

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TATIANA CHARELLO BANNACH

**EFEITO DE DIFERENTES FORMAS DE SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA E DA
ANESTESIA PERIBULBAR SOBRE A FUNÇÃO DA RETINA**

CURITIBA

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**EFEITO DE DIFERENTES FORMAS DE SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA E DA
ANESTESIA PERIBULBAR SOBRE A FUNÇÃO DA RETINA**

CURITIBA

2011

TATIANA CHARELLO BANNACH

**EFEITO DE DIFERENTES FORMAS DE SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA E DA
ANESTESIA PERIBULBAR SOBRE A FUNÇÃO DA RETINA**

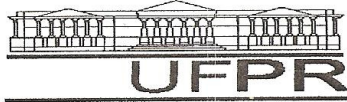
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Paraná para obtenção de título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Montiani-Ferreira

CURITIBA

2011

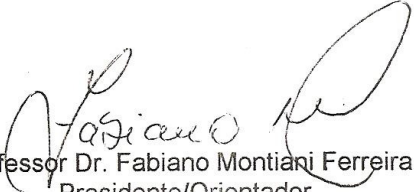
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS




PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “EFEITO DE DIFERENTES FORMAS DE SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA E DA ANESTESIA PERIBULBAR SOBRE A FUNÇÃO DA RETINA” apresentada pela Mestranda **TATIANA CHARELLO** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata*apta*..... para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 28 de fevereiro de 2011


Professor Dr. Fabiano Montiani Ferreira
Presidente/Orientador


Dra. Heloisa Helena Abil Russ Giacometti
Membro


Professor Dr. Ivan Roque de Barros Filho
Membro

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Fabiano Montiani-Ferreira, por aceitar me orientar e também pelo apoio e ajuda. Levo comigo seu exemplo de como ser um professor.

Um agradecimento especial a amiga Marianna Bacellar, por sua imensa ajuda neste trabalho. Com certeza sem você teria sido bem mais difícil. Desejo tudo de melhor para você.

Ao Canil Central de PMPR de Curitiba, em especial ao Comandante 1º Tenente QOPM Willians Taurino Moreira, por toda ajuda para que este trabalho pudesse ser realizado.

Também aos médicos veterinários Lilian Bevilacqua, Bruno Q. Castilho e Marília O. Koch pela colaboração durante os experimentos.

A todos aqueles que estiveram presentes na minha vida nesses dois anos e que contribuíram de alguma forma na concretização deste trabalho.

A minha família: obrigado por vocês existirem. Obrigado por depositarem em mim a confiança para todas as horas. Sei que vocês se orgulham por eu ter atingido uma etapa que nenhum outro de nós tinha atingido antes

Ao meu marido Eduardo, por sempre ter me apoiado e, o melhor de tudo, por sempre ter me cobrado para que eu continuasse e concluísse mais esta etapa de nossas vidas que vamos construindo juntos. Te Amo.

Obrigada, de coração, a todos

RESUMO

A eletrorretinografia (ERG) é um exame oftálmico que permite a captação da atividade eletrofisiológica da retina em resposta a um estímulo luminoso e, portanto é uma ferramenta útil para avaliar o fenômeno da fototransdução no olho. Trata-se de um procedimento seguro uma vez que não é invasivo, mesmo quando necessita de anestesia, como ocorre no caso de sua utilização em animais de companhia. Dois capítulos desta dissertação envolvem estudos experimentais utilizando o exame eletrorretinográfico em pequenos animais. No primeiro artigo, são feitas comparações nas respostas eletrorretinográficas antes e após o bloqueio peribulbar com lidocaína 2%, em cães. O segundo artigo faz um estudo sobre a resposta da retina frente à suplementação dietética com uma alga (*Chlorella pyrenoidosa*) rica em clorofila em cães. No terceiro artigo o uso da luteína é abordado como forma de prevenção e tratamento da degeneração macular relacionada à idade (DMRI) e catarata nuclear senil em pessoas e critica as afirmações de que a suplementação com luteína pode fazer o mesmo em pequenos animais.

Palavras-chave: eletrorretinografia, luteína, clorofila, bloqueio peribulbar

Abstract

The electroretinogram (ERG) is an ophthalmic ancillary exam, which measures the response of the retina when stimulated by light. It is a very useful tool to evaluate the phototransduction in the eye. The ERG is a safe and not invasive clinical procedure, even when anesthesia is necessary. Two chapters of this work involve experimental studies with ERG in dogs. In the first article, comparisons in the ERG answers are made before and after the peribulbar block with lidocaine 2%.The second article makes a study on the retina retinal function after dietary supplementation a chlorophyll-rich algae (*Chlorella pyrenoidosa*). In the third article, the use of the lutein is reviewed for treatment and prevention of age-related macular degeneration and senile nuclear cataracts in human beings and criticizes claims that it can do the same in small animals without any proof.

Key-words: electroretinogram, lutein, chlorophyll, peribulbar block

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- 2.1** Técnica de bloqueio peribulbar sendo realizado no olho esquerdo de um cão da raça Pastor Alemão. Notar posição da agulha no terço médio da margem palpebral superior, rente a órbita óssea..... 21
- 2.2** Exame eletrorretinográfico em cão da raça Pastor Alemão. Detalhe de posicionamento dos eletrodos corneano(1),referência (2) e do blefarostato (3). Notar pupila dilatada após instilação de colírio de uma gota de colírio de tropicamida 1%..... 22
- 2.3** Valores das amplitudes das ondas “a” observados nos testes de ERG antes e após o bloqueio peribulbar no olho esquerdo, nas intensidades de 3.000 mcd.s/m² e 10.000 mcd.s/m²..... 23
- 2.4** Valores de tempo implícito das ondas “a” observados nos testes de ERG antes e após o bloqueio peribulbar no olho esquerdo, nas intensidades de 3.000 mcd.s/m² e 10.000 mcd.s/m²..... 24
- 2.5** Valores de tempo implícito das ondas “b” observados nos testes de ERG antes e após o bloqueio peribulbar no olho esquerdo, na intensidade de 10.000 mcd.s/m²..... 24
- 3.1** Figura 3.1- Detalhe da face de um dos animais (cão da raça Pastor Alemão) investigados, já anestesiado e com os eletrodos posicionados. Notar as posições do eletrodo corneano (1), do blefarostato (2) e do eletrodo de referência (3)..... 38

