antioxidants (Nuvilab®, Brazil), according to AIN93 [25], for 1week prior to ovariectomy. All diets had a total of 4% fat and at least 2% grains oil, amount slightly above the minimum required to prevent a deficiency of long chain omega-6 polyunsaturated fatty acid (1%). One week after surgery, animals were randomly assigned to five groups: one control group sham-operated (SHAM) and one ovariectomized group (OVX) received standard diet; operated animals that received supplementation were divided in 3 groups according to the diet supplemented (DHA, EPA and ALP). The DHA group received dietary supplementation with predominance of docosahexaenoic acid ethyl ester¹ (1g/Kg body weight/day DHA + 0.2 g/Kg body weight/day EPA), EPA group with predominance of eicosapentaenoic acid ethyl ester² (1g/Kg body weight/day EPA + 0.2 g/Kg body weight/day DHA) and ALP group with supplementation of alpha-lipoic acid (180 mg/Kg/day). All five groups received the diets for a period of 16 weeks.

The diets were formulated with fish oil and alpha-lipoic acid blended into the experimental diet on a daily basis in order to prevent fatty acid oxidation and loss of

antioxidants before their use. The SHAM group was fed *ad libitum*. The food intake of ovariectomized groups was limited to that of the SHAM group in order to reduce ovariectomy-induced weight gain. All animals had *ad libitum* access to water throughout the study period. Body weights of all animals were measured weekly and food intake was recorded daily.

Organs and tissues

Animals were sacrificed according to the experimental protocol [26]. All animals were anesthetized by i.p. injection with a mixture of ketamine (60 mg/Kg) and xylazine (10 mg/Kg). After saline infusion, the organs and tissues were removed, and frozen in liquid nitrogen immediately for further analyses. Organ processing started with manual maceration. The samples were sonicated three times for 10 seconds in 30mmol/L phosphate buffer, 120mmol/L KCl, 100 μ mol/L PMSF at pH 7.4 and centrifuged for 10 min at 1700 x *g*. The supernatant was transferred to a fresh tube and centrifuged for 10 min at 1700 x *g*. The supernatant from the second centrifugation was aliquoted and frozen at -80 °C for later analysis and assays.

For the scanning electron microscopy, one eye of one animal randomly selected from each group was enucleated. The specimen were washed with PBS 0.9 % and immediately placed in 4% glutaraldehyde buffered with 0.1 mol/L phosphate buffer at pH 7.4 and fixed overnight. The eyes were post fixed 1 hour in 1% osmium tetroxide, dehydrated in acetone gradients, critical point dried with liquid carbon dioxide, and then mounted in aluminum stubs and coated with gold in an ion coater.

Blood collection

Before saline perfusion, blood was quickly collected by puncturing the left ventricle of the heart. Fresh blood was centrifuged for 4 min at 320 x *g*, and the serum was separated for subsequent radioimmunoassay.

Schirmer test for dry eye

We used a modified Schirmer test to measure tear fluid secretion under general anesthesia induced with ketamine (60 mg/Kg) and xylazine (10 mg/Kg). After induction of anesthesia, a filter paper of 2 mm width by 30 mm length was placed on the temporal side of the lower eyelid margin for 1 minute. We measured the length of the moistened paper from the edge [27].

Hormonal level measurements

Levels of 17 β -estradiol and progesterone in serum were estimated by solid phase radioimmunoassay using the Estrogen and Progesterone Coat-a-Count DPC kits (Diagnostic Products Corporation/USA).

Enzymatic antioxidants

The total superoxide dismutase (tSOD) activity was measured using the RanSOD® kit (Randox, UK), with absorbance measured at 505 nm. The assay principle is based on the reaction of xanthine-xanthine oxidase, to form superoxide radical, which reacts with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (I.N.T.) to form a red formazan dye. tSOD activity was expressed as U/mg of protein and 1 U was defined as the capacity of the enzyme to inhibit 50% of I.N.T.

oxidation. Enzymatic kinetics of GPx was assessed by the Ransel® Kit (Randox, UK). In this kit, glutathione peroxidase catalyzes the oxidation of glutathione (GSH) by cumene hydroperoxid. In the presence of glutathione reductase (GR) and NADPH, the oxidized glutathione (GSSG) is immediately converted to the reduced form with oxidation of NADPH to NADP⁺. Measuring the absorbance at 340 nm, 1 U of GPx was defined as the capacity of the enzyme to oxidize 1 μmol NADPH/min. The activity was expressed as U/mg of protein.

Non enzymatic antioxidants

The assay to measure total glutathione (tGSH) was performed by measuring the formation of p-nitrophenol from 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid - DNTB) in the presence of the enzyme GR and NADPH [28]. Briefly, we used 20 μL of potassium phosphate 0.1 mol/L to calibration curve and 20 μL of tissue extract sample. Added 120 μL of DNTB plus GR and after 30 seconds added 60 μL of NADPH. Color development was read at 412 nm and the level was expressed as μmol of glutathione/mg of protein.

As an index of indirect nitric oxide levels, a variation of the Griess test was used to determine total nitrate and nitrite levels [29]. Briefly, we used 50 μL of sample and 50 μL for standard curve added with 50 μL of Griess reagent. Color development was read at 543 nm and the level was standardized by sodium nitrite and expressed as nmol of NO₂/mg of proteins.

Oxidative Damage

As an index of protein damage, carbonyl levels were marked with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and measured at 370 nm [30]. Briefly, tissue extract aliquots (25 μ L) were added with either 2 mol/L HCl (blank) or 10 mmol/L 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2 mol/L HCl (test) and incubated at 37 °C for 90 min. Samples were centrifuged (14000 x *g*, 5 min) and 75 μ L of 28% trichloroacetic acid (TCA) was added. Samples were centrifuged again (14000 x *g*, 5 min), and the excess DNPH was removed with ethanol-ethyl acetate 1:1 (v/v). The samples were centrifuged again (14000 x *g*, 5 min), and the resulting pellet of protein was then dissolved by the addition of 200 μ L of 6mol/L guanidine hydrochloride (prepared in PBS, pH 6.5). The carbonyl content was calculated from the maximum absorbance, at 370 nm, using a millimolar extinction coefficient of hydrazone of 21.000 M⁻¹cm⁻¹. Carbonyl levels were expressed as nmol of carbonyl/mg of protein.

Mitochondrial activity

Indirect total aconitase (tACO) activity was measured at 25 °C using 25 μ L of the tissue sample and measuring the absorbance at 340 nm over time, as citrate was converted to alpha-ketoglutarate by 2 units/mL of isocitrate dehydrogenase using NADP⁺ [31]. tACO activity was expressed as U/g of protein and 1 U was defined as the amount catalyzing the formation of 1 nmol of isocitrate per minute.

HPLC analysis

Levels of vitamin C, a non-enzymatic antioxidant, and malondialdehyde (MDA), an index of lipid peroxidation, were measured by HPLC employing a reverse-phase column (SUPELCOSIL™LC-18-DBHPLC Column; 15 cm×4.6 mm, 5 μ m), using a

mobile phase flow rate of 1 mL/min in 30 mmol/L monobasic potassium phosphate (pH 3.6) and methanol (9:1, v/v). Samples were injected in a volume of 25 μ L. The absorbance of the column effluent was monitored at 250 nm during 10 minutes. Under these conditions, the retention time of vitamin C was 3.0 min and MDA was 5.6 min. The vitamin C and MDA levels were expressed as mg/g of protein [32].

Data normalization

All results were normalized to protein concentration using BSA (bovine serum albumin) as a standard in the Bradford assay [33]. All assays of this study were independently performed in triplicate.

Scanning electron microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy was performed in scanning electron microscopy JEOL (JSM 6060) at an accelerated voltage of 10 kV and increase the range of 1000-8000 x.

Statistical analysis

Data was expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis of different variables was performed with one-way ANOVA and multiple comparisons for the variables that showed significant differences were performed using the post hoc of Tukey. Analysis of the Schirmer test for dry eye and weight of the animals was performed with factorial ANOVA of repeated measures. Differences were considered significant when $p \leq 0.05$. Statistical analysis was performed with the support of the Statistical Nucleus of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (NAE-

UFRGS). A software package was used for all calculations (SPSS version 19.0.0, SPSS, Chicago, IL, USA),

Results

Animal initial and final body weights during this study are shown in Table 1. SHAM group had a weight gain of 52 g, while the ovariectomized animals in DHA and EPA groups had a significant higher weight gain when compared to the SHAM group. At the end of the study, the weight gain was significant in each group in comparison with the initial weight of the same group. On account of the control done on the food intake of OVX group, this group had no difference with SHAM group. The average food intake of animals was 17.4 g of feed per day, with DHA (20.5 g) and EPA (19.7 g) groups showing a significant difference with SHAM (15.9 g), ALP (16.0 g) and OVX (16.6 g) groups.

Estrogen hormone levels decreased in the OVX group when compared to the SHAM group, demonstrating the induction of surgical estropause. Progesterone decreased in EPA and ALP groups, but not in DHA and OVX groups. The supplementation with n-3 PUFA and alpha-lipoic acid did not recover the estrogen and progesterone levels (Fig.1).

The Schirmer test showed a decrease of lacrimal production in the OVX group with significant induction of dry eye at the end of the study, in contrast with the initial test, while the supplementation with n-3 PUFA and alpha-lipoic acid regained lacrimal production in ovariectomized animals. Comparison of the final Schirmer test values among OVX vs SHAM groups showed total recovery of dry eye just in the ALP group (Fig.2).

There were no statistically significant changes in the levels of tSOD and tACO in the cornea, conjunctiva and lacrimal gland (Table 2). GPx activity of the lacrimal gland in the ALP group increased significantly compared to all other groups (Fig. 3).

Levels of non-enzymatic antioxidant total glutathione (GSH + GSSG) and vitamin C in the lacrimal gland showed no statistically significant differences between the groups (Table 2). In the conjunctiva, the DHA group showed a higher level of vitamin C than OVX group and, in the cornea, there was a higher level of vitamin C in the ALP group when compared to all the other groups (Fig. 4). Ovariectomy and supplementation with PUFA did not affect the corneal level of vitamin C. Fig. 5 shows that nitrite and nitrate levels decreased in the cornea, conjunctiva and lacrimal gland of OVX group when compared to the SHAM group. Nitrite and nitrate levels in the conjunctiva of supplemented animals were not recovered, whereas in the cornea there was a significant recovery just in the group that received alpha-lipoic acid. In the lacrimal gland, all supplemented groups with n-3 PUFA and alpha-lipoic acid recovered the nitrite/nitrate levels.

Fig. 6 shows that the conjunctival protein damage, measured by the levels of carbonyl, had a significant decrease in the EPA group when compared to the SHAM group and there was a difference between the types of supplementation, where the carbonyl production in the ALP group was significantly higher than in the EPA group. Corneal production of carbonyl in supplemented animals increased only in the ALP group, with no difference of other ovariectomized animals compared to the SHAM group. There was no significant difference between the groups in the lacrimal gland carbonyl production (Table 3).

MDA levels (lipid peroxidation indicative of oxidative damage) in the lacrimal gland were higher in the EPA group than in the SHAM, ALP and OVX groups. MDA levels did not change in the n-3 PUFA supplemented animals, but animals fed on the diet supplemented with alpha-lipoic acid had a lower lipid peroxidation than in the DHA and EPA groups (Fig. 7).

Scanning electron microscopy (Fig. 8) of cornea epithelial cells showed a regular polygonal mosaic on the apical surface of the cornea and microvilli regularity in supplemented groups with PUFA and alpha-lipoic acid. In OVX group, cornea showed microvilli loss, cellular junction irregularity and cellular desquamation. In the SHAM group there was a small degree of desquamation and cell irregularity.

Discussion

The surgical induction of estropause has been described as a valid model of dry eye, and although it cannot accurately reproduce the numerous physiological changes that occur with estrogen deprivation in aging, it seems that the neuro-hormonal regulation of tear production and balance redox plays an important role in the mechanisms involved in dry eye syndrome [3]. Estrogen acts on specific receptors located in the vascular endothelium by increasing the production of NO, prostacyclins and the SOD gene expression and, as an antioxidant, act as a free radical scavenger through its phenolic structure [34, 35]. Increased oxidative stress causing damage to tissues of the ocular surface and lacrimal gland appear to contribute to induce dry eye and different dietary supplementation response still need to be clarified with respect to its true role.

In the present study of dietary supplementation with n-3 PUFA and alpha-lipoic acid, the animals of DHA and EPA groups had a higher food intake and consequent greater increase in weight when compared to the SHAM group, while the appetite suppressant effect of alpha-lipoic acid [36] was not observed in the dosage used (Table 1). The reduction in estrogen blood levels confirmed the surgical induction of estropause, although the peripheral aromatization of androgens holds a small production of estrogen. Progesterone levels may be maintained by the adrenal production of this hormone and a large variation of hormone peaks within a single period of the estrous cycle also can explain the observed values (Fig. 1) [24].

The Schirmer test showed decreased tear production in ovariectomized groups with recovery in groups supplemented by DHA, EPA and lipoic acid, confirming an inductive effect on the lacrimal gland by the supplemented substances. According to the findings of Viau *et al.* [18], rats diet supplementation with n-3 PUFA in association with n-6 PUFA helped to prevent partially the course of dry eye and altered significantly the lipid profile of the lacrimal gland. Topical alpha-linolenic acid, the n-3 PUFA precursor, also decreased the signs of ocular inflammation and markers of inflammation like IL-1 and TNF- α seem to have an important role in its pathogenesis [37]. Aragona *et al.* [38] demonstrated that administration of n-6 PUFA orally improves the signs and symptoms of ocular discomfort and increases prostaglandin E1 tear levels in patients with Sjögren syndrome. Alpha-lipoic acid, according to Demir *et al.* [7], has a protective effect on the cornea and conjunctiva of rabbits exposed to UV, protecting these tissues from oxidative stress with increased SOD and GPx and decreased MDA levels. ALP administered via i.p. (100 mg/Kg/day) increased enzymatic antioxidant defenses through Cu/ZnSOD, GPx

and catalase and decreased lipid peroxidation and levels of nitrite/nitrate in the brain of rats exposed to stress [21].

