

Jordana Salete Putti ^a, Mara S. Benfato ^a

^a Laboratório de Estresse Oxidativo, Departamento de Biofísica, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Introdução

O filme lacrimal é um dos principais mecanismos de proteção da superfície ocular contra agentes externos nocivos e a quebra do seu equilíbrio pode levar à síndrome do olho seco, causando desde desconforto ocular leve até sequelas cicatríciais da superfície ocular com danos irreversíveis à visão¹. A produção da lágrima pelas glândulas lacrimais principal e acessórias está intimamente relacionada a fatores neuroendócrinos como os hormônios sexuais e parece que espécies reativas de oxigênio e nitrogênio desempenham um papel importante na sua regulação^{2,3}. Estudos mostram que tanto o uso tópico como sistêmico de ácidos graxos de cadeia longa ômega-3 têm contribuído para o controle do estresse oxidativo na glândula lacrimal e superfície ocular melhorado os sintomas clínicos de pacientes que sofrem de olho seco⁴. Outro componente endógeno, o ácido alfa-lipóico, está presente em tecidos humanos em pequenas quantidades e possui efeitos biológicos como quelação de EROs interação e regeneração de outros antioxidantes como a vitamina C.

Objetivos e Métodos

Avaliar o estresse oxidativo na glândula lacrimal de ratas Wistar submetidas à ovariectomia como modelo proposto de olho seco e a resposta deste tecido ao tratamento com diferentes substâncias antioxidantes. Avaliar as respostas do estresse oxidativo na glândula lacrimal quando os animais forem tratados com ácidos graxos ômega-3 EPA (ácido eicosapentaenoico), DHA (ácido docosaexaenoico) e ácido lipóico.

Ensaio

Aconitase	Formação de isocitrato, por espectrofotometria
Carbonil	Reação com DTNB por espectrofotometria
Nitrito e Nitrato	Reação de Griess por espectrofotometria
Glutaciona total	Formação do DTNB c/ NADPH espectrofotometria
Superóxido dismutase (SOD)	Kit comercial
Glutaciona peroxidase (GPx)	Kit comercial

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

O exame de microscopia eletrônica do epitélio corneano foi realizado em um olho de um animal de cada grupo através do microscópio de varredura JEOL JSM 5800 do Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

Delineamento

Animais

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

Referências:

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

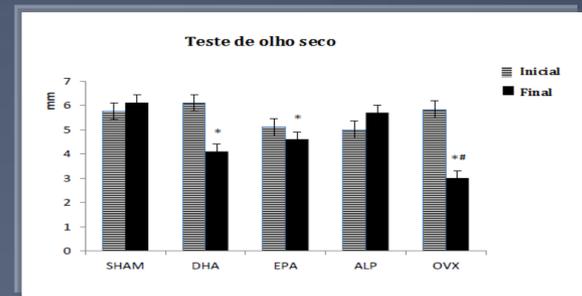
Resultados

Ensaio

	Sham	DHA	EPA	Ác. Lip.	OVX
SOD (U/mg proteína)	71.08 ± 5.12	72.89 ± 5.69	86.29 ± 7.44	63.91 ± 6.02	60.71 ± 5.29
GPX (U/mg proteína)	5314.38 ± 2578.18	5506.21 ± 2100.21	2723.61 ± 1331.02	9327.54 ± 4239.20 *	5012.78 ± 2310.13
Glutaciona total (µmol/mg proteína)	10139.56 ± 3928.45	6008.40 ± 852.15	6884.40 ± 852.15	1469.46 ± 455.83	6749.87 ± 1061.00
Carbonil (nmol/mg proteína)	0.03 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00
ACO (U/g proteína)	231.77 ± 52.83	188.55 ± 14.47	242.94 ± 19.17	225.21 ± 27.24	199.52 ± 25.11
Nitritos e nitratos (nmol/mg proteína)	5.55 ± 3.06	4.39 ± 1.57	3.34 ± 2.03	4.03 ± 2.50	1.98 ± 0.65 *

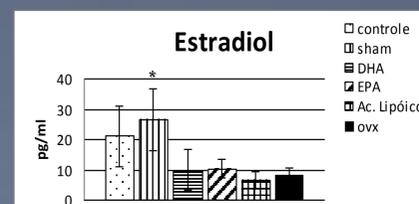
Tabela 1 - Os dados foram exibidos em média ± desvio padrão. A significância foi determinada utilizando-se ANOVA de uma via com *post hoc* de Tukey onde $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. * indica que o grupo apresenta diferença estatisticamente significativa com relação aos demais grupos.

Teste de Schirmer para olho seco

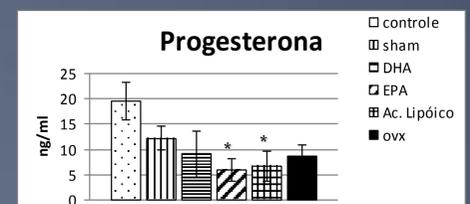


Resultados expressos em média ± desvio padrão. Significância determinada por ANOVA de medidas repetidas onde $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. * indica diferença estatística com relação ao grupo Sham. # indica diferença estatística no mesmo grupo no início e final do estudo.

Dosagem hormonal

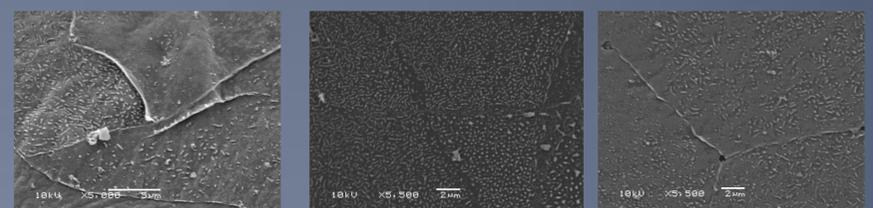


*diferença estatisticamente significativa com $p \leq 0,05$



*diferença estatisticamente significativa com $p \leq 0,05$

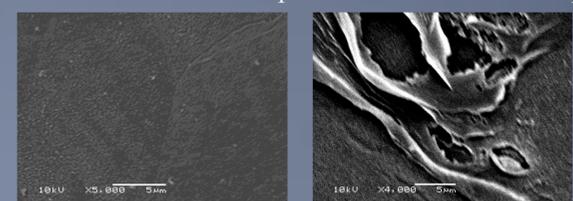
Microscopia eletrônica de varredura do epitélio corneano



Grupo sham

Grupo DHA

Grupo EPA



Grupo Ác. lipóico

Grupo ovx

Grupo ovx mostrando perda das características celulares com desorganização estrutural enquanto grupo tratados mostraram junção celular intacta e preservação de microvilos

Conclusão

De acordo com nossos achados, o estresse oxidativo na glândula lacrimal não tem um papel importante no desenvolvimento do olho seco através de EROs, mas o ácido lipóico altera o metabolismo de ERNs na superfície ocular possivelmente ocasionando um aumento na atividade da peroxidase lacrimal e melhora da produção de lágrima com recuperação no teste de Schirmer.