LISTA DE TABELAS

- 3.1** Valores médios das amplitudes de ondas “a” e “b” com desvio padrão (DP) antes e após suplementação dietética com clorofila..... 39
- 3.2** Valores médios do tempo implícito de ondas “a” e “b’ com desvio padrão (DP) antes e após suplementação dietética com clorofila..... 40

LISTA DE ABREVIações

DMRI – degeneração macular relacionada à idade

APR – atrofia progressiva da retina

AREDS – Age-Related Eye Disease Study

BC- batimentos cardíacos

CD – grupamento de diferenciação

DNA- ácido desoxirribonucléico

DSAR- degeneração súbita adquirida da retina

ERG- eletrorretinografia

FC- frequência respiratória

FDA- food and drug administration

GSH- glutathione

HDL- high density lipoprotein

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

ICAM- inter cellular adhesion molecule

IgG – imunoglobina G

IgM- imunoglobulina M

IL - interleucina

IM- intramuscular

ISCEV – Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Visual Clínica

IV- intravenoso

L/min – litros por minuto

mcd.s/m² - milicandelas segundos por metro quadrado

MHC- complexo principal de histocompatibilidade

ml – mililitros

ml/kg – mililitros por kilograma

ml/kg/h- mililitros por kilograma por hora

mm – milímetros

mg/kg – miligramas por kilograma

mseg- milisegundos

μV - microvolts

O₂ – oxigênio

O₂⁻ - ânion superóxido

OH- radical hidroxila

SpO₂ – saturação de oxigênio na hemoglobina

PAS – pressão arterial sistólica

SP – São Paulo

UFPR – Universidade Federal do Paraná

VEGF- fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	OBJETIVOS GERAIS.....	2
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
2	EFEITOS DO BLOQUEIO PERIBULBAR NA ELETORRETINOGRRAFIA ESCOTÓPICA EM CÃES.....	3
2.1	Peribulbar block effects on dog scotopic ERG.....	4
2.2	Introdução.....	5
2.3	Material e Métodos.....	7
2.4	Resultados.....	11
2.5	Discussão.....	14
2.6	Referências.....	17
3	ACHADOS ELETORRETINOGRÁFICOS EM CÃES SUPLEMENTADOS DIETETICAMENTE COM CLOROFILA.....	21
3.1	Electroretinographic findings in dog under chlorophyll supplementation.....	22
3.2	Introdução.....	23
3.3	Material e Métodos.....	25
3.4	Resultados.....	28
3.5	Discussão.....	29
3.6	Referências.....	32
4	USO DA LUTEÍNA EM ANIMAIS E PESSOAS.....	34
4.1	The utilization of lutein in animals and human being.....	35
4.2	Introdução.....	35
4.3	Desenvolvimento.....	37
4.3.1	Prevenção do desenvolvimento de catarata e degeneração macular.....	37
4.3.2	Estímulo da imunidade em cães e gatos.....	38
4.3.3	Prevenção de doenças tumorais.....	40
4.3.4	Degeneração macular relacionada à idade (DMRI).....	41
4.3.5	Catarata relacionada à idade em seres humanos.....	43
4.4	Conclusões.....	46
4.5	Referências.....	46
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
6	ANEXOS.....	54

1. INTRODUÇÃO

A eletrorretinografia (ERG) é um exame oftálmico que permite a captação da atividade eletrofisiológica da retina em resposta a um estímulo luminoso e, portanto é uma ferramenta útil para avaliar o fenômeno da fototransdução no olho. Algumas indicações para a realização deste exame são: avaliação pré-operatória da função retiniana antes do procedimento cirúrgico de catarata, avaliação das doenças retinianas em que pouca ou nenhuma anormalidade ao exame oftalmoscópico do fundo de olho é evidente, tais como atrofia progressiva da retina (APR) e degeneração súbita adquirida de retina (DSAR).

A nutrição possui um grande efeito na imunidade e saúde dos animais. A luteína é um carotenóide que não pode ser convertido a vitamina A e sua presença nos tecidos animais é devido a ingestão de plantas, uma vez que não é sintetizado, podendo ser encontrada em vegetais verdes como espinafre e a couve e também em algumas frutas, como o abacate. Na mácula da retina de seres humanos encontra-se somente luteína e zeaxantina em exclusão de outros carotenóides. A luteína pode ser utilizada no tratamento e prevenção de doenças oftálmicas dos seres humanos, como a degeneração macular relacionada à idade (DMRI) e a catarata nuclear senil. Em animais, o uso da luteína pode controlar diversos tipos de formações tumorais.

A clorofila é um componente utilizado por vegetais, algas e algumas bactérias. Um derivado da clorofila, a chlorin e6, pode ser utilizado por alguns peixes do mar profundo, que não possuem pigmento visual sensível ao vermelho, em bastonetes sensíveis ao verde para enxergar o vermelho. Também salamandras,

quando utilizam a clorofila, podem melhorar sua visão, aumentando sua sensibilidade a luz vermelha em até 15 vezes, muito embora ainda não se conheça qual é o mecanismo que faz com que este processo aconteça.

A anestesia peribulbar é uma técnica de bloqueio local que pode promover acinesia, anestesia e controle da pressão intraocular adequadas, sendo um método alternativo para a técnica retrobulbar. Alguns autores discutem possíveis mudanças no ERG após exposição da lidocaína e bupivacaína, sendo assim necessários estudos sobre o efeito da anestesia peribulbar no ERG escotópico de cães.

1.1 OBJETIVOS GERAIS

Esta dissertação pretende discutir o uso da luteína em pessoas e animais, bem como avaliar as respostas da retina de cães frente a suplementação oral com clorofila e bloqueio anestésico peribulbar.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar e relatar o uso da luteína em animais e seres humanos;
- Comparar as respostas eletrorretinográficas antes e após o bloqueio peribulbar em cães;
- Verificar a existência de alterações eletrorretinográficas em cães suplementados dieteticamente com *Chlorella pyrenoidosa*.