This study attempted to verify the oxidative damage and antioxidant responses in different compounds of the lacrimal functional unit, such as the cornea and the conjunctive of ocular surface and the lacrimal gland, searching for possible differences in the pathophysiology of the dry eye.

The non-enzymatic antioxidant glutathione and vitamin C levels were not influenced by estropause, both in the lacrimal gland and the ocular surface (Table 2). In the lacrimal gland, there was no non-enzymatic antioxidant response in the supplemented animals, but DHA supplementation increased the vitamin C levels in the conjunctiva and alpha-lipoic acid supplementation increased levels of vitamin C in the cornea. It is important to note that vitamin C, in addition to a non-enzymatic antioxidant activity, works in the restoration and modulation of other antioxidants such as vitamin E and may play an important role as a cellular messenger [40]. Ocular surface has a high concentration of vitamin C, where ascorbate protects these tissues from UV radiation, a strong ocular surface attacker, increasing its absorption [41]. The increase in proteins oxidative damage in the cornea demonstrated by the higher levels of carbonyl (Fig. 6) may have induced the increase in vitamin C levels observed in this study. It is noteworthy that alpha-lipoic acid, in addition to kidnapping of ROS and chelating metals, may also interact and regenerate other antioxidants such as ascorbate and vitamin E, as well as influence the regulation of thiol protein groups and protein structure [7].

The enzymatic antioxidant activity, measured through tSOD enzyme, was not altered in the conjunctiva, cornea and lacrimal gland demonstrating, in this study,

that ROS do not play an important role in development of the dry eye syndrome in the ocular surface and the lacrimal gland. While other studies have established the presence of oxidative stress in ocular surface of different dry eye models [41, 42, 43], our results showed that estropause does not stimulate ROS production in the ocular surface and lacrimal gland, differing from most studies using autoimmune inflammatory model, typical of the Sjögren syndrome, which may explain these different results. At the same time, tACO, an indirect measure of mitochondrial activity, the largest source of ROS due to the electron transport chain in aerobic organisms, did not change in the cornea, conjunctiva and lacrimal gland. *Uchino et al.* [42], on the other hand, using a transgenic mouse model (*Tet-mev-1*) with a decreased tear production, provided evidence that mitochondrial oxidative damage in the lacrimal gland induces lacrimal dysfunction resulting in dry eye disease.

In relation to the proteins oxidative damage, our results demonstrated that ovariectomy did not induce changes in the levels of carbonyl in the lacrimal gland, cornea or conjunctiva. Alpha-lipoic acid supplementation was responsible for the increased corneal carbonyl, while EPA supplementation decreased levels of damaged proteins in the conjunctiva. The anti-inflammatory effect of n-3 PUFA in the conjunctiva appears to be independent of prostaglandin production and must be attributed to other mediators such as resolvins and neuroprotectins, since the combination of n-6 and n-3 did not alter the production of prostaglandins [44]. As previously observed by Méndez *et al.* [45], supplementation with n-3 PUFA in Wistar rats decreased protein carbonylation in the liver, plasma, kidney and skeleton muscle with an ideal ratio of DHA/EPA 1:1. The antioxidant response of n-3 PUFA varies in different studies, methodologies and dosages [45]. In our study,

the lesser protein damage in conjunctive occurred in the supplemented group with a higher proportion of EPA/DHA (5:1), and the decrease of the protein damage was tissue-specific. Induction of protein damage with alpha-lipoic acid, specifically in the cornea, indicates that at the used dose, it can be acting as a pro-oxidant in the corneal tissue, instead of an antioxidant, without conjunctival and lacrimal gland action. Other studies have shown that lipoic acid and its reduced form, dihydrolipoic acid, may act as antioxidants or pro-oxidants in different biological systems and dosages [20, 46].

Regarding to lipids damage, MDA levels in the lacrimal gland were not altered by ovariectomy and EPA supplementation increased levels of MDA, showing that supplementation with EPA can increase oxidative lipids damage in the lacrymal gland. These findings can be explained by the incorporation of fatty acids in the lacrimal gland occurring differently in the supplemented groups and with opposite effects in specific tissues, since the EPA group had a minor protein damage in the conjunctiva and greater lipids damage in the lacrimal gland [18]. Differences in the dosage and duration of supplementation may explain the variation in the results. Alpha-lipoic acid exerted a protective effect on the lacrimal gland with decreased levels of MDA between the supplemented groups.

In agreement with other authors [34, 47], hormonal suppression of estrogen by ovariectomy induced a lower production of nitric oxide in this study, measured indirectly by nitrite/nitrate levels. These decreased levels of nitrite and nitrate are, in our view, indicative of a decrease in the antioxidant and protective effect of nitric oxide in ocular tissues and lacrimal gland, collaborating with a smaller tear production and triggering of the dry eye syndrome. Nitric oxide is produced

physiologically in small amounts from L-arginine as a substrate for NO sintase (NOs), activating cGMP production which, in turn, will exert a number of biological effects. However, in abnormal conditions of inflammation, great amounts of NO are produced by the inducible NOs that will react with ROS to form peroxynitrite and otherfree radicals, which react with thiol groups of various enzymes altering the cell biological function and leading to damage of DNA, lipids and apoptosis [48]. Beauregard *et al.* [12] reported that androgens and estrogens may decrease the inducible NOs production by interleukin 1- β in lacrimal gland under inflammatory conditions, and they may have an important role in inflammatory ocular response during menopause hormonal deprivation. As observed in other parameters in this study, the supplementation with n-3 PUFA and ALP recovered the nitric oxide production in the lacrimal gland, whereas only the ALP had restorative effect in the cornea. Both ALP and n-3 PUFA appear to exert a positive effect on the production of nitric oxide in the lacrimal gland and this effect may contribute partly to restoration of tear production in the supplemented animals. Cells of the corneal epithelium of supplemented DHA, EPA and ALP groups showed regular junctional cell integrity and presence of good microvilli surface, while in SHAM and OVX groups there was cell desquamation, junctional irregularity and microvilli loss. Our findings showed that the activity of glutathione peroxidase in ovariectomized animals was altered by estropause induction, but surprisingly it was increased only in the ALP group. Paliwal *et al.* [49] found a hormonal regulation of GPx activity with inhibitory effect of both sex hormones, especially androgens, although their studies were conducted with hamsters. This increase in GPx antioxidant defense in the ALP group shows that, while lipoic acid induced higher protein damage to the cornea,

acting as a pro-oxidant, it had an antioxidant effect in the lacrimal gland, inducing an increase in GPx antioxidant activity. Similarly, alpha-lipoic acid induces the recovery of nitric oxide and vitamin C levels to protect the corneal tissue and has no effect in the conjunctiva and lacrimal gland.

The tear production occurs through neuro-hormonal control where sensory afferents fibers from the cornea and conjunctiva reach high levels in the brain and will activate sympathetic and parasympathetic fibers. The role of the neurogenic system in the regulation of blood flow of the lacrimal gland can influence indirectly on tear secretion [3]. Changes of the neurohormonal status by aging could be accompanied by increased oxidative stress and decline of antioxidant defenses in the lacrimal gland, as indicated by Batista *et al.* [39], suggesting an important change on the local signaling pathway for exocytosis in the lacrimal gland acinar cells.

In the present study, it was observed that the increase in corneal protein damage was accompanied by an increase in antioxidant defenses in the cornea with higher levels of vitamin C and nitric oxide. These findings suggest that nitric oxide is acting as a signal in the nerve endings, with subsequent parasympathetic and sympathetic stimulation in the lacrimal gland exocytosis, and recovery of the lacrimal volume in the ALP group. Ovariectomized animals supplemented with alpha-lipoic acid had an increase in corneal protein damage, signaling an increase in antioxidant defenses in the lacrimal gland and with consequent reduction of glandular lipid peroxidation. The ALP effect is associated with different tissue responses and, probably, dosage dependent. In this study, the ALP showed an antioxidant activity in lacrimal gland and, at the same time, a pro-oxidant activity in corneal tissue. These different effects resulted in improvement of dry eye and corneal epithelium and restoration of

tear production. Increased levels of vitamin C and nitric oxide, acting as an antioxidant defense in corneal tissue in the ALP group, seems to be an important factor in the recovery of dry eye in these animals, and provide a direction for future studies on the action of lipoic acid in the treatment of dry eye. The difference in tissue responses is an important mechanism in the control of dry eye and the development of target and drug-specific treatments to control dry eye. The alpha-lipoic acid seems to play an important role, not yet fully investigated, in the oxidative stress regulation of the dry eye syndrome.

Acknowledgments

We thank Z. Almeida for technical assistance. This research was supported by grants from CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brazilian agency for research support).

Reference

- [1] Barabino, S; Chen, N. Y.; Chauhan, S.; Dana, R. Ocular surface immunity: homeostatic mechanisms and their disruption in dry eye disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 31: 271-85; 2012.
- [2] Brignole, F.; Auzerie, O.; Baudouin, C. Apoptose et surface oculaire. *J. Fr. Ophthalmol.* 26: 299-306; 2003.
- [3] Zoukhri, D. Effect of inflammation on lacrimal gland function. *Exp. Eye Res.* 82: 885-898; 2006.
- [4] Gumus, K.; Cavanagh, D. H. The role of inflammation and antiinflammation therapies in keratoconjunctivitis sicca. *Clin. Ophthalmol.* 3: 57-67; 2009.
- [5] Azzarolo, A. M.; Wood, R. L.; Mircheff, A. K.; Reicherters, A.; Olsen, E.; Berkowitz, M.; Bachmann, M.; Huang, Z. M.; Zolfagari, R.; Warren, D. W. Androgen influence on lacrimal gland apoptosis, necrosis and lymphocytic infiltration. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 40: 592-602; 1999.
- [6] 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.
- [7] 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.

- [8] Nakamura, S.; Shibuya, M.; Nakashima, H.; Hisamura, R.; Masuda, N.; Imagawa, T.; Uehara, M.; Tsubota, K. Involvement of oxidative stress on corneal epithelial alterations in a blink-suppressed dry eye. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 48: 1552-1558; 2007.
- [9] Uchino, Y.; Kawakita, T.; Miyazawa, M.; Ishii, T.; Onouchi, H.; Yaseda, K.; Oogawa, Y.; Shimmura, S.; Ishii, N.; Tsubota, K. Oxidative stress induced inflammation initiates functional decline of tear production. *Plos ONE.* 7: e45805; 2012.
- [10] Wakamatsu, T.; Dogru, M.; Matsumoto, Y.; Kojima, T.; Ibrahim, O.; Sato, E.; Igarashi, A.; Ichihashi, Y.; Shimazaki, J.; Tsubota, K. Evaluation of lipid oxidative stress status in Sjögren syndrome patients. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 54: 201-210; 2013.
- [11] Cejková, J.; Ardan, T.; Simonová, Z.; Cejka, C.; Malec, J.; Jirsová, K.; Filipec, M.; Dotrelová, D.; Brunová, B. Nitric oxide synthase induction and cytotoxic nitrogen-related oxidant formation in conjunctival epithelium of dry eye (Sjögren's syndrome). *Nitric Oxide.* 17: 10-17; 2007.
- [12] Beauregard, C.; Brandt, P. C. Down regulation of interleukin-1B-induced nitric oxide production in lacrimal gland acinar cells by sex steroids. *Curr. Eye Res.* 29: 59-66; 2004.
- [13] Marcozzi, G.; Liberati, V.; Madia, F.; Pizzinga, A.; Feo, G. Effect of hormone replacement therapy on lacrimal fluid peroxidase activity in woman. *Maturitas.* 45: 225-229; 2003.
- [14] Muthusami, S.; Ramachandam, I.; Muthusamy, B.; Vasudevan, G.; Prabhu, V.; Subramaniam, V.; Jagadeesan, A.; Narasimhan, S. Ovariectomy induces

- oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adults rats. *Clin. Chim. Acta.* 360: 81-86; 2005.
- [15] Calder, P. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids.* 36: 1007-1024; 2001.
- [16] Macsai, M.S. The role of omega-3 dietary supplementation in blepharitis and meibomian gland dysfunction (an aosis thesis). *Trans. Am. Ophthal. Soc.* 106: 336-356; 2008.
- [17] Viau, S.; Pasquis, B.; Marie, M.; Fourgeux, C.; Grégoire, S.; Acar, N.; Bretilon, L.; Creuzot-Garcher, C.; Joffre, C. No consequences of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency on the severity of scopolamine-induced dry eye. *Graef. Arch. Clin. Exp. Ophthal.* 249: 547-557; 2011.
- [18] Viau, S.; Maire, M.; Pasquis, B.; Grégoire, S.; Acar, N.; Bron, A.; Bretilon, L.; Creuzot-Garcher, C.; Joffre, C. Efficacy of a 2-month dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids in dry eye induced by scopolamine in a rat model. *Graef. Arch. Clin. Exp. Ophthal.* 247:1039-1050; 2009.
- [19] Wojtowicz, W.; Butovich, I, Uchiyama, E.; Aronowicz, J.; Agee, S.; McCulley, J. Pilot, prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical trial of an omega-3 supplement for dry eye. *Cornea.* 0: 1-7; 2010.
- [20] Çakatay, U. C. Pro-oxidant actions of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Med. Hypotheses.* 66:110-117; 2006.
- [21] Akpınar, D.; Yargıçođlu, P.; Derin, N.; Alicigüzel, Y.; Agar, A. The effect of lipoic acid in antioxidant status and lipids peroxidation in rats exposed to chronic restraint stress. *Physiol. Res.* 57: 893-901; 2008.