2. EFEITOS DO BLOQUEIO PERIBULBAR NA ELETORRETINOGRRAFIA ESCOTÓPICA EM CÃES

Resumo

Objetivo: Investigar possíveis modificações na resposta eletrorretinográfica após o bloqueio peribulbar com lidocaína em cães. Métodos: Foram selecionados nove cães da raça Pastor Alemão (seis machos e três fêmeas com idade média de 3 anos). A medicação pré-anestésica utilizada foi a acepromazina (0,05 mg/kg IV) e a anestesia foi induzida com tiletamina/zolazepan (5 mg/kg IM) associada ao diazepam (0,5 mg/kg IM). Os animais foram pré-medicados com acepromazina (0,05 mg/kg IV) e, 15 minutos após, anestesiados com tiletamina/zolazepan (5 mg/kg IM) associada ao diazepam (0,5 mg/kg IM). As eletrorretinografias (ERG) foram realizadas após 20 minutos de adaptação ao escuro, com intensidades de flashes de 3000 e 10000 mcd.s/m². Na seqüência, realizou-se o bloqueio peribulbar com lidocaína a 2%, sob iluminação com luz vermelha, utilizando a técnica de dupla punção transconjuntival. Análises estatísticas foram realizadas utilizando o t-test. Resultados: Observou-se um aumento na amplitude da onda “a” nas intensidades de 3000 e 10000 mcd.s/m², diminuição do tempo implícito da onda “a” nas mesmas intensidades e aumento do tempo implícito da onda “b” na intensidades de 10000 mcd.s/m². Conclusão: O bloqueio peribulbar causou um aumento inesperado nas respostas eletrorretinográficas da onda “a”.

Palavras-chave: bloqueio regional, retina, amplitude da onda “a”

2.1 PERIBULBAR BLOCK EFFECTS ON DOG SCOTOPIC ERG

Abstract

Purpose: To investigate possible ERG response changes after lidocaine peribulbar anesthesia. Methods: Nine German Shepherd dogs (six males and three females with a mean age of 3 years) were selected. Acepromazine (0.05 mg/kg IV) was used as pre-medication. Anesthesia was induced with tiletamine/zolazepan (5 mg/kg IM) associated with diazepam (0.5 mg/kg IM). The animals were pre-medicated with acepromazine (0.05 mg/kg IV), and, 15 minutes later, anesthesia was induced with tiletamine/ zolazepan (5 mg/kg IM) associated with diazepam (0,5 mg/kg IM). Electroretinograms (ERGs) were performed after a 20 min dark adaption. The flash intensities for scotopic ERG used were: 3000 and 10000 mcd.s/m². After the first ERG protocol, peribulbar blocks using 2% lidocaine were performed, under red light illumination, using the double trans-conjunctival injection technique. The same ERG protocol was repeated 20 min after the first ERG protocol and 8 min after the peribulbar block. Statistical analyses were performed using a t-test. Results: The following changes were observed: An increase of the mean a-wave amplitude with intensities of 3,000 and 10,000 mcd.s/m², a decrease of the mean a-wave implicit time and an increase of the mean b-wave implicit time with a 10 000 mcd.s/m². Conclusions: Peribulbar block with lidocaine caused an unexpected increase in a-wave ERG responses.

Key words: regional block, retina, a-wave amplitude

2.2 Introdução

A eletrorretinografia (ERG) é um exame não invasivo útil para mensurar a função da retina (Strain et al, 1991; Komaromy et al, 1998; Heckenlively and Arden, 2006). Para realização deste exame os animais precisam estar sedados ou anestesiados para permitir que os eletrodos sejam colocados, e principalmente para evitar movimentos palpebrais e oculares. Alguns estudos sugerem que a anestesia pode interferir nos resultados da ERG (Tanskanen et al.; 1996; Yanase et al, 1997; Chaudhary et al, 2003; Kommonen et al, 2007; Woodward et al, 2007; Lin et al, 2009).

O estabelecimento de um protocolo anestésico para cada espécie, que promova segurança, praticidade, indução e despertar rápidos, acinesia palpebral e ocular e pouca alteração na amplitude e tempo das ondas do traçado do ERG é desejável tanto para procedimentos de rotina como para pesquisas comparativas (Bacellar, 2009).

Na medicina, a utilização da anestesia regional orbitária para cirurgia oftálmica tornou-se uma prática rotineira nos últimos anos (Vanetti, 2001). O uso da anestesia peribulbar foi primeiramente relatado no homem por Davis e Mandel em 1986, como uma alternativa mais segura ao bloqueio retrobulbar. Este bloqueio também é denominado de “bloqueio extra-conal”, uma vez que a agulha é introduzida fora do cone muscular extra-ocular (Troll, 1995). A técnica tradicional e mais comumente utilizada segundo as publicações nacionais na medicina restringe-se basicamente à de dupla punção (Vásquez et al., 2002). Esta técnica também é utilizada com sucesso na medicina veterinária como descrito por Oliva et al. (2010).

A anestesia peribulbar promove condições cirúrgicas adequadas para um procedimento oftálmico caracterizadas por analgesia intra-ocular, acinesia da musculatura extrínseca do olho, controle do reflexo óculo cardíaco, manutenção de valores adequados de pressão intra-ocular, além de promover analgesia residual no período pós-operatório (Oliva et al. 2010).

A anestesia peribulbar vem sendo aceita para diversos procedimentos cirúrgicos desde 1986 (Agrawal e Tharoor, 2002) O bloqueio peribulbar e retrobulbar podem promover adequada anestesia, acinesia e controle da pressão intra-ocular assim como promover adequada analgesia no pós-operatório. A anestesia periocular é um método alternativo para a técnica retrobulbar promovendo bloqueio local. Neste método, a posição extraconal da agulha de injeção é o que diminui a incidência de complicações mais sérias (Oliva et al., 2010). A complicação mais temida e potencialmente presente na infiltração retrobulbar e peribulbar posterior são: a perfuração acidental do olho, hemorragia retrobulbar e injúria do nervo óptico (Campos et al, 1989).

O bloqueio peribulbar age diretamente nas terminações nervosas motoras e sensitivas dos 3º, 4º, 6º e 7º pares de nervos cranianos incluindo o gânglio ciliar do 3º par e o nervo óptico (2º par de nervos craniano) levando a anestesia e acinesia palpebral (Campos et al, 1989). O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da anestesia peribulbar no ERG escotópico de cães.

2.3 Material e Métodos

Protocolo Anestésico

Nove cães da raça Pastor Alemão, com idades entre 1 e 7 anos, foram anestesiados para o exame eletrorretinográfico. Os animais foram pré-medicados com acepromazina (0,05 mg/kg,IV) (Acepran[®] 1%, Univet S/A, Cambuci, SP, Brasil). Neste momento, 1 gota do colírio de tropicamida 1% (Mydriacyl[®], Alcon, São Paulo, SP) foi instilada em cada olho do animal. Uma vez iniciada a tranqüilização, foi feita a venopunção com cateter (BD Angiocath[™] 20GAx1,00 IN – Becton/Dickinson Juiz de Fora, MG, Brasil) e administrado soro de Ringer Lactato de Sódio, a uma velocidade de 10 ml/kg/h. Decorridos 15 minutos, a anestesia foi realizada com tiletamina/ zolazepan (5 mg/kg ,IM) (Zoletil[®] 100 , Virbac, São Paulo, SP, Brasil) associada com diazepam (0,5 mg/kg ,IM) (Compaz[®], Cristália, Itapira, SP, Brasil) (após adaptação do animal ao escuro). Quando necessário, doses subseqüentes de tiletamina/zolazepan (1 mg/kg ,IV) foram feitas para manter a anestesia. Os animais receberam oxigênio 100% (1 L/min) via cateter nasal até o término da anestesia.

Realizou-se a técnica de bloqueio peribulbar posterior com dupla punção transconjuntival. Utilizou-se agulha hipodérmica descartável 0,7mmx25mm (22Gx1”), a qual foi inserida primeiramente através da conjuntiva em um ponto situado no terço medial na margem orbitária superior e, em um segundo ponto situado no terço lateral da margem orbitária inferior (Fig. 2.1). Ambas em sentido antero-posterior na tentativa de abordar o espaço peribulbar posterior, o que favoreceu que a solução anestésica (Xylestesin[®] 2%, Cristália, Itapira, SP, Brasil) fosse injetada lentamente durante um minuto fora do cone muscular (injeção extra-

conal), at[e o globo ocular apresenta-se leve exoftalmia, segundo Oliva et al (2010). Teve-se o cuidado de manter a agulha mais próxima à parede orbitária durante sua inserção e, manter o bisel direcionado para o globo ocular. O volume de anestésico local administrado em cada ponto de punção variou conforme a tolerância e a distensibilidade do espaço orbitário, com o cuidado de evitar a ocorrência de exoftalmia e aumento excessivo da pressão intra-ocular. Após cada injeção, realizou-se compressão orbital manual durante um minuto para auxiliar na difusão da solução anestésica.

Durante o período anestésico foram monitorados a frequência cardíaca (FC), a eletrocardiografia, a saturação de oxigênio na hemoglobina (SpO₂) todos com monitor multiparamétrico (DX 2022 L-D[®], Dixtal Biomedica, Manaus, AM, Brasil), a frequência respiratória (FR) foi mensurada com estetoscópio e a pressão arterial sistólica (PAS) foi obtida pelo método não-invasivo Doppler vascular (Model 812[®], Parks Medical Electronics, Aloha, USA). Os parâmetros foram aferidos a cada dez minutos durante todo o procedimento.

Protocolos Eletrorretinográficos (ERGs)

Foram realizadas duas avaliações nos animais sendo: a primeira iniciando logo após o animal entrar na sala de exames, antes da anestesia, com 20 minutos de adaptação ao escuro; a segunda, aguardando novamente outros 20 minutos de adaptação e 8 minutos após o bloqueio peribulbar de lidocaína, respeitando o período de latência do anestésico local.

Os eletrodos foram posicionados da seguinte maneira: o eletrodo “terra” (Ground) (FD-E2-24, Grass Technologies, Astro-Medical, Inc., West Warwick, RI) foi colocado na região peri-lombar do animal; o eletrodo referência (FD-E2-24, Grass Technologies, Astro-Medical, Inc., West Warwick, RI) foi colocado a 2,5 cm da pálpebra do canto lateral do olho examinado; e o eletrodo corneano (ERG-*jet*, Nicolet Instruments, Madison, WI) diretamente na córnea do olho examinado após o blefaroestato ser posicionado segurando a membrana nictitante (Fig. 2.2)

As ERGs foram feitas empregando um aparelho portátil (HM_sERG; RetVetCorp, Inc., MO, USA), empregando o protocolo *QuickRetCheck* da RetVetcorp., Inc., desenvolvido por Närfstrom. O protocolo desenvolvido tem por objetivo obter informações a respeito da função da retina sob condições escotópicas em um breve período de tempo (Norman *et al*, 2008). Três intensidades de flashes são utilizadas para avaliar a função dos fotorreceptores: primeiro o sistema de bastonetes foi avaliado por estimulação luminosa, utilizando em média quatro flashes de baixa intensidade luminosa, 10 mcd.s/m². Em seguida, a combinação da resposta de cones e bastonetes foi avaliada usando dois flashes de alta intensidade luminosa (3.000 e 10.000 mcd.s/m²).