- [22] Luil, J. The effects and mechanisms of mitochondrial nutrient alpha-lipoic acid on improving age-associated mitochondrial and cognitive dysfunction: an overview. *Neurochem. Res.* 33: 194-203; 2008.
- [23] Palaniappan, A.; Dai, A. Mitochondrial ageing and the beneficial role of alpha-lipoic acid. *Neurochem. Res.* 32: 1552-1558; 2007.
- [24] Freeman, M. E. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Knobil, E.; Neil, J. D., eds. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press; 1994: 613-658.
- [25] Reeves, P.; Nelsen, F.; Fahey Jr. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 123:1939-1951; 1993.
- [26] Hackenhaar, F.S.; Salomon, T.B.; Alabarse, P.G.; Ehrenbrink, G.; Benfato, MS. Pulmonary antioxidant defenses and protein damage during the ageing process of both sexes. *Cell. Biochem. Funct.* 27: 378–382; 2009.
- [27] Nakamura, S.; Shibuya, M.; Nakashima, H.; Imagawa, T.; Uehara, M.; Tsubota, k. D-β-Hydroxybutyrate protects against corneal epithelial disorders in a rat dry eye model with jogging board. *Invest. Ophthal. Vis. Sci.* 27: 2379-2387; 2005.
- [28] Rahman, I.; Kode, A.; Biswas, K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protocols.* 1: 3159-3165; 2006.

- [29] Grisham, M. B.; Johnson, G. G.; Lancaster, J.R. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol.* 268: 237-246; 1996.
- [30] Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G.; Ahn, B.W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186: 464-478; 1990.
- [31] Razmara, A.; Duckles, S.P.; Krause, D.N.; Procaccio, V. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res.* 1176: 71-81; 2007.
- [32] Karatepe, M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *LCGC North Americ.* 22: 362-65; 2004.
- [33] Bradford, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254; 1976.
- [34] Gruber, C. J.; Tschugguel, W.; Schneeberger, C.; Huber, J. C. Production and actions of estrogens. *N. Engl. J. Med.* 345: 340-352; 2002.
- [35] Niki, E.; Nakano, M. Estrogens as antioxidant. *Methods Enzymol.* 186: 330-336; 1990.
- [36] Cremer, D. R.; Rabeler, R. R.; Roberts, A.; Lynch, B. Safety evaluation of α -lipoic acid (ALA). *Regul. Toxicol. Pharm.* 46: 193-201; 2006.
- [37] Rashid, S.; Jin, Yi.; Ecoiffier, T.; Barabino, S.; Schaumberg, D. A.; Dana, R. Topical ω -3 and ω -6 fatty acids for treatment of dry eye. *Arch. Ophthalmol.* 126: 219-225; 2008.

- [38] Aragona, P.; Bucolo, C.; Spinella, R.; Giuffrida, S.; Ferreri, G. Systemic omega-6 essential fatty acid treatment and PGE1 tear content in Sjögren syndrome patients. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 4474–4479; 2005.
- [39] Batista, T. M.; Tomiyoshi, L. M.; Dias, A. C.; Roma, L. P.; Módulo, C. M.; Malki, L. T.; Filho, E. B. M.; Deminice, R.; Jordão Jr., A. A.; Cunha, D. A.; Rocha, E. M. Age-dependent changes in rat lacrimal gland anti-oxidant and vesicular related protein expression profiles. *Mol. Vis.* 18: 194-202; 2012.
- [40] Niki, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Rad. Biol. Med.* 49: 503-515; 2010.
- [41] Wakamatsu, T. H.; Dogru, M.; Matsumoto, Y.; Kojima, T.; Kaido, M.; Ibrahim, O. M. A.; Sato, E. A.; Igarashi, A.; Ichihashi, Y.; Satake, Y.; Shimazaki, J.; Tsubota, K. Evaluation of lipid oxidative stress status in Sjögren syndrome patients. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54:201–210; 2013.
- [42] Uchino, Y.; Kawakita, T.; Miyazawa, M.; Ishii, T.; Onouchi, H.; Yasuda, K.; Ogawa, Y.; Shimmura, S.; Ishii, N.; Tsubota, K. Oxidative stress induced inflammation initiates functional decline of tear production. *PLoS ONE.* 7: e45805; 2012.
- [43] Black, A. T.; Gordon, M. K.; Heck, D. E.; Gallo, M. A.; Laskin, D. L.; Laskin, J. D. UVB light regulates expression of antioxidants and inflammatory mediators in human corneal epithelial cells. *Biochem. Pharmacol.* 81: 873-880; 2011.
- [44] Viau, S.; Leclère, L.; Buteau, B.; Grégoire, S.; Acar, N.; Bron, A.; Creuzot-Garcher, C. P.; Bretilon, L.; Joffre, C. Polyunsaturated fatty acids induce modification in the lipid composition and the prostaglandin production of the conjunctival epithelium cells. *Graef. Arch. Clin. Exp.* 250:211–222; 2012.

- [45] Méndez, L.; Pazos, M.; Gallardo, J. M.; Torres, J. L.; Pérez-Jiménez, J.; Nogués, R.; Romeu, M.; Medina, I. Reduced protein oxidation in Wistar rats supplemented with marine ω 3 PUFAS. *Free Rad. Biol. Med.* 55: 8-20. 2013.
- [46] Moini, H.; Packer, L.; Saris, N. Antioxidant and prooxidant activities of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol. Appl. Pharm.* 182: 84-90; 2002.
- [47] Hayashi, T.; Fukutto, J. M.; Ignarro, L. J.; Chaudhuri, D. Basal release of nitric oxide from aortic ring is greater in female rabbits than male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:11259-11263; 1992.
- [48] Chioi, G. C. Y. Review: effects of nitric oxide on eye diseases and their treatment. *J. Ocul. Pharmacol. Th.* 17: 189-198; 2001.
- [49] Paliwal, A.; De, P. K. Marked sexual dimorphism of lacrimal gland peroxidase in hamster: repression by androgens and estrogens. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 341: 1286-1293; 2006.

Table 1. Animal weight.

	SHAM	OVX	DHA	EPA	ALP
Initial weight (g)	211.8 ± 19.2	224.5 ± 15.3	223 ± 19.6	190.2 ± 12.1	217 ± 19.7
Final weight (g)	262.8 ± 22.3 [#]	297.2 ± 28.4 [#]	311 ± 44.7 ^{#*}	299.4 ± 21.1 ^{#*}	284.9 ± 19.3 [#]
Δ weight (g)	51,0	72,7	88,0	109,2	67,9

Results were expressed as mean ± S.E.M. ($n = 10$ per group) and significance determined using factorial ANOVA of repeated measures, where $p \leq 0.05$ was considered significant. * indicates a significant difference when compared to the SHAM group final weight. # indicates a significant difference between the final weight and the initial weight in the same group. Groups: SHAM (control), OVX (ovariectomized), DHA (docosahexaenoic acid), EPA (eicosapentaenoic acid), ALP (alpha-lipoic acid). Δ = difference between final and initial weight.

Table 2. Total superoxide dismutase (tSOD), total aconitase (tACO), total Glutathione (tGSH) and vitamin C.

	SHAM	OVX	DHA	EPA	ALP
tSOD (U/mg protein)					
Cornea	424.96±34.67	348.2 ±60.44	413.51±35.92	360.08 ±54.15	434.56 ±45.20
Conjunctiva	396.81±59.50	334.65 ±38.23	494.59 ±48.30	415.57 ±16.36	302.24 ±17.52
Lacrimal gland	71.08 ±5.12	60.71 ±5.29	72.89 ± 5.69	86.29 ±7.44	63.91 ±6.02
tACO (U/g protein)					
Cornea	1416.56 ±194.05	1017.41 ±129.94	1601.16 ±244.64	1335.51 ±340.53	994.41 ±77.54
Conjunctiva	971.08 ±155.05	732.51 ±59.09	1038.77±119.07	1187.22 ±211.93	949.53 ±181.96
Lacrimal gland	231.77 ±52.83	199.52 ±25.11	188.55 ±14.47	242.94 ±19.17	225.21 ±27.24
tGSH (µmol/mg protein)					
Lacrimal gland	10139.56±3928.45	6749.87 ±1061.00	6008.40 ±852.15	6884.40±852.15	1469.46 ±455.83
Vitamin C (mg/g protein)					
Lacrimal gland	0.47±0.09	0.23 ±0.09	0.45 ±0.08	0.26 ±0.07	0.55 ±0.06

Results were expressed as mean ± S.E.M. ($n = 10$ per group). Significance was determined using one-way ANOVA where $p \leq 0.05$ was considered significant. Groups: SHAM (control), OVX (ovariectomized), DHA (docosahexaenoic acid), EPA (eicosapentaenoic acid), ALP (alpha-lipoic acid).

Table 3. Conjunctival and lacrimal gland carbonyl.

	SHAM	OVX	DHA	EPA	ALP
Carbonyl (nmol/mg protein)					
Conjunctival	0.35± 0.08	0.09 ±0.01	0.28 ±0.07	0.05 ±0.01*	0.35±0.10
Lacrimal gland	0.03 ±0.00	0.04 ±0.00	0.06 ±0.01	0.05±0.01	0.05 ±0.01

Results were expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 10$ per group). Significance was determined using one-way ANOVA where $p \leq 0.05$ was considered significant. * indicates statistically significant difference with SHAM and ALP groups. Groups: SHAM (control), OVX (ovariectomized), DHA (docosahexaenoic acid), EPA (eicosapentaenoic acid), ALP (alpha-lipoic acid).

Fig.1. Hormonal level.

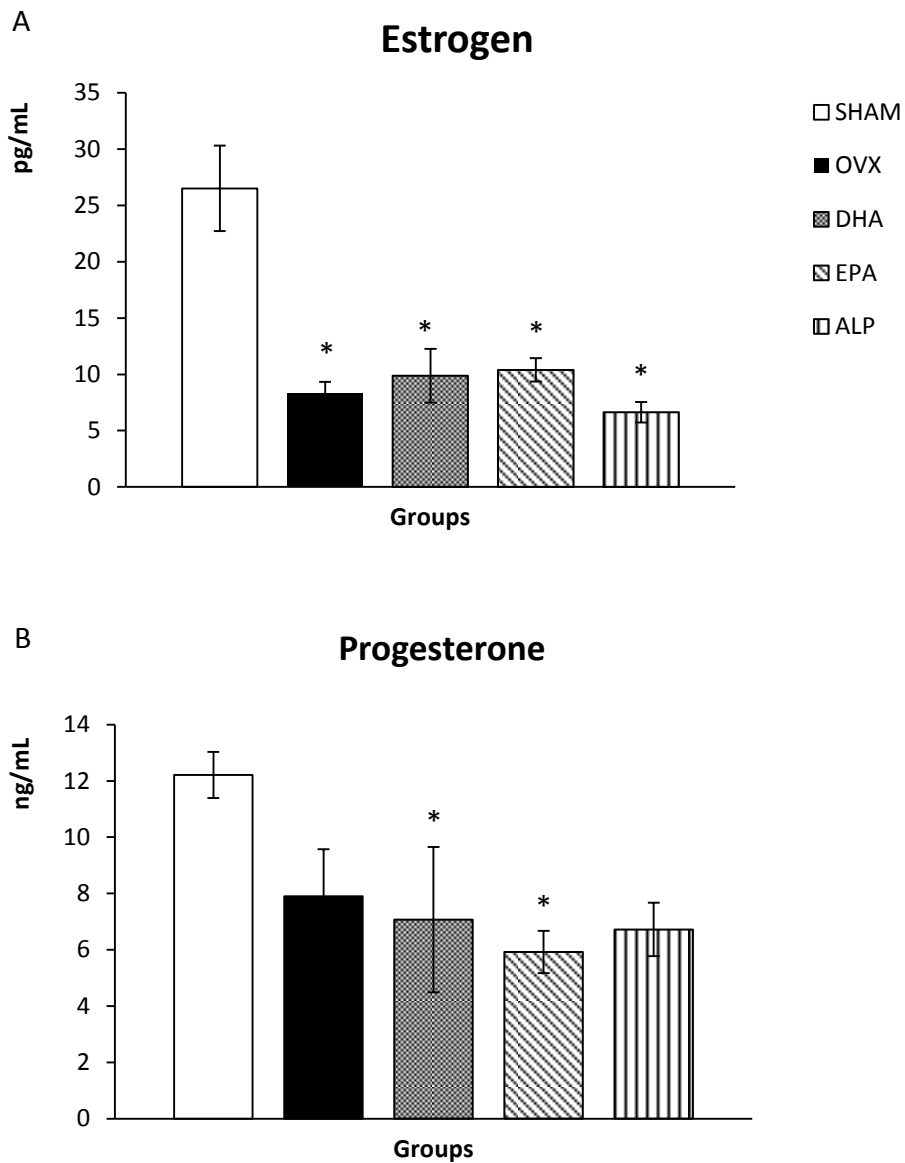


Fig. 1. Hormone levels evaluation of estrogen (A) and progesterone (B) were estimated by solid phase radioimmunoassay in the different groups after the respective treatment to confirm the surgical induction of estropause. Results are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 10$ per group). Significance was determined using one-way ANOVA where $p \leq 0.05$ was considered significant. * indicates statistical difference from the SHAM group. Groups: SHAM (control), OVX (ovariectomized), DHA (docosahexaenoic acid), EPA (eicosapentaenoic acid), ALP (alpha-lipoic acid).