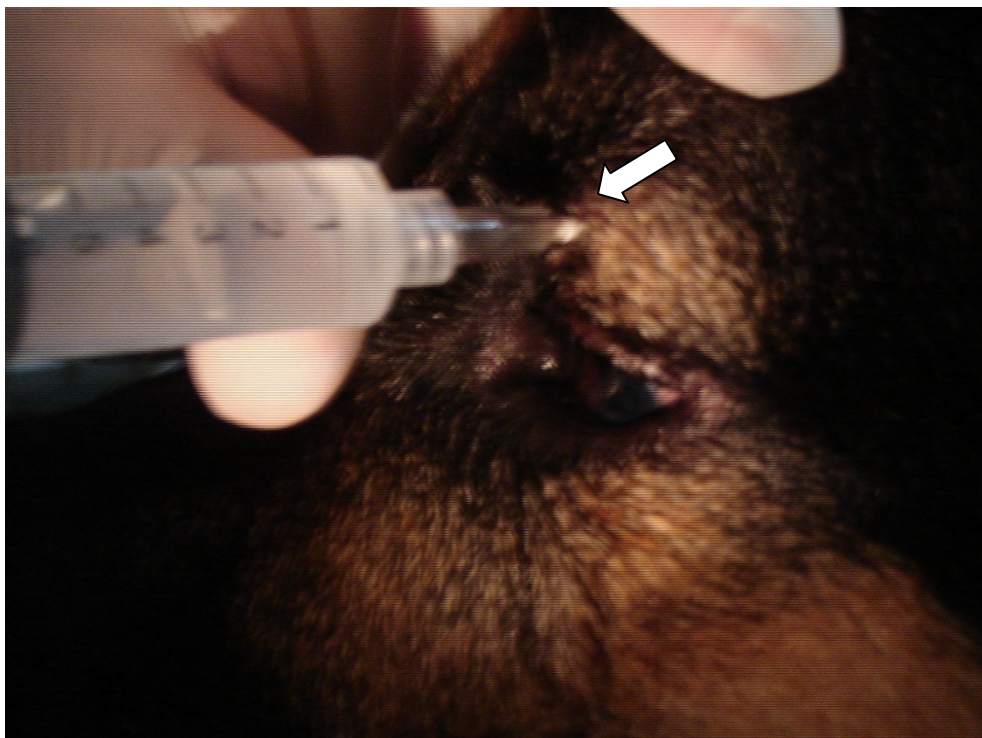


Figura 2.1- Detalhe fotográfico da técnica de bloqueio peribulbar sendo realizado no olho esquerdo de um cão da raça Pastor Alemão. Note a posição da agulha no terço médio da margem palpebral superior, em curso muito próximo (rente) à órbita óssea (seta).

Análise estatística

Após todas as avaliações eletrorretinográficas, os dados foram mensurados usando o *software* ERGVIEWER 2.1.1.0 (RetVetCorp, Inc., Missouri, USA) e a análise estatística comparando as respostas obtidas no ERG foi realizada por meio do teste *t*-test. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos. Para realização da análise estatística empregou-se o programa StatView (SAS Institute Inc. Copyright © 1992-1998).

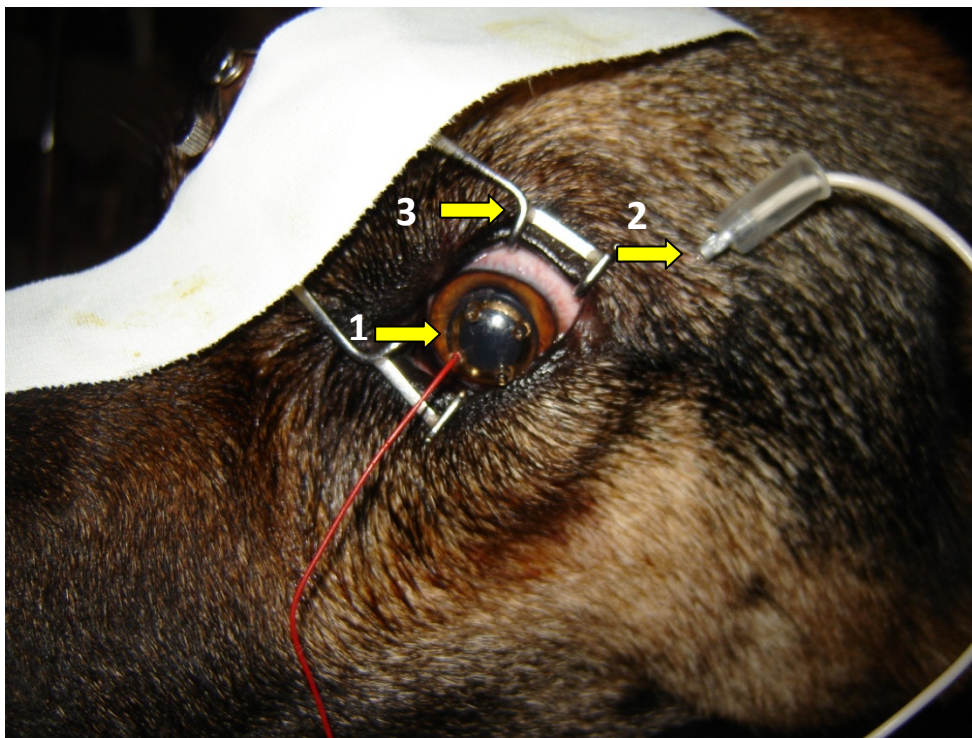


Figura 2.2- Exame eletrorretinográfico em cão da raça Pastor Alemão. Detalhe do posicionamento dos eletrodos corneano (1), referência (2) e do blefarostato (3). Note a pupila já dilatada após instilação de colírio de uma gota de colírio de tropicamida 1%.

2.4 Resultados

Os parâmetros avaliados permaneceram adequados para a espécie e não apresentaram variações estatísticas relevantes ($p > 0,05$). O volume médio de lidocaína 2% utilizado nos animais foi de 4,73 mL no ponto superior e 4,43 mL no ponto inferior.

Observou-se um aumento significativo na média da amplitude de onda “a” ($80,88 \pm 23,47$ a $142,22 \pm 74,36 \mu\text{V}$) quando comparados os dois momentos (antes e após o bloqueio peribulbar), (Fig. 2.3) utilizando uma estimulação de 3.000

mcd.s/m². No estímulo de 10.000 mcd.s/m², houve um aumento na média da amplitude de onda "a" ($115,24 \pm 30,69$ a $148,792 \pm 32,7 \mu\text{V}$). Sobre o tempo implícito, um decréscimo no tempo implícito de onda "a" (Fig. 2.4) foi notado com estímulo de 3.000 mcd.s/m² e 10.000 mcd.s/m² (de $13 \pm 0,56$ a $11,84 \pm 1,14$ msec e $11,6 \pm 0,56$ a $10,6 \pm 0,7$ msec, respectivamente). No estímulo de alta intensidade (10.000 mcd.s/m²), um aumento no tempo implícito da onda "b" (de $17,43 \pm 6,96$ a $24,43 \pm 3,37$ msec) foram observados (Fig 2.5).

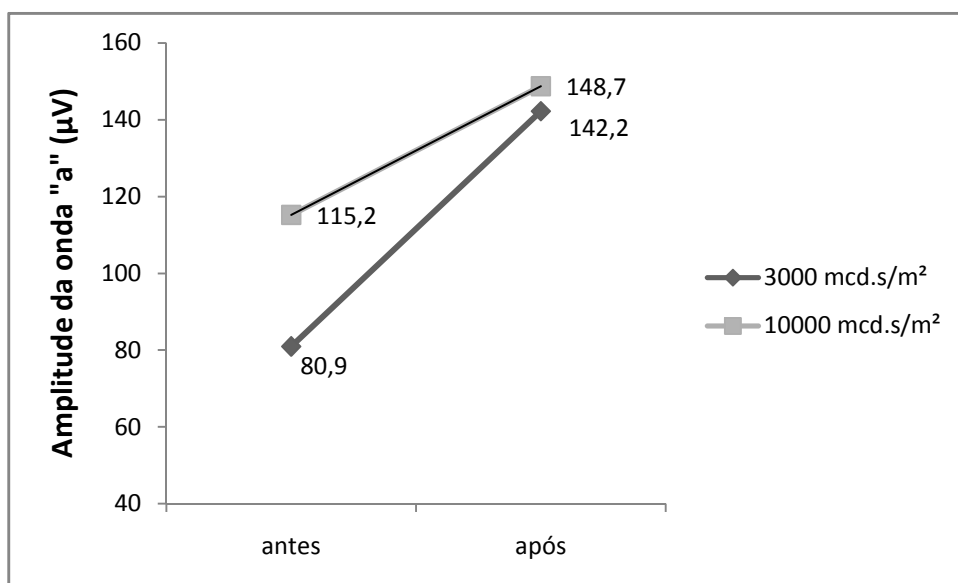


Figura 2.3- Valores das amplitudes das ondas "a" observados nos testes de ERG antes e após o bloqueio peribulbar no olho esquerdo, nas intensidades de 3.000 mcd.s/m² e 10.000 mcd.s/m². Valores não possuem diferença significativa $p > 0,05$.

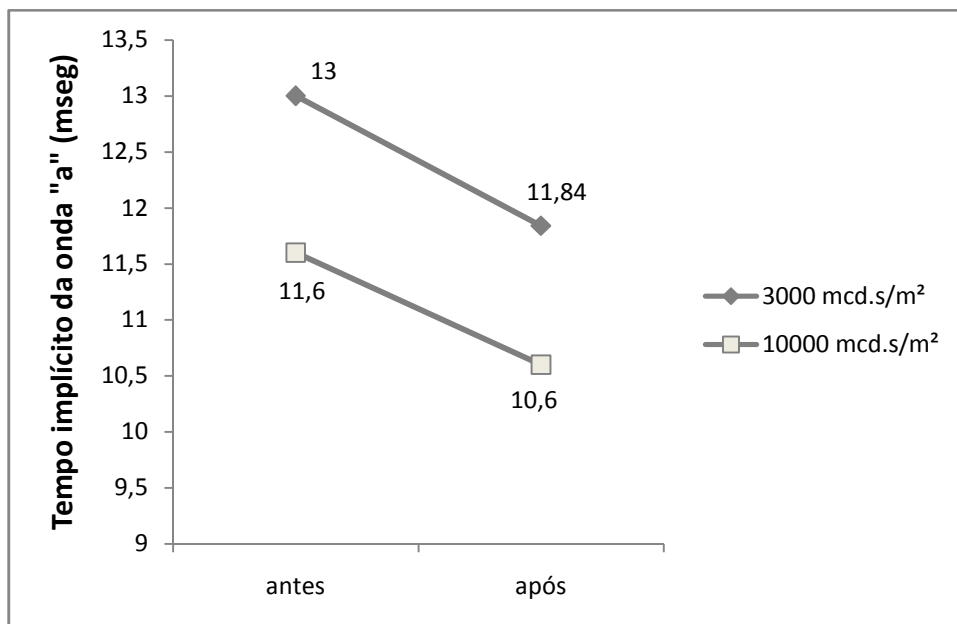


Figura 2.4 – Valores de tempo implícito das ondas “a” observados nos testes de ERG antes e após o bloqueio peribulbar no olho esquerdo, nas intensidades de 3.000 mcd.s/m² e 10.000 mcd.s/m². Valores não possuem diferença significativa $p > 0,05$.

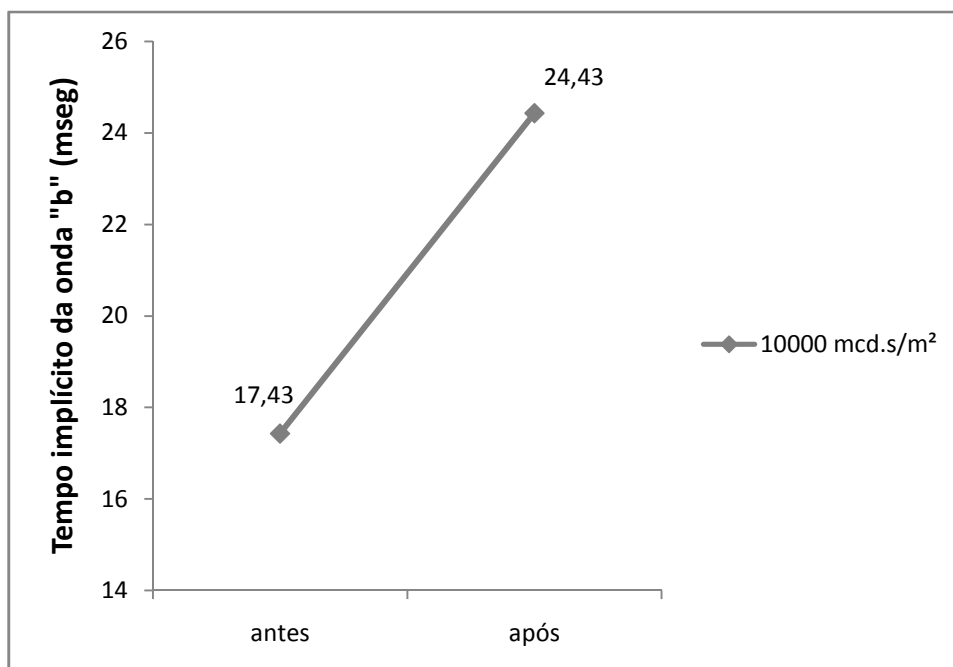


Figura 2.5 – Valores de tempo implícito das ondas “b” observados nos testes de ERG antes e após o bloqueio peribulbar no olho esquerdo, na intensidade de 10.000 mcd.s/m². Valores não possuem diferença significativa $p > 0,05$.