Fig. 2. Schirmer test.

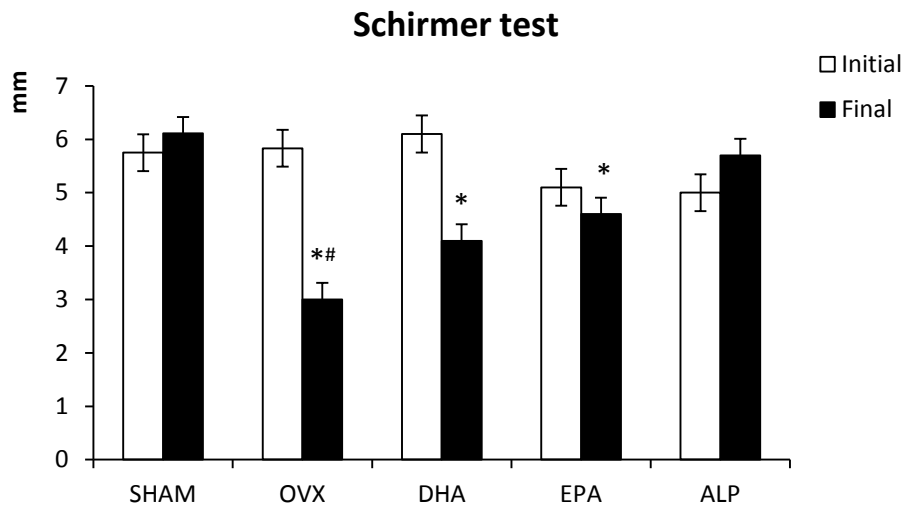


Fig. 2. Modified Schirmer test to measure tear fluid secretion with a filter paper of 2 mm width by 30 mm length. Results are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 10$ per group). Significance was determined using factorial ANOVA of repeated measures where $p \leq 0.05$ was considered significant. * indicates statistical difference from the SHAM group in the end of the study. # indicates statistical difference within the same group at the end of the study. Groups: SHAM (control), OVX (ovariectomized), DHA (docosahexaenoic acid), EPA (eicosapentaenoic acid), ALP (alpha-lipoic acid).

Fig. 3. Lacrimal gland GPx.

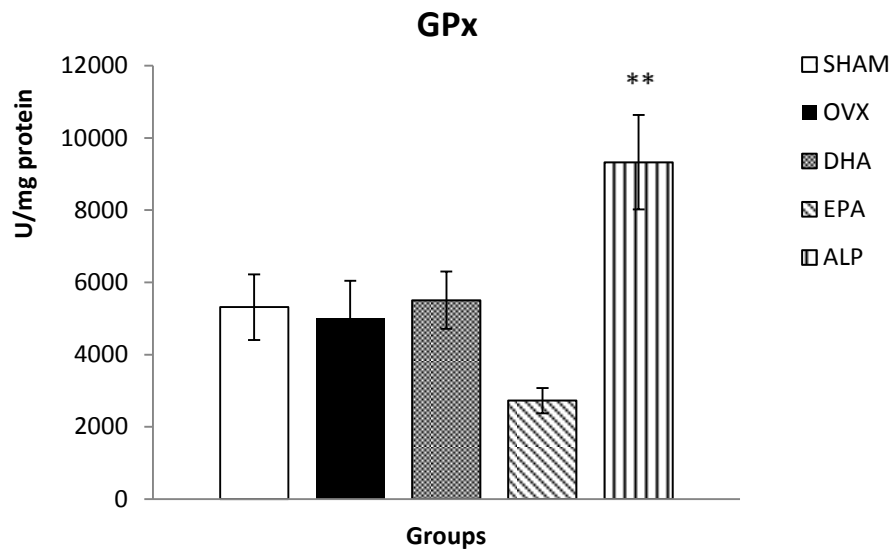


Fig. 3. Glutathione peroxidase activity in the lacrimal gland. Results are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 10$ per group). Significance was determined using one-way ANOVA where $p \leq 0.05$ was considered significant. ** indicates statistical difference of ALP group from all other groups. Groups: SHAM (control), OVX (ovariectomized), DHA (docosahexaenoic acid), EPA (eicosapentaenoic acid), ALP (alpha-lipoic acid).

Fig. 4. Conjunctival and corneal vitamin C.

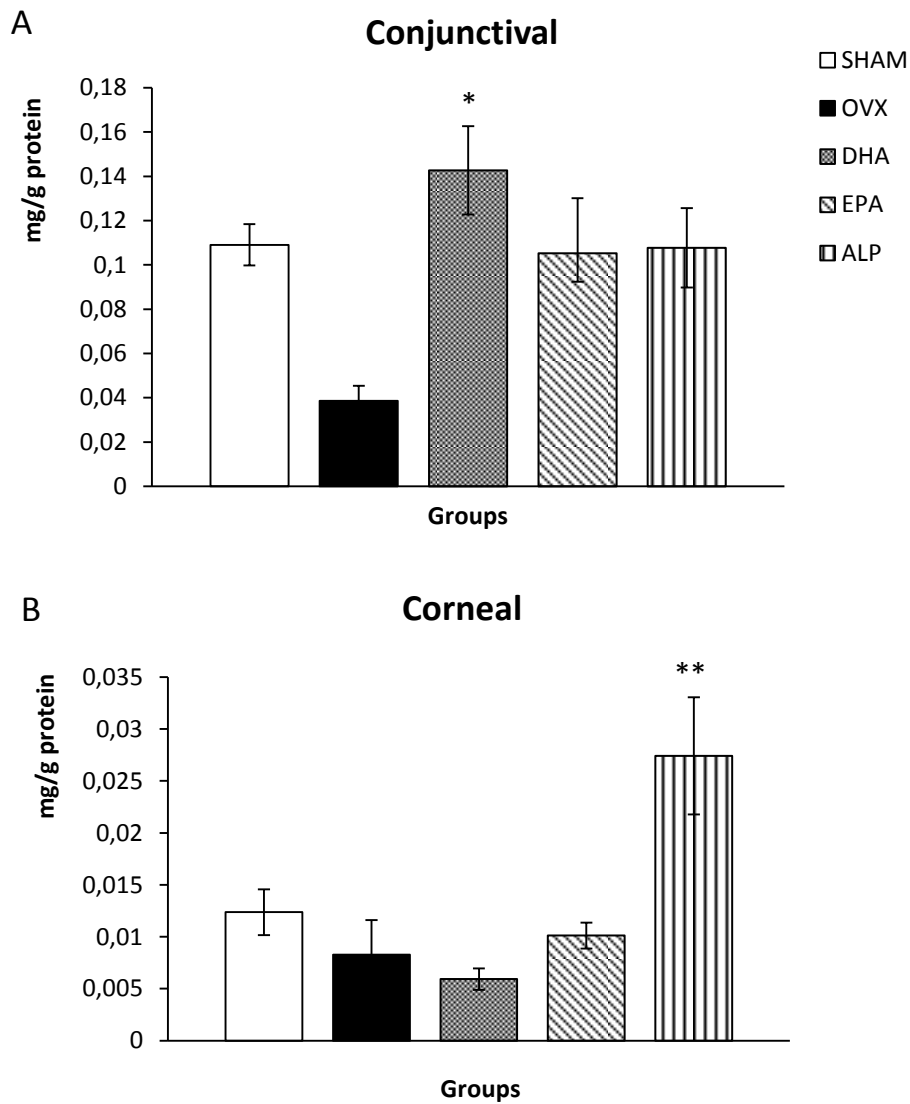


Fig. 4. Vitamin C levels in cornea and conjunctiva. Results are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 10$ per group). Significance was determined using one-way ANOVA where $p \leq 0.05$ was considered significant. * indicates statistical difference of DHA group from OVX group. ** indicates statistical difference of ALP group from all other groups. Groups: SHAM (control), OVX (ovariectomized), DHA (docosahexaenoic acid), EPA (eicosapentaenoic acid), ALP (alpha-lipoic acid).

Fig. 5. Conjunctival, corneal and lacrimal gland nitrite and nitrate.

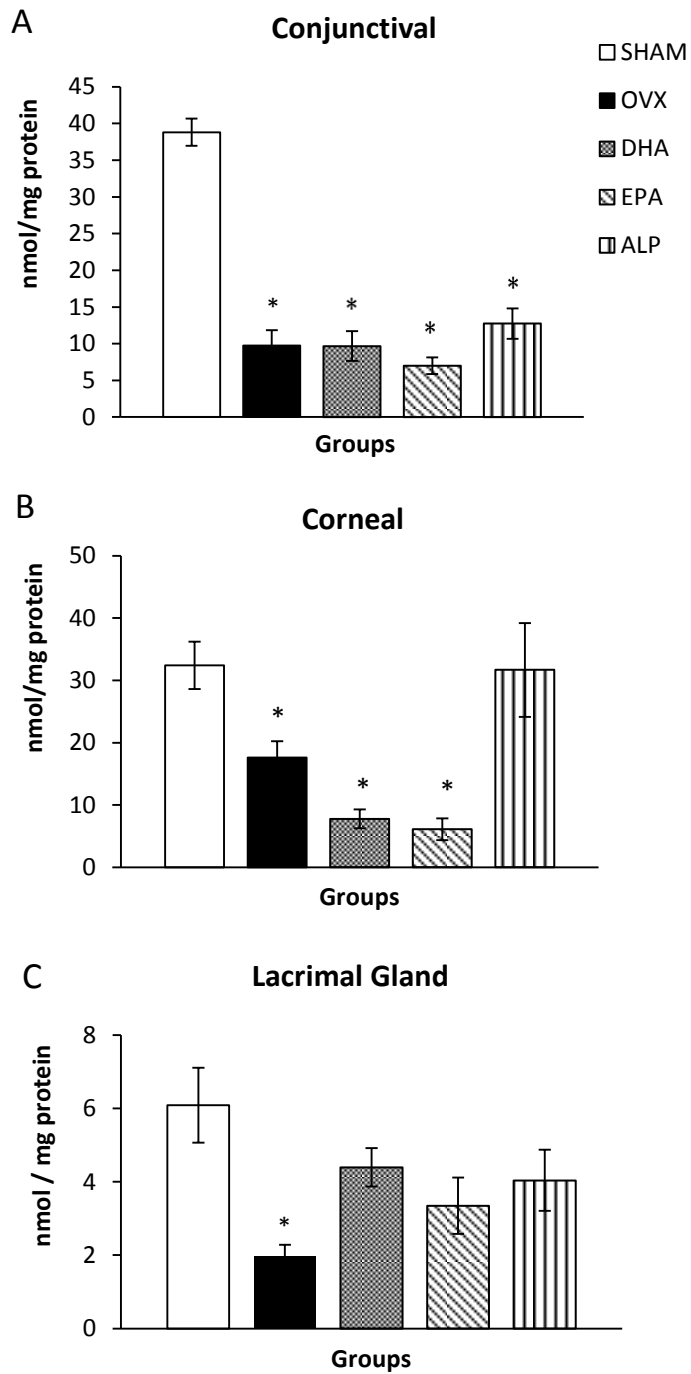


Fig. 5. Nitrite and nitrate levels in conjunctiva (A), cornea (B) and lacrimal gland (C). Results are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 10$ per group). Significance was determined using one-way ANOVA where $p \leq 0.05$ was considered significant. * indicates statistical difference from the SHAM

group. Groups: SHAM (control), OVX (ovariectomized), DHA (docosahexaenoic acid), EPA (eicosapentaenoic acid), ALP (alpha-lipoic acid).

Fig. 6. Conjunctival and corneal carbonyl.