2.5 Discussão

A escolha da lidocaína 2% para o bloqueio peribulbar foi devido ao fato desta droga ser comumente usada para bloqueios regionais além de ter penetração rápida (2 minutos) e curta duração (20 minutos a 2 horas) (Giuliano, 2008).

Em estudo realizado com crianças de até 40 kg, peso similar a muitos cães, inclusive aos Pastores Alemães aqui empregados, o volume de anestésico utilizado para anestesia peribulbar caudal foi de 0.3 ml/kg (Deb et al, 2001). Para a determinação do volume ideal para anestesia peribulbar nestes pacientes, tanto para crianças (Deb et al, 2001) como para cães, há necessidade de se realizar este tipo de investigação. No caso do presente estudo, o volume médio de lidocaína utilizada foi de 0,3 mL/kg corroborando com o volume utilizado em crianças. Sendo que a média de volume no ponto superior foi de 4,73 mL e no ponto inferior, 4,43 mL. Tais volumes poderão ser empregados no futuro como parâmetros para a realização de eventuais bloqueios peribulbares em cães adultos desta raça ou de peso e conformação craniana similares.

Conjecturou-se que o aumento da amplitude da onda “a” pôde ser devido a uma ou combinação de mais de uma destas hipóteses: 1) A lidocaína agiu nos neurônios da retina, bloqueando os canais de sódio dos fotorreceptores; 2) Melhor posicionamento do bulbo ocular, secundário ao procedimento do bloqueio que gerou uma melhor resposta elétrica ao estímulo luminoso empregado; 3) Compressão mecânica causada pela presença de líquido na cavidade orbitária e causando uma leve exoftalmia; por fim, 4) Presença de líquido dentro da periórbita, potencialmente

aumentando a condutividade elétrica nos tecidos oculares para a energia elétrica originada na retina.

Quando a retina é estimulada pela luz, a rodopsina presente nos fotorreceptores combina-se com outra proteína (transducina) ativando a fosfodiesterase que converte o GMP cíclico em 5'-GMP, o que causa o fechamento dos canais de sódio, hiperpolarizando a membrana. O que não ocorre no escuro, onde a presença de GMP cíclico mantém os canais de sódio abertos (Heckenlively e Arden, 2006). A lidocaína é um anestésico local que atua nos canais de sódio diminuindo a saída de sódio da célula durante a despolarização (Bidwell, 2009). Tal fato é eficiente para evitar a condutividade do estímulo despolarizante nociceptivo e, conseqüentemente, a dor. Entretanto nos fotorreceptores o processo é contrário, a visão se dá pela hiperpolarização e não pela despolarização. Portanto a ação da lidocaína seria prejudicial para a despolarização, ou seja, favoreceria a hiperpolarização, que é o que gera a onda "a" negativa no eixo elétrico na resposta eletrorretinográfica (fotorreceptores).

Sabe-se que com um melhor posicionamento do bulbo ocular o estímulo luminoso que chegará a retina será mais bem distribuído e possivelmente com maior intensidade provocando uma captação melhor e uma resposta mais fidedigna do exame. Com o bloqueio peribulbar a centralização do bulbo ocular acontece normalmente, deixando o olho em posição ideal para o ERG evitando barreiras como a íris, esclera e membrana nictitante no trajeto da luz. Procurou-se manter o bulbo centralizado desde o primeiro exame utilizando fixação mecânica (ponto escleral com fio náilon 6-0).

Adicionalmente, a leve exoftalmia causada pelo procedimento do bloqueio peribulbar poderia trazer a retina significativamente mais para frente (mais próxima à fonte de luz), aumentando, portanto a magnitude da resposta.

A presença de líquido no espaço peri-orbitário – lidocaína -, por ser um sal diluído em líquido, poderia aumentar a condutividade do estímulo elétrico formado no processo de fototransdução da retina, aumentando possivelmente a resposta final dos fotorreceptores captada e observada pelo aparelho de eletrorretinografia.

O tempo implícito da onda “a” apresentou uma diminuição, provavelmente pelo aumento da velocidade de resposta das células fotorreceptoras e o aumento causado no tempo implícito da onda “b” pode ter acontecido pelo aumento da amplitude da onda “a”, aonde a onda “b” demoraria mais para chegar ao seu pico.

Os resultados observados no presente estudo são curiosos uma vez que estudos prévios com lidocaína 2% intravítrea em coelhos demonstraram uma redução temporária na amplitude da onda “b” podendo esta ser devido a um aumento na pressão intraocular e compressão mecânica da retina, causados pela injeção (Zemel et al., 1995). Outro estudo em seres humanos demonstrou que as amplitudes da onda “b” diminuem mais acentuadamente após bloqueio peribulbar do que quando uma injeção intravítrea era realizada (Anders et al., 1999). Loken et al (1994) observaram uma diminuição da onda “b”, até sua extinção, após a injeção peribulbar e compressão orbital, mas logo após a remoção da compressão a amplitude tende a aumentar. Nenhum destes estudos havia observado um aumento da onda “a”.

Como consideração final, observou-se que o bloqueio peribulbar com lidocaína causa um aumento inesperado na resposta eletrorretinográfica da

amplitude de onda “a” (fotorreceptores), além de uma excelente centralização do bulbo ocular para a realização do exame. Portanto, na prática da eletrorretinografia veterinária, quando forem usados protocolos anestésicos inapropriados para o exame, ou seja, que causem rotação do bulbo ocular, movimentação excessiva ou até mesmo nistágmo, torna-se útil a informação aqui presente de que a realização de um bloqueio peribulbar com lidocaína não causaria abolição da resposta eletrorretinográfica. De fato, a magnitude da onda “a” seria até amplificada. Outros estudos certamente devem ser conduzidos no futuro com relação este aumento, como a colocação de lidocaína intravítrea e solução salina na periórbita.

2.6 Referências

AGRAWAL, V.; THAROOR, M. Peribulbar anesthesia for penetrating keratoplasty. A case series. **Indian Journal of Ophthalmology**. p. 313-316. v. 50 n. 4, 2002.

ANDERS, N.; HEUERMANN, T.; RUTHER, K.; HARTMANN, C. Clinical and electrophysiologic results after intracameral lidocaine 1% anesthesia. **Ophthalmology**, n.10, n.106, 1999.