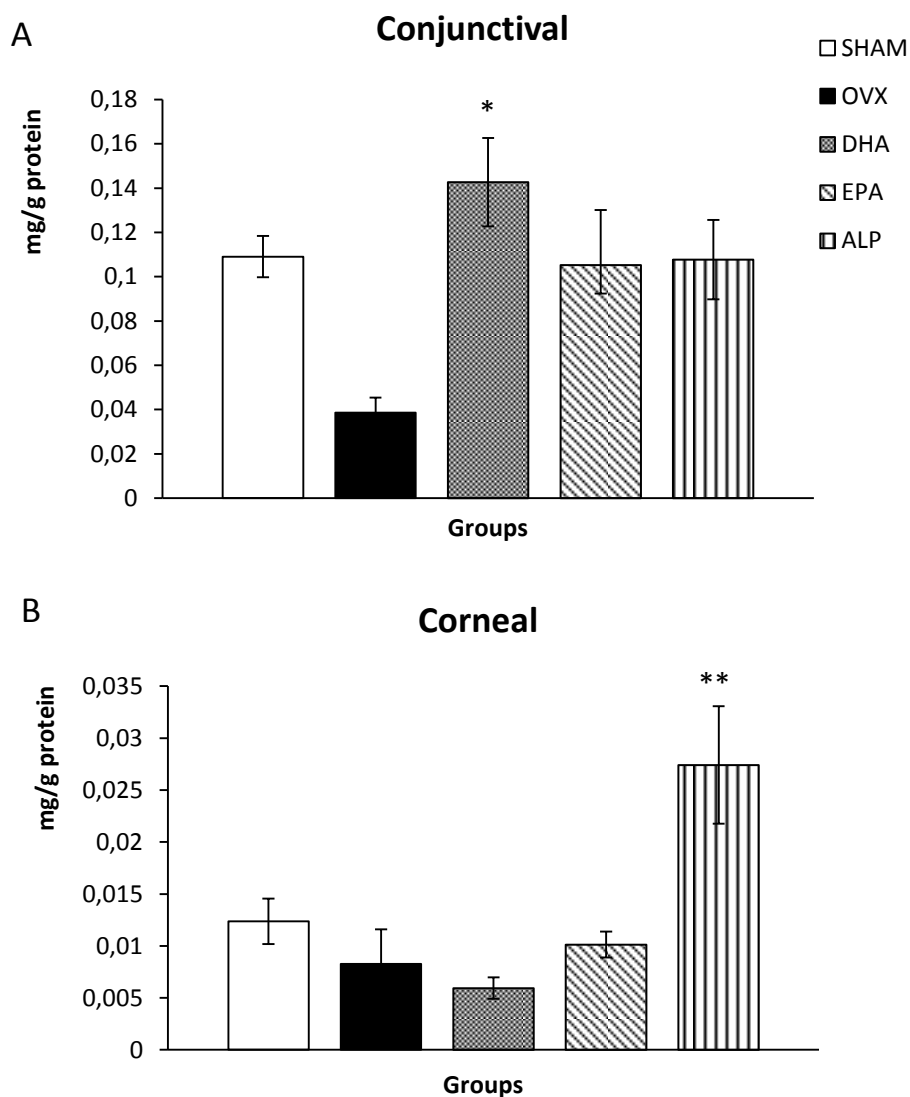


Fig. 6. Conjunctival protein damage, measured by the levels of carbonyl, in conjunctiva (A) and cornea (B). Results are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 10$ per group) Significance was determined using one-way ANOVA where $p \leq 0.05$ was considered significant. * indicates statistical difference of EPA group from SHAM and ALP groups. ** indicates statistical difference of ALP group from all the other groups. Groups: SHAM (control), OVX (ovariectomized), DHA (docosahexaenoic acid), EPA (eicosapentaenoic acid), ALP (alpha-lipoic acid).

Fig. 7. Lacrimal gland MDA

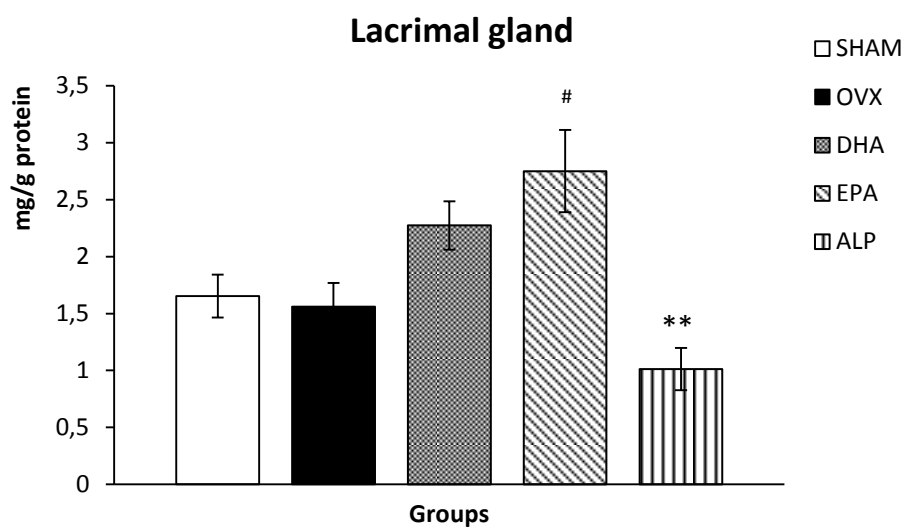


Fig. 7. MDA levels, indicative of lipid peroxidation, in lacrimal gland. Results are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 10$ per group). Significance was determined using one-way ANOVA where $p \leq 0.05$ was considered significant. ** indicates statistical difference of ALP group from DHA and EPA groups. # indicates statistical difference of EPA group from SHAM, ALP and OVX groups. Groups: SHAM (control), OVX (ovariectomized), DHA (docosahexaenoic acid), EPA (eicosapentaenoic acid), ALP (alpha-lipoic acid).

Fig. 8. Scanning electron microscopy.

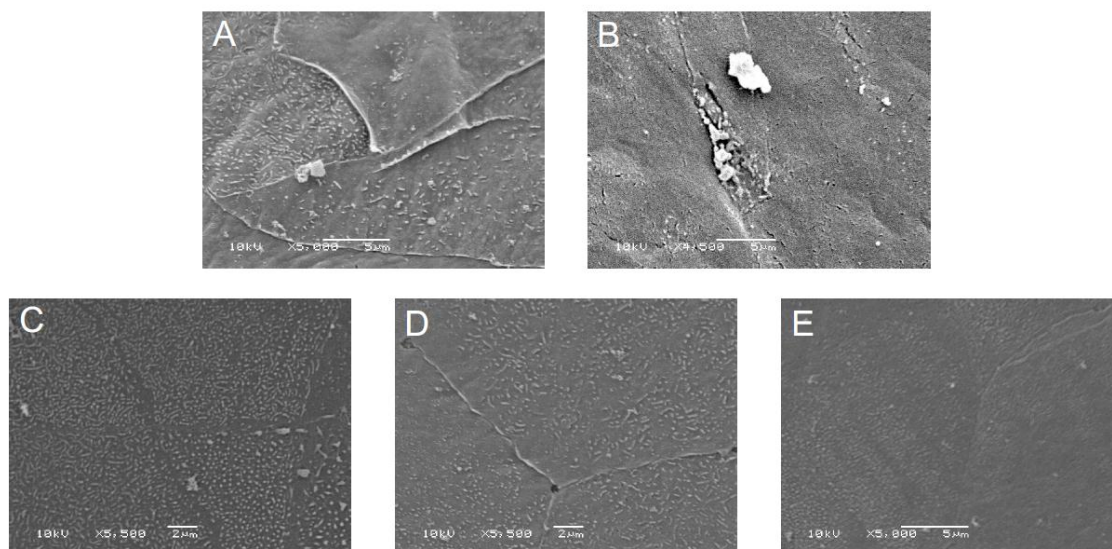


Fig. 8. Epithelial cells of apical cornea showed some degree of desquamation and microvilli irregularity in SHAM group (A) and more accentuated microvilli loss in OVX group (B). Regular polygonal epithelial mosaic in DHA (C), EPA (D) and ALP (E) groups showed a positive supplementation effect in the corneal surface of ovariectomized animals ($n = 1$ per group). Groups: SHAM (control), OVX (ovariectomized), DHA (docosahexaenoic acid), EPA (eicosapentaenoic acid), ALP (alpha-lipoic acid).

Footnotes

¹ capsule 1g fish oil with 500 mg DHA and 100 mg EPA, PO9037701 Naturalis, SP, Brazil.

² capsule 1g fish oil with 540 mg EPA and 100 mg DHA, PO9037701 Naturalis, SP, Brazil.

DISCUSSÃO

Nosso estudo utilizou um modelo animal de olho seco onde induzimos a estropausa cirúrgica em ratas Wistar pela ovariectomia bilateral, mimetizando a menopausa em seres humanos. A prevalência aumentada de olho seco em mulheres na menopausa está relacionada com alterações neuro-hormonais, incluindo a diminuição dos níveis hormonais de estrogênio e androgênio na secreção e estrutura da glândula lacrimal (SULLIVAN *et al.*, 1996). Modelos de envelhecimento em ratos mostraram uma diminuição na secreção lacrimal relacionada com múltiplos mecanismos, incluindo perda da estimulação neural com envolvimento do estresse oxidativo e mediada por respostas imunológicas e inflamatórias (ROCHA *et al.*, 2008). Em nosso entendimento, uma melhor avaliação do estresse oxidativo na glândula lacrimal e em tecidos da superfície ocular deve ser feita em modelo de olho seco simulando a menopausa, uma vez que a diminuição dos níveis de hormônios sexuais, além de ser uma alteração fisiológica dos seres humanos, é uma alteração natural em modelos de envelhecimento, o que facilita uma transposição de resultados. Modelos evaporativos, inflamatórios ou neuro-regulatórios da secreção lacrimal também são úteis na avaliação da síndrome do olho seco e contribuem para análise dos diversos mecanismos envolvidos nesta patologia (BARABINO & DANA, 2004). Estudos mostram que o estresse oxidativo participa da patogênese do olho seco na superfície ocular quando ocorre a retirada da glândula lacrimal (HIGUCHI *et al.*, 2010) e na supressão da piscada palpebral (NAKAMURA *et al.*, 2007). Modelos de indução de olho seco por usuários de terminais de vídeos estão relacionados com hipofunção

da glândula lacrimal (NAKAMURA *et al.*, 2010). Modelos genéticos que possam incluir as diferentes alterações moleculares, muitas ainda sem elucidação adequada, poderão auxiliar no estudo desta complexa síndrome e facilitar o desenvolvimento de uma terapêutica mais eficaz e abrangente na restauração da superfície ocular.

A indução cirúrgica da estropausa foi confirmada pela queda dos níveis hormonais de estrogênio. A queda dos níveis de progesterona não ocorreu em todos os grupos já que a produção adrenal de progesterona pode manter os níveis encontrados. A variação hormonal nas diferentes fases do ciclo estral e dentro da mesma fase, conforme SMITH *et al.* (1975), mostram que os níveis de progesterona em ratas no período fértil podem estar abaixo dos valores encontrados em nosso estudo. Para minimizar as flutuações hormonais do ciclo estral procuramos realizar a ovariectomia e eutanásia dos animais na mesma fase estral (diestro).

Realizamos a suplementação dietética por um período de 16 semanas após a ovariectomia, evitando a influência do tempo de estudo em nossos resultados. Trabalhos de VIAU *et al.* (2010) mostraram que a suplementação dietética com AGPI n-3 e n-6 em modelo animal de olho seco induzido pela escopolamina, durante 8 semanas, já foi capaz de diminuir a evolução do olho seco e interferir como padrão de incorporação lipídica na glândula lacrimal. BARABINO *et al.* (2003) fizeram a suplementação de pacientes com CS por SS com AGPI n-6 por 45 dias, obtendo melhora dos sintomas de olho seco. Procuramos manter ao longo do estudo um adequado controle alimentar das ratas, evitando que o aumento de peso durante a estropausa, característico das alterações metabólicas envolvidas nesta

etapa da vida, pudesse contribuir para as alterações de estresse oxidativo em avaliação. Fizemos controle alimentar dos grupos ovariectomizados pelo grupo SHAM e pudemos notar que no grupo OVX não houve aumento significativo de peso, embora os grupos suplementados com AGPI n-3, DHA e EPA, tiveram maior consumo de ração e, conseqüentemente, maior aumento de peso. Suspeitamos que esse aumento de consumo possa ter ocorrido em função de uma maior palatabilidade da ração suplementada com AG que perderam um pouco de sua estrutura rígida dos pellets originais. Importante salientar que toda ração suplementação foi feita em nosso laboratório, quando tentamos simular a ração padrão em pellets dados ao grupo SHAM (Nuvilab®). Para isso, utilizamos a ração padrão em farelo, suplementada com os AG em óleo e o ALP em pó e, através de um dispositivo confeccionado no laboratório, conseguimos compactar a ração e mimetizar parcialmente os pellets, padronizando a ração para todos os grupos. Em virtude dos óleos aumentarem a umidade da ração suplementada, deixamos a mesma em estufa com baixa ventilação e baixa temperatura durante 12 horas para assumir a mesma textura da ração padrão e evitarmos a oxidação dos AG. Entendemos, no entanto, que a busca por esta padronização da ração possa ter contribuído para que alguma oxidação dos AG tenha ocorrido, comprometendo, de alguma forma, os resultados nos grupos EPA e DHA. Ao longo do estudo todos os grupos tiveram aumento significativo de peso e o efeito inibidor de apetite do ALP, conforme estudos de CREMER *et al.* (2006), não foi verificado em nosso estudo na dosagem utilizada.

A comparação do teste de Schirmer inicial e final confirmou a diminuição da produção de lágrima no grupo ovariectomizado, com recuperação nos grupos

suplementados. Comparando o teste de Schirmer final detectamos uma recuperação total no grupo ALP e parcial nos grupos DHA e EPA, que tiveram uma recuperação em relação ao grupo OVX, mas não em relação ao grupo SHAM. Estes dados sugerem que a suplementação com AGPI n-3 e com ALP contribuem para a recuperação da produção lacrimal em animais submetidos à estropausa, embora o ALP tenha mostrado, em nosso estudo, um melhor efeito que o ômega 3 no teste de Schirmer. Estudos de VIAU *et al.* (2009) demonstraram que a administração de AGPI n-3 ajudou a prevenir a evolução da síndrome do olho seco de forma parcial em modelo animal de olho seco, enquanto ARAGONA *et al.* (2005) demonstrou que o uso de AGPI n-6 melhorou os sintomas de desconforto ocular em pacientes com SS. O papel do ALP na produção lacrimal não havia sido estudado até o presente momento, embora estudos tenham demonstrado papel protetor na superfície ocular, com proteção da córnea e conjuntiva contra o estresse oxidativo induzido pela radiação UV (DEMIR *et al.*; 2005).

Procuramos avaliar separadamente os tecidos da superfície ocular como córnea e conjuntiva e a glândula lacrimal, com o objetivo de verificar o dano oxidativo induzido pela estropausa e a resposta de cada tecido com as suplementações utilizadas. Nossos resultados mostraram que o estresse oxidativo tem papel importante nas alterações que ocorrem na glândula lacrimal e na superfície ocular durante a estropausa, embora a suplementação com ômega 3 e ALP tenha causado respostas diferentes em relação a participação das ERO e ERN.

Os AGPI n-3 DHA e EPA parecem contribuir de maneira diferente em modelos autoimunes de olho seco, onde mostraram melhores resultados do que em

nosso modelo hormonal. Diferentes estudos têm atribuído o efeito anti-inflamatório dos AGPI n-3 através da competição com o AA (derivado ômega 6) na composição dos fosfolípidios de membranas, bloqueando enzimas envolvidas da síntese de eicosanoides que participam do processo inflamatório celular e alterando o estresse oxidativo, com importante participação no tratamento de doenças inflamatórias autoimunes (SIMOPOULUS, 2002; CALDER, 2006 & WATHES *et al.*, 2007). Em nosso modelo de olho seco, o processo inflamatório parece não ter uma influência grande na regulação neuro-hormonal da produção lacrimal, não sendo, a nosso ver, fator crucial para diminuição da secreção proteica e lacrimal. As alterações inflamatórias presentes na doença autoimune da glândula lacrimal não são vistas na supressão hormonal, sendo consequência das alterações induzidas pela indução do olho seco. Desta maneira, o uso dietético de ômega 3 melhorou parcialmente a produção lacrimal na supressão estrogênica, mas com participação limitada do estresse oxidativo. Os AGPI não alteraram a produção de ERO na glândula lacrimal, onde a incorporação aumentada do ômega 3 suplementado neste tecido, conforme verificado por VIAU *et al.* (2009), não melhorou o balanço redox na produção lacrimal.

Parece-nos que mecanismos moleculares sinalizadores, através das vias neurais que compreendem a produção lacrimal e através da participação de ERN como sinalizadores e mensageiros celulares na glândula lacrimal, incluindo a participação do ON no equilíbrio redox da unidade funcional lacrimal, contribuem de maneira importante na restauração da secreção lacrimal durante a estropausa. O uso do ALP mostrou resultados surpreendentes na recuperação do olho seco em nosso modelo, tendo recuperado totalmente a produção lacrimal através do teste

de Schirmer e com participação importante no estresse oxidativo e nas respostas antioxidantes nos diferentes tecidos envolvidos na síndrome do olho seco. Parece que sua atuação tecido e dose-específica pode contribuir para controle do olho seco, mostrando mecanismos de atuação, até então não estudados, na modulação do estresse oxidativo na córnea, conjuntiva e glândula lacrimal e com participação importante de ERN e metabólitos de ON.

Nossos ensaios mostraram que no grupo suplementado com ALP, o tecido corneano teve maior dano proteico confirmado pelo aumento da produção de carbonil, mostrando que neste tecido e na dosagem utilizada, o ALP está agindo como pró-oxidante, conforme estudos de MOINI *et al.* (2002). Como resposta antioxidante, este grupo mostrou aumento nos níveis indiretos de ON e de vitamina C no tecido corneano. Em nosso entendimento, o ON pode atuar como sinalizador via terminações nervosas alfa-adrenérgicas estimulando a glândula lacrimal (ROCHA *et al.*, 2008). Desta maneira, o aumento da atividade da GPx na glândula lacrimal, verificada em nosso estudo, como resposta antioxidante, colaborou ativamente para a recuperação do olho seco. Embora os estudos de ROCHA *et al.* (2008) relatem que os níveis de peroxidase lacrimal em ratos são muitas vezes superior que o encontrado em humanos dificultando seu uso em estudos de estresse oxidativo, acreditamos que sua participação na recuperação do olho seco em nosso modelo animal não pode ser descartada e deve servir como base para futuros estudos. A atuação do ON no controle do tônus vascular, causando aumento da circulação sanguínea no tecido lacrimal e aumento da secreção acinar, também parece ser um dos mecanismos de atuação destas molécula na melhora do olho seco evidenciada e deve ser investigada para esclarecimento da sua

atuação. Já o aumento dos níveis de vitamina C corneana no grupo ALP, ajudando na recuperação deste tecido mostra que este antioxidante não enzimático, juntamente com o ALP, pode atuar como regenerador de outros antioxidantes e como mensageiro celular (NIKI, 2010 & MOINI *et al.*, 2002). Podemos notar também que os níveis de MDA medidos na glândula lacrimal mostraram que a peroxidação lipídica, entre os grupos suplementados, teve menor nível no grupo ALP, enquanto o uso de EPA mostrou maior peroxidação lipídica. Portanto, a suplementação com ALP pode ajudar no controle do estresse oxidativo em lipídios na glândula lacrimal ao passo que o uso de EPA pode limitar o uso desta suplementação no controle do olho seco. Diminuição do dano oxidativo em lipídio com aumento do fluxo sanguíneo local mediado pelo ON colaborou para a restauração da produção lacrimal no grupo ALP.

A participação de ERO em nosso estudo, diferentemente de outros estudos (BLACK *et al.*, 2011; UCHINO *et al.*, 2012 & WAKAMATSU *et al.*, 2013), não teve papel importante no desencadeamento de estresse oxidativo na superfície ocular e glândula lacrimal, mostrando que a supressão hormonal da estropausa não estimula o estresse oxidativo mediado por ERO, embora modelos autoimunes de olho seco tenham participação importante destas espécies reativas. De acordo com BARABINO & DANA (2004), os mecanismos patogênicos de olho seco não estão limitados somente na inflamação lacrimal, mas incluem mecanismos de estimulação neural da secreção lacrimal, defeitos em mecanismos secretórios e defeitos nas glândulas lacrimais sebáceas acessórias. Os vários modelos de insuficiência lacrimal incluem modelos autoimunes mimetizando a SS, com participação de autoanticorpos, modelos de controle mecânico, como a retirada da glândula

lacrimal e modelos de controle neuroendócrino da secreção lacrimal. Já os modelos evaporativos mimetizam os múltiplos fatores ambientais que podem aumentar ou diminuir a evaporação lacrimal. Nenhum modelo consegue simular a complexidade e cronicidade desta patologia e os modelos autoimunes causam um maior processo inflamatório da glândula lacrimal e superfície ocular, com regulação importante do estresse oxidativo na sua patogênese.

Nosso modelo de supressão estrogênica causou diminuição da produção de ON em todos os tecidos, medido indiretamente através do NO_2 e NO_3 . Como o ON atua na superfície ocular e glândula lacrimal como antioxidante e protetor ocular, foi um dos fatores relacionados com o desencadeamento do olho seco neste modelo. Tanto o AGPI n-3 como o ALP exerceram efeito positivo sobre a produção de ON na glândula lacrimal, enquanto somente o ALP teve efeito restaurador na córnea. O papel do ON como regulador do fluxo vascular na glândula lacrimal e como sinalizador via terminações nervosas no controle da produção lacrimal deve ser um importante foco de futuros estudos nesta área.

O aumento das defesas antioxidantes na glândula lacrimal com aumento da atividade da GPx no grupo suplementado com ALP, parece indicar que neste tecido específico o ALP esteja atuando como antioxidante, seja como efeito direto no tecido ou através de mecanismos sinalizadores em função do aumento do estresse oxidativo na superfície ocular. MARCOZZI *et al.* (2003) demonstraram que a atividade de peroxidase no fluido lacrimal, decorrente da síntese proteica pela glândula lacrimal, esta diminuída em mulheres na menopausa com regulação estrogênica, uma vez que a terapia de reposição hormonal aumentou a atividade da peroxidase lacrimal e contribuiu para o alívio efetivo de desconforto ocular na

menopausa. Nosso estudo não verificou influência dos níveis estrogênicos na atividade da GPx, mas a suplementação dietética com ALP causou um aumento significativo da sua atividade, mostrando um efeito direto ou indireto do ALP na secreção proteica lacrimal.

CONCLUSÃO

O modelo animal de olho seco por supressão hormonal demonstrou uma diminuição na produção lacrimal em ratas na estropausa. A suplementação dietética com AGPI n-3 restaurou parcialmente a produção lacrimal enquanto o ALP teve efeito restaurador total. O estresse oxidativo participa da síndrome do olho seco induzido pela estropausa através de ERN e diminuição da produção do ON na córnea, conjuntiva e glândula lacrimal, sendo que ERO não parecem ter participação importante nesta patologia no modelo utilizado. O papel terapêutico dos AGPI n-3 em modelos autoimunes de olho seco com importante componente anti-inflamatório tem mostrado resultados promissores, entretanto o modelo de supressão hormonal que utilizamos envolve mecanismos diferentes na diminuição da produção lacrimal que não foram modificados pelo ômega 3. O ALP, como antioxidante, restaurou os níveis de ON na córnea e glândula lacrimal, especificamente, e aumentou a atividade da GPx na glândula lacrimal onde diminuiu o dano em lipídios. A participação do ON como mensageiro celular e pelo aumento do fluxo sanguíneo lacrimal contribuiu de maneira importante na restauração do olho seco com o uso de ALP. Como atividade pró-oxidante, o ALP causou maior dano proteico, especificamente na córnea, sem efeito na conjuntiva e

glândula lacrimal. Na dosagem em que foi utilizado podemos demonstrar um efeito importante do ALP na restauração do olho seco induzido pela supressão hormonal, sendo sua atuação variável em diferentes tecidos e sistemas biológicos que compreendem a unidade funcional lacrimal.

PERSPECTIVAS

As conclusões deste estudo abrem perspectivas para a condução de outros estudos com relação à síndrome do olho seco. Os achados mostram que o ALP apresenta potencial importante no controle do estresse oxidativo da superfície ocular e na glândula lacrimal, possibilitando que pesquisadores venham a elucidar o seu papel em modelos animais de olho seco e em seres humanos. Investigações futuras podem esclarecer sua função como antioxidante ou pró-oxidante em diferentes tecidos e seu valor na terapêutica do olho seco. Espécies reativas centradas no nitrogênio também devem ser mais bem avaliadas na síndrome do olho seco onde o papel do ON parece ser pouco explorado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKATAY, U. Pro-oxidant actions of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Med Hypotheses*, 66: 110-17, 2006.

AKPINAR, D.; YARGIÇOĞLU, P.; DERIN, N.; ALICIGÜZEL, Y. & AGAR, A. The effect of lipoic acid on antioxidant status and lipids peroxidation in rats exposed to chronic restraint stress. *Physiol Res*, 57: 893-901, 2008.

APPOLINÁRIO, P.; DEROGIS, P.; YAMAGUTI, T. & MIYAMOTO, S. Metabolismo, oxidação e implicações biológicas do ácido docosohexaenoico em doenças neurodegenerativas. *Quim Nova*, 34 (8): 1409-1416, 2011.

ARAGONA, P.; BUCOLO, C.; SPINELLA, R.; GIUFFRIDA, S. & FERRERI, G. Systemic omega-6 essential fatty acid treatment and PGE1 tear content in Sjögren's Syndrome patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46 (12): 4474-4479, 2005.

AZZAROLO, A.; BJERRUM, K.; MAVES, C.; BECKER, L.; WOOD, R.; MIRCHEFF, A. & WARREN, D. Hypophysectomy-induced regression of female rat lacrimal glands: partial restoration and maintenance by dihydrotestosterone and prolactin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36: 216-26, 1995.

AZZAROLO, A.; WOOD, R. L.; MIRCHEFF, A. K.; REICHTTERS, A.; OLSEN, E.; BERKOWITZ, M.; BACHMANN, M.; HUANG, Z. M.; ZOLFAGARI, R. & WARREN, D. W. Androgen influence on lacrimal gland apoptosis, necrosis and lymphocytic infiltration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40 (3): 592-602, 1999.

AZZAROLO, A.; EIHAUSEN, H. & SCHECHTER, J. Estrogen prevention of lacrimal gland cell death and lymphocytic infiltration. *Exp Eye Res*, 77 (3): 347-354, 2003.

BARABINO, S. & DANA, R. Animal models of dry eye: a critical assessment of opportunities and limitations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45 (6): 1641-46, 2004.

BARABINO, S.; CHEN, Y.; CHAUHAN S. & DANA R. Ocular surface immunity: Homeostatic mechanisms and their disruption in dry eye disease. *Prog Retin Eye Res*, 31: 271-85, 2012.

BARABINO, S.; ROLANSO, M.; CAMICIONE, P.; RAVERA, G.; ZANARDI, S.; GIUFFRIDA, S. & CALABRIA, G. Systemic linoleic and gamma-linolenic acid therapy in dry eye syndrome with an inflammatory component. *Cornea*, 22 (2): 97-101, 2003.

BARP. J.; ARAÚJO, A. S. R.; FERNANDES, T. R. G.; RIGATTO, K. V.; LLESUY, S.; BELLÓ-KLEYN, A. & SINGAL, P. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Braz Med Biol Res*, 35 (9): 1075-81, 2002.

BATISTA, T.; TOMIYOSHI, L.; DIAS, A.; ROMA, L.; MÓDULO, C.; MALKI, L.; FILHO, E.; DEMINICE, R.; JORDÃO Jr., A.; CUNHA, D. & ROCHA, E. Age-dependent changes in rat lacrimal gland antioxidant and vesicular related protein expression profiles. *Mol Vis*, 18: 194-202, 2012.

BEHR, G.; SCHNORR, C. & MOREIRA J. Increased blood oxidative stress in experimental menopause rat model: the effects of vitamin A low dose supplementation upon antioxidant status in bilateral ovariectomized rats. *Fund Clin Pharmacol*, 26: 235-49, 2012.

BEAUREGARD, C. & BRANDT, P. C. Down regulation of interleukin-1B-induced nitric oxide production in lacrimal gland acinar cells by sex steroids. *Curr Eye Res*, 29 (1): 59-66, 2004.

BLACK, A. T.; GORDON, M. K.; HECK, D. E.; GALLO, M. A.; LASKIN, D. L.; LASKIN, J. D. UVB light regulates expression of antioxidants and inflammatory mediators in human corneal epithelial cells. *Biochem Pharmacol*, 81: 873-880, 2011.

BONAZZI, A.; MASTYUGIN, V.; MIEYAL, P. A.; DUNN, M. V. & LANIADO-SCHWARTZMAN, M. Regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia and peroxisome proliferators in the corneal epithelium. *J Biol Chem*, 275 (4): 2837-2844, 2000.

BRIGNOLE, F.; AUZERIE, O. & BAUDOUIN, C. Apoptose et surfasse oculaire. *J Fr Ophth*, 26 (3): 299-306, 2003.

CALDER, P. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids*, 36 (9): 1007-24, 2001.

CALDER, P. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*, 83: 1505S-19S, 2006.

CEJKOVÁ, J.; ARDAN, T.; SIMONOVÁ, Z.; CEJKA, C.; MALEC, J.; JIRSOVÁ, K.; FILIPEC, M.; DOTRELOVÁ, D. & BRUNOVÁ, B. Nitric oxide synthase induction and cytotoxic nitrogen-related oxidant formation in conjunctival epithelium of dry eye (Sjögren's syndrome). *Nato Sci S A Lif Sci*, 17: 10-17, 2007.

CHIOI, G. C. Y. Review: effects of nitric oxide on eye diseases and their treatment. *J Ocul Pharm Th*, 17: 189-198, 2001.

CHONG, E. M.; HARISSI-DAUGHER, M. & DANA R. Wetting of ocular surface and dry eye disorders. In: Albert, D. M. & Miller, J. W. (eds). Principles and practice of ophthalmology. 3^a ed, Saunders Elsevier, USA, 2008.

COTRAN, R., KUMAR, V. & ROBBINS, S. Patologia estrutural e funcional. 5^a ed. Guanabara Koogan, 1996

CREMER, D.; RABELER, R., ROBERTS, A. & LYNCH, B. Long-term safety of alpha-lipoic acid (ALA) consumption: a 2-year study. *Reg Toxicol Pharm*, 46: 193-201, 2006.

CREMER, D.; RABELER, R.; ROBERTS, A. & LYNCH, B. Safety evaluation of alpha-lipoic acid (ALA). *Reg Toxicol Pharm*, 46: 29-41, 2006.

DARTT, D. Neural regulation of lacrimal gland secretory processes: relevance in dry eye diseases. *Prog Retinal Eye Res*, 28: 155-177, 2009.

DEBBASCH, C.; PISELLA, P.J.; JEAN, M. D. S.; RAT, P.; WARNET, J-M. & BAUDOUIIN, C. Mitochondrial activity and glutathione injury in apoptosis induced by unpreserved and preserved B-blockers on changed conjunctival cells. *Inv Ophth Vis Sci*, 42 (11): 2525-2533, 2001.

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.

EDWARDS, B. & LI, J. Endocrinology of menopause. *Periodontology*, 2000, 61:177-94, 2013.

FONSECA, E. C.; ARRUDA, G. V. & ROCHA, E. M. Olho seco: etiopatogenia e tratamento. *Arq Bras Oftal*, 73 (2): 197-203, 2010.

GRUBER, C. J.; TSCHUGGUEL, W.; SCHNEEBERGER, C. & HUBER, J. C. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*, 345: 340-352, 2002.

GRAZIOLA, F.; SOLIS, V. & CURI, R. Estrutura química e classificação dos ácidos graxos. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. & PROCÓPIO, J. Entendendo a gordura – Os ácidos graxos. Manole, São Paulo, 5-25: 2002.

GUMUS, K. & CAVANAGH, D. H. The role of inflammation and antiinflammation therapies in keratoconjunctivitis sicca. *Clinical Ophthalmology*, 3: 57-67, 2009.

GUYTON, A. & HALL, J. Tratado de Fisiologia Médica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 9ª ed., 781-788:1996.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. 4ª ed. Oxford University Press, 2007.

HERNÁNDEZ, I.; DELGADO, J. L.; DÍAZ, J.; QUESADA, T.; TERUEL, M. J. G.; LLANOS, M. C. & CARBONELL, L. F. 17 β -Estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol – Reg I*, 279: R1599-R1605, 2000.

HIGUCHI, A.; TAKAHASHI, K.; HIRASHIMA, M.; KAWAKITA, T. & TSUBOTA, K. Selenoprotein P controls oxidative stress in cornea. *Plos*, 5 (3): e9911, 2010.

JULIO, G.; LIUCH, S.; PUJOL, P. & MERINDANO, M. Effects of tear hyperosmolarity on conjunctival cells in mild to moderate dry eye. *Ophthal Physiol Opt*, 32: 317-23, 2012.

KIREEV, R.; TRESGUERRES, A.; GARCIA, C.; BORRAS, C.; ARIZNAVARRETA, C.; VARA, E.; VINA, J. & TRESGUERRES, J. Hormonal regulation of pro-inflammatory and lipid peroxidation processes in liver of old ovariectomized female rats. *Biogerontology*, 11: 229-43, 2010.

KOHLI, P. & LEVY, B. D. Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *Br J Pharmacol*, 158: 960-971, 2009.

KRABBE, K.; PEDERSEN, M. & BRUUNSGAARD, H. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp. Gerontol*, 39 (5): 687-99, 2004.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E. & GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 7: 156-167, 2008.

LUSHCHAK, V & SEMCHYSHYN, H. Oxidative Stress – Molecular mechanisms and biological effects. Intech, 2012.

LUI, J. The effects and mechanisms of mitochondrial nutrient alpha-lipoic acid on improving age-associated mitochondrial and cognitive dysfunction: an overview. *Neurochem Res*, 33: 194-203, 2008.

MACSAI, M.S. The role of omega-3 dietary supplementation in blepharitis and meibomian gland dysfunction (an aos thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc*, 106: 336-356, 2008.

MARCONDES, F.; BIANCHI, F. & TANNO, A. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*, 62 (4A): 609-14, 2002.

MARCOZZI, G.; LIBERATI, V.; MADIA, F.; PIZZINGA, A. & FEO, G. Effect of hormone replacement therapy on lacrimal fluid peroxidase activity in woman. *Maturitas*, 45: 225-29, 2003.

MARTINS, M.; SUAIDEN, A.; PIOTTO, R. & BARBOSA, M. Propriedades dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 obtidos de óleo de peixe e óleo de linhaça. *Ver Inst Ciênc Saúde*, 26 (2): 153-6, 2008.

MICHEL, T. & FERON, O. Perspective series: Nitric oxide and nitric oxide synthases. Nitric Oxide synthases: which, where, how and why? *Am Soc Clin Invest*, 100 (9): 2136-52, 1997.

MILDER, B. Aparato lacrimal. In: Moses, R. A. Adler's Fisiologia do Olho – Aplicação Clínica. Panamericana, São Paulo, p 26-43, 1980.

MILJANOVIĆ, B.; TRIVEDI, K.; DANA, R.; GILBARD, J.; BURING, J. & SCHAUMBERG, D. Relation between dietary n-3 and n-6 fatty acids and clinically diagnosed dry eye syndrome in women. *Am J Clin Nutr*, 82: 887-93, 2005

MOINI, H.; PACKER, L. & SARIS, N. Antioxidant and pro-oxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharm*, 182: 84-90, 2002.

MUTHUSAMI, S.; RAMACHANDAM, I.; MUTHUSAMY, B.; VASUDEVAN, G.; PRABHU, V.; SUBRAMANIAM, V.; JAGADEESAN, A. & NARASIMHAN, S. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adults rats. *Clin Chim Acta*, 360 (1-2): 81-6, 2005.

NAKAMURA, S.; SHIBUYA, M.; NAKASHIMA, H.; HISAMURA, R.; MASUDA, N.; IMAGAWA, T.; UEHARA, M. & TSUBOTA, K. Involvement of oxidative stress on corneal epithelial alterations in a blink-suppressed dry eye. *Invest Ophth Vis Sci*, 48 (4): 1552-1558, 2007.

NAKAMURA, S.; KINOSHITA, S.; YOKOI, N.; OGAWA, Y.; SHIBUYA, M.; NAKASHIMA, H.; HISAMURA, R.; IMADA, T.; IMAGAWA, T.; UEHARA, M.; SHIBUYA, I.; DOGRU, M.; WARD, S. & TSUBOTA, K. Lacrimal hypofunction as a new mechanism of dry eye in visual display terminal users. *Plos*, 5(6): e11119, 2010.

NICHOLS, K. K.; FOULKS, G. N.; BRON, A. J.; GLASGOW, B. J.; DOGRU, M.; TSUBOTA, K.; LEMP, M. & SULLIVAN, D. A. The international workshop on

meibomian gland dysfunction: executive summary. *Invest Ophth Vis Sci*, 52 (4): 1922-1929, 2011.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*, 49: 503-515, 2010.

PACKER, L.; KRAEMER, K. & RIMBACH, G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, 17(10): 888-95, 2001.

PALANIAPPAN, A. & DAI, A. Mitochondrial ageing and the beneficial role of alpha-lipoic acid. *Neurochem Res*, 32: 1552-58, 2007.

PARKS, K. S.; LIM, J. W. & KIM, H. Inhibitory mechanism of omega-3 fatty acids in pancreatic inflammation and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1171: 421-427, 2009.

PFLUGFELDER, S. Differential diagnosis of dry eye conditions. *Adv Dent Res*, 10 (1): 9-12, 1996.

PINNA, A.; PICCININI, P. & CARTA, F. Effect of oral linoleic and gamma-linolenic acid on meibomian gland dysfunction. *Cornea*, 26 (3): 260-4, 2007.

POMPÉIA, C.; LOPES, L. R.; MIYASAKA, C. K.; PROCÓPIO, J.; SANOMLYA, P. & CURTI, R. Effect of fatty acids on leukocyte function. *Braz J Med Biol Res*, 33: 1255-1268, 2000.

ROCHA, E. M.; CARVALHO, C. R. O.; SAAD, M. J. A. & VELLOSO, L. A. The influence of ageing on the insulin signaling system in rat lacrimal and salivary glands. *Acta Ophthalmol Scand*, 81: 639-645, 2003.

ROCHA, E. M.; ALVES, M.; RIOS, J. & DARTT, A. The aging lacrimal gland: changes in structure and function. *Ocul Surf*, 6 (4): 162-74, 2008.

SARIRI, R. & GHAFOORI, H. Tear proteins in health, disease, and contact lens wear. *Biochemistry*, 73: 381-392, 2008.

SACKHEIM, G. & LEHMAN, D. D. Química e bioquímica para ciências biomédicas. 8ª ed., Manole, São Paulo, 367-378: 2001.

SCHECHTER, J.; WARREN, D. & MIRCHEFF, A. A lacrimal gland is a lacrimal gland, but rats are not human. *Ocul Surf*, 8 (3): 111-34, 2010.

SERHAN, C. N. & CHIANG, N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *Br J Pharmacol*, 153: S200-S215, 2008.

SHOHAM, A.; HADZIAHMETOVIC, M.; DUNAIEF, J.; MYDLARSKI, M. & SHIPPER, H. Oxidative stress in diseases of the human cornea. *Free Radic Biol Med*, 45: 1047-55, 2008.

SIMOPOULUS, A. P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am College Nutr*, 21 (6): 495-505, 2002.

SIMOPOULUS, A. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med*, 233: 674-88, 2008.

SITES, C.; TOTH, M.; CUSHMAN, M.; L'HOMMEDIEU, G.; TCHERNOF, A.; TRACY, R. & POENHJMAN, E. Menopause-related differences in inflammation markers and their relationship to bod fat distribution and insulin-stimulated glucose disposal. *Fertil Steril*, 77 (1): 128-35, 2002.

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.

SULLIVAN, D. A.; BLOCK, L. & PENA, J. D. O. Influence of androgens and pituitary hormones on the structural profiles and secretory activity of the lacrimal gland. *Acta Ophthalmol Scand*, 74: 421-35, 1996.

TORTORA, G. & GRABOWSKI, S. R. Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia. Artmed, Porto Alegre, 33-36: 2006.

UCHINO, Y.; KAWAKITA, T.; MIYAZAWA, M.; ISHII, T.; ONOUCHI, H.; YASEDA, K.; OOGAWA, Y.; SHIMMURA, S.; ISHII, N. & TSUBOTA, K. Oxidative stress induced inflammation initiates functional decline of tear production. *Plos*, 7 (10): e45805, 2012

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S. & KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova*, 30 (5): 1323-1338, 2007.

VIAU, S.; MAIRE, M.; PASQUIS, B.; GRÉGOIRE, S.; ACAR, N.; BRON, A.; BRETILON, L.; CREUZOT-GARCHER, C. & JOFFRE, C. Efficacy of a 2-month dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids in dry eye induced by scopolamine in a rat model. *Graef Arch Clin Exp*, 247:1039–50, 2009.

VIAU, S.; PASQUIS, B.; MAIRE, M.; FOURGEUX, C.; GRÉGOIRE, S.; ACAR, N.; BRETILON, L.; CREUZOT-GARCHER, C. & JOFFRE, C. No consequences of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency on the severity of scopolamine-induced dry eye. *Graef Arch Clin Exp*, 249: 547-57, 2011.

ZOUKHRI, D. Effect of inflammation on lacrimal gland function. *Exp Eye Res*, 82 (5): 885-898, 2006.

WAKAMATSU, T.; DOGRU, M.; MATSUMOTO, Y.; KOJIMA, T.; IBRAHIM, O.; SATO, E.; IGARASHI, A.; ICHIHASHI, Y.; SHIMAZAKI, J. & TSUBOTA, K. Evaluation of lipid oxidative stress status in Sjögren syndrome patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54: 201-10, 2013.

WATHES, 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 B*, 77: 190-201, 2007.

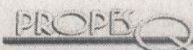
WOJTOWICZ, W.; BUTOVICH, I, UCHIYAMA, E.; ARONOWICZ, J.; AGEE, S. & MCCULLEY, J. Pilot, prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical trial of an omega-3 supplement for dry eye. *Cornea*, 00 (0): 1-7, 2010.

ANEXOS

UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais

**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 20137

Título: Avaliação do estresse oxidativo em modelo experimental de olho seco e a resposta ao uso de antioxidantes ômega-3 e ácido lipóico

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MARA DA SILVEIRA BENFATO - coordenador desde 01/03/2011

Equipe Externa:

Alexey Santos de Andrade - Colaborador desde 01/03/2011

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, ad referendum, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Terça-Feira, 26 de Julho de 2011

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética



Laboratório de Nutrição Laudo de Análises

Cliente : Nuvital Nutrientes S/A Solicitante : DEPARTAMENTO TECNICO Cidade : Colombo Estado : PR Fone / Fax : (41) 2169-3150 Produção : Coleja : 22/07/2011 Lote : 0022071101 AO 30	Amostra : 9911070366 Item : Nuvilab CR-1 - 100110002/2 Fornecedor : Nuvital Nutrientes S/A. Controle : Produtor : Recepção : 22/07/2011 Liberação : 28/07/2011
--	---

Análise	Unidade	Valor
Umidade	%	11,74
Proteína Bruta	%	23,70
Extrato Etéreo	%	4,01
Fibra Bruta	%	4,59
Resíduo Mineral	%	7,71
Fósforo	%	0,76
Cálcio	%	1,24

Comentários

Cliente
Laboratório
 Depto. Técnico

O RESULTADO TEM SEU VALOR RESTRITO À AMOSTRA ANALISADA

Suzane Maria Spiel - CRQ 09403009 - 9ª Região

Estrada da Ribeira, 3.001 Km 03

83408 - 000 Colombo - PR fone/fax (0xx41) 2169-3100

www.nuvital.com.br

09/09/20

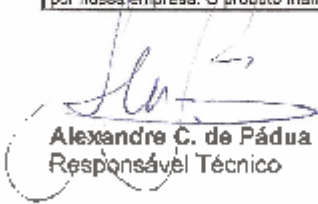
CERTIFICADO DE ANÁLISE

Produto:	ÓLEO DE PEIXE OMEGA-3
Lote n°:	PO9037701
Data de Fab.:	JUL/2009
Data de Val.:	JUL/2012

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO
1. Aspecto Físico		
1.1. Descrição	• Líquido Oleoso	DE ACORDO
1.2. Odor	• Característico	DE ACORDO
2. Parâmetros		
2.1. Teor de Peróxidos	• $\leq 5,0$ meq O ₂ /Kg	3,2 meq O ₂ /Kg
2.2. Ácidos Graxos Livres	• $< 0,5\%$	0,07%
2.3. Vitamina E	• $> 2,0$ U.I./g	3,2 U.I./g
3. Teor de Ácidos Graxos tipo Omega-3		
3.1. Ácido Docosahexaenóico (DHA)	• Mínimo 12%	12,6%
3.2. Ácido Eicosapentaenóico (EPA)	• Mínimo 18%	19,7%

LAUDO: APROVADO

As informações contidas neste certificado de análise são corretas e de boa fé, não devem ser consideradas como uma garantia, nem como certificado para isenção de qualquer responsabilidade legal de uso indevido ou manuseio incorreto do produto. Os resultados indicados foram obtidos na análise de amostra representativa e/ou certificado do fornecedor, reflores por nossa empresa. O produto mantém suas características de análise desde que manuseado e armazenado corretamente.



Alexandre C. de Pádua
Responsável Técnico

Dr. Alexandre C. de Pádua
Farmacêutico - Bioquímico
CRF-SP 21716



CERTIFICADO DE ANÁLISE

INSUMO: ACIDO ALFA LIPOICO		Pág 1	
ORIGEM/PROCEDÊNCIA:	CHINA/CHINA	DATA DE ANÁLISE:	05/07/2011
LOTE PHARMA NOSTRA:	11062051C	LOTE FABRICANTE:	110106
DATA DE FABRICAÇÃO:	Janeiro/2011	DATA DE VALIDADE:	Janeiro/2013
CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM: TEMPERATURA ABAIXO DE 30°C			
OBS 1: FM: C ₈ H ₁₄ O ₂ S ₂			
OBS 2: PM: 206,32			
OBS 3: CAS: 1077-28-7			
DATA DE EMISSÃO:	14/09/2011	NF:	3-156.330
ORDEM FRACIONAMENTO:		2872-11	

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS	REFERÊNCIAS
Identificação	HPLC	Positivo	USP - 33
Perda por Dessecação*	≤ 0,2% (3 horas / 40°C à vácuo)	0,15%	USP - 33
Ponto de Fusão*	60,0°C - 62,0°C	61,6°C	USP - 33
Rotação Específica*	-1,0º a +1,0º	+0,10º	USP - 33
Metais Pesados*	≤ 0,001%	< 0,001%	USP - 33
Resíduo por Ignição*	≤ 0,10%	0,03%	USP - 33
Teor (Base Anidra)	99,0% - 101,0%	99,66%	USP - 33
TESTES ADICIONAIS			
Descrição*	Pó cristalino levemente amarelo com odor característico	Pó cristalino levemente amarelo com odor característico	Fabricante
Densidade Aparente*	Informativo (Sem compactação)	0,26 g/mL	Met.Geral FB IV

*Resultados obtidos em análise realizada no Laboratório de Controle de Qualidade Pharma Nostra (UNIDADE ANÁPOLIS). E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

LEGENDA DAS REFERÊNCIAS: FB (Farmacopeia Brasileira) / USP (United States Pharmacopoeia) / EP (European Pharmacopoeia) / BP (British Pharmacopoeia) / JP (Japanese Pharmacopoeia) / MG (Método Geral farmacopeico) / Fabricante (especificação e metodologia conforme o fabricante do insumo) / Informativo (resultado fornecido como informativo pelo LCO Pharma Nostra).

MFC
/

CONCLUSÃO: (X) Aprovado () Reprovado

D Rocha
Responsável pelo Lab. Controle de Qualidade
Danielle Rocha Barbosa - CRF-GO Nº 7003

AG
Responsável Técnico
Amin Gabriel Gebrim - CRF-GO Nº 1829

Alexey Santos de Andrade

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Alexey Santos de Andrade
Filiação Sérgio Roberto Keller de Andrade e Yara Santos de Andrade
Nascimento 13/07/1973 - Porto Alegre/RS - Brasil
Carteira de Identidade 4012746485 SSP/RS - 06/12/1996
CPF 646.022.810.87

Endereço residencial Rua Sete de Setembro, 2083
Zona Nova - Tramandaí
95590-000, RS - Brasil
Telefone: 051 36845197
Celular: 051 92120580

Endereço profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de
Biociências
Av. Bento Gonçalves, 9500
Agronomia - Porto Alegre
91501-970 RS - Brasil
Telefone: 51 33087372

Endereço eletrônico

E-mail: oftalmologia@centrodebemestarfusion.com.br

Formação acadêmica/titulação

2011 - 2013 Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre,

Brasil

Título: Avaliação do estresse oxidativo em modelo animal de olho seco e a resposta ao uso de antioxidantes ômega 3 e ácido lipóico

Orientador: Mara Silveira Benfato

- 1997 - 2000** Residência Médica em Oftalmologia
Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, PR, Brasil
- 1991 – 1997** Graduação em Medicina
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Formação complementar

- 1997 – 1997** Estágio no Serviço de Oftalmologia Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, PR, Brasil, 120h.
- 1997 – 1997** Estágio no Serviço de Oftalmologia do Hospital Regional de São José, SC, Brasil, 120 h.
- 1995 – 1996** Estágio no Serviço de Oftalmologia da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, RS, Brasil, 225 h.
- 1995 – 1995** Monitor da Disciplina de Farmacologia Básica e Clínica do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brasil.
- 1994 – 1996** Estágio de pesquisa na Disciplina de Farmacologia Básica e Clínica do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brasil.
- 1994 – 1995** Estágio no Serviço de Informações Sobre Substâncias Psicoativas (SISP) junto à Disciplina de Farmacologia e Toxicologia na UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brasil.

Atuação profissional

1. Consultório Particular

Vínculo institucional

2000 - atualmente Vínculo: Autônomo, Enquadramento funcional: Oftalmologista, Carga horária: Autônomo, Regime: Integral

2. Hospital Universitário Evangélico de Curitiba - HUEC

Vínculo institucional

1997-2000 Vínculo: Residência Médica, Enquadramento funcional: Bolsista, Carga horária: 40 h, Regime: Integral

3. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Vínculo institucional

1994-1995 Vínculo: Bolsa, Enquadramento funcional: Bolsista, Carga horária: 20 h, Regime: Parcial

Áreas de atuação

1. Medicina
2. Oftalmologia
3. Biologia Molecular

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente,

Lê Bem

Espanhol Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente,
Lê Bem

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

ANDRADE, A. S.; BISNETO, O. S.; MOREIRA, H. & MOREIRA, C. A. Traumas oculopalpebrais no serviço de pronto-atendimento do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia (Impresso)*, 62, p. 585-589, 1999.

ZIMMER, L. P.; SILVA, A. P.; ANDRADE, A. S.; DILLENBURG, R. F.; MENDONCA, E. & ZIELINSKY, P. Intrauterine and perinatal management of complete atrioventricular block in the fetus. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia (Impresso)*, 67, p. 11-5, 1996.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. ANDRADE, A. S.; BEHLING, D. S.; PUTTI, J. S.; SALOMON, T. B. & BENFATO, M. S. Avaliação da produção lacrimal e superfície ocular em ratas submetidas à ovariectomia e a resposta ao uso de antioxidantes. In: XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, Porto Alegre, p. 03-03, 2012.

2. ANDRADE, A. S.; BEHLING, D. S.; PUTTI, J. S.; SALOMON, T. B. & BENFATO, M. S. Projeto de mestrado: avaliação do estresse oxidativo em modelo

experimental de olho seco e a resposta ao uso de antioxidantes ômega 3 e ácido lipóico. In: XIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, Porto Alegre, p. 04-04, 2011.

3. ZIMMER, L. P.; MANZONI, A. P. D. S.; ANDRADE, A.; DILLENBURG, R. F.; MENDONÇA, E. & ZIELINSKY, P. Bloqueio atrioventricular total no feto: manejo Intra-uterino e perinatal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CARDIOLOGIA, 1995, São Paulo. CONGRESSO BRASILEIRO DE CARDIOLOGIA, Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 65, p. 64-64, 1995.

4. MANZONI, A. P. D. S.; ZIMMER, L. P.; ZIELINSKY, P. & ANDRADE, A. Perinatal outcome of fetal complete atrioventricular block. In: Obstetrics and Gynecology Congress, 1995, New York. Obstetrics and Gynecology Congress, 1995.

5. 1.

5. ANDRADE, A. S. Diagnóstico e tratamento do bloqueio atrioventricular completo fetal: experiência da unidade de cardiologia fetal do Instituto de Cardiologia do RS. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE DE CARDIOLOGIA DO RIO GRANDE DO SUL, 1995, Porto Alegre. VI CONGRESSO DA SOCIEDADE DE CARDIOLOGIA DO RIO GRANDE DO SUL, 1995.

Apresentação de trabalho e palestra

1. Apresentador tema livre Toxoplasmose Ocular: Revisão de 74 Pacientes durante o XXIV Simpósio da Associação Paranaense de Oftalmologia, Curitiba, Paraná, 1999.

2. Apresentador tema livre Traumas Oculopalpebrais no Serviço de Pronto-Atendimento Oftalmológico do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba durante o XXX Congresso Brasileiro de Oftalmologia, Recife, Pernambuco, 1999.

3. Apresentador tema livre Toxoplasmose Ocular: Revisão de 74 Pacientes durante o XXX Congresso Brasileiro de Oftalmologia, Recife, Pernambuco, 1999.

4. Apresentador do pôster Proptose Unilateral Pós-Trauma durante o XXX Congresso Brasileiro de Oftalmologia, Recife, Pernambuco, 1999.
5. Apresentador do pôster Coloboma de Papila Bilateral – Relato de Caso durante o XXX Congresso Brasileiro de Oftalmologia, Recife, Pernambuco, 1999.
6. Apresentador do pôster Campanha da Catarata no Serviço de Oftalmologia do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba durante o XXX Congresso Brasileiro de Oftalmologia, Recife, Pernambuco, 1999.
7. Apresentador tema livre Aspectos Epidemiológicos dos Traumas Oculopalpebrais no Serviço de Pronto-Atendimento Oftalmológico do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba durante o XXIII Simpósio da Associação Paranaense de Oftalmologia, Curitiba, Paraná, 1998.

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. XIX Congresso Brasileiro de Prevenção da Cegueira e Reabilitação Visual em Salvador, Bahia, 2010 (Congresso).
2. XXXV Congresso da Associação Paranaense de Oftalmologia, Curitiba, Paraná, 2010 (Congresso).
3. XXX Congresso Brasileiro de Oftalmologia em Recife, Pernambuco, 1999 (Congresso).
4. Annual Meeting of American Academy of Ophthalmology, Orlando, USA, 1999 (Congresso).

5. Annual Meeting of American Academy of Ophthalmology, New Orleans, USA, 1998 (Congresso).