OLIVA, V.N.L.S.; ANDRADE, A.L.; BEVILACQUA, L.; MATSUBARA, L.M.; PERRI, S.F.V. Anestesia peribulbar com ropivacaína como alternativa ao bloqueio neuromuscular para facectomia em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.3, p.586-595, 2010.

BIDWELL, L.A. Multimodal Pain Management of the horse with Acute Abdomen. **In: Current therapy in equine medicine**. Cap. 86.Saunders: Missouri. p. 387, 2009.

CAMPOS, A.R.; AZEVEDO, F.T.J.; SILVA, L.C. Bloqueio peribulbar: uma alternativa para cirurgia oftálmica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 39, p. 4, 1989.

CHAUDHARY,V.; HANSEN, R.; LINDGREN, H.; FULTON, A. Effects of telazol and nembutal on retinal responses. **Documenta Ophthalmologica**. v.107, p. 45-51, 2003.

DEB, K.; SUBRAMANIAM, R.; DEHRAN, M.; TANDON, R.; SHENDE, D. Safety and efficacy of peribulbar block as adjunct to general anaesthesia for paediatric ophthalmic surgery. **Paediatric Anaesthesia** v.11 p.161-167, 2001.

GIULIANO, E.A.Regional Anesthesia as an adjunct for eyelid surgery in dogs. **Topics in companion animal medicine**. v. 23: n. 1, p. 51- 56, 2008.

HECKENLIVELY, J.R. e ARDEN,G.B. **Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision**. 2.ed. Massachusetts: MIT, p.977, 2006.

KOMAROMY, A.M.; SMITH, P.J.; BROOKS, D.E. Electroretinography in dogs and cats. Part I. Retinal morphology and physiology. **The Compendium on Continuing Education**, v.20, p.343-354, 1998.

KOMMONEN,B.; HYVÄTTI,E.; DAWSON,W.W. Propofol modulates inner retina function in Beagles. **Veterinary Ophthalmology**. v.10, n.2, p.76-80, 2007.

LIN,S.L.; SHIU,W.C.; LIU,P.C.; CHENG,F.P.; LIN,Y.C.; WANG,W.S. The effects of different anesthetic agents on short electroretinography protocol in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 71, n.6, p.763-768, 2009.

LOKEN, R.G; COUPLAND, S.G.; DESCHÊNES, M.C. The electroretinogram during orbital compression following intraorbital regional block for cataract surgery.

Canadian Journal of Anesthesiology. v.41. p. 802-806, 1994.

OLIVA, V.N.L.S.; ANDRADE, A.L.; BEVILACQUA, L.; MATSUBARA, L.M.; PERRI, S.F.V. Anestesia peribulbar com ropivacaína como alternativa ao bloqueio neuromuscular para facectomia em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Anestesiologia.** v.62. p. 586-595, 2010.

STRAIN, G.M.; CLAXTON, M.S.; PRESCOTT-MATHEWS, J.S.; LAPHAND, D.J. Electroretinogram and Visual-evoked potencial measurements in sheep. **Canadian Journal of Veterinary Research.** v.55, p.1-4, 1991.

TANSKANEN, P.; KYLMA, T.; KOMMONEN, B.; KARHUNEN, U. Propofol influences the electroretinogram to a lesser degree than thiopentone. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica.** v. 40, p.480-485, 1996.

TROLL, G.F. Regional ophthalmic anesthesia: safe techniques and avoidance of complications. **Journal of Clinical Anesthesia,** v.7, p.163-172, 1995.

VANETTI, L.F.A. Anestesia para oftalmologia. In: YAMASHITA, A.M.; TAKAOKA, F.; AULER JUNIOR, J.O.C. (Eds). **Anestesiologia – SAESP.** São Paulo: Atheneu, p.811-830, 2001.

VÁSQUEZ, C.E.; MACUCO, M.V.; BEDIN, A. et al. Comparação da qualidade do bloqueio oftálmico periconal com ropivacaína a 1% e 0,75% com punção dos pontos infra-orbitário lateral e medial da órbita. **Revista Brasileira de Anestesiologia.,** v.52, p.681-688, 2002.

ZEMEL, E.; LOEWENSTEIN, A.; LAZAR, M.; PERLMAN, I. The effects of lidocaine and bupivacaine on the rabbit retina. **Documenta Ophthalmologica**. v.90, p.189-199. 1995.

WOODWARD,W.R.; CHOI,D.; GROSE,J.; MALMIN,B.; HURST, S.; PANG, J.; WELEBER,R.G.; PILLERS,D.A.M. Isoflurane is na effective alternative to ketamine/xylazine/acrepromazine as na anesthetic agent for the mouse electroretinogram. **Documenta Ophthalmologica**. v.115, p.187-201, 2007.

YANASE,J.; OGAWA,H. Effects of halothane and sevoflurano on electroretinogram of dogs. **American Journal of Veterinary Research**. v.58, p.904-909, 1997.

3. ACHADOS ELETRORRETINOGRÁFICOS EM CÃES SUPLEMENTADOS DIETETICAMENTE COM CLOROFILA

Resumo

Objetivos: Investigar possíveis mudanças na resposta eletrorretinográfica de cães após suplementação dietética com clorofila. **Métodos:** Sete cães da raça Pastor Alemão, com idades entre 1 a 5 anos, receberam 5,6 gramas da alga *Chlorella pyrenoidosa* que possui 123,76 gramas de clorofila, durante 30 dias. Foram realizados dois eletrorretinogramas (ERG), sendo o primeiro antes da suplementação e o segundo após a suplementação. Para a ERG a medicação pré-anestésica utilizada foi a acepromazina (0,05 mg/kg IV) e a anestesia foi induzida com tiletamina/zolazepan (5 mg/kg IM) associada ao diazepam (0,5 mg/kg IM). Os animais foram pré-medicados com acepromazina (0,05 mg/kg IV) e, 15 minutos após, anestesiados com tiletamina/zolazepan (5 mg/kg IM) associada ao diazepam (0,5 mg/kg IM). O protocolo utilizado para o ERG foi o *ISCEV* (HM_sERG, RetVetCorp, Inc., Missouri, USA). Para o teste escotópico foram feitos 20 minutos de adaptação ao escuro e para o teste fotópico, 10 minutos de adaptação ao claro. A intensidade dos flashes para o ERG escotópico foram: 10, 3.000 e 10.000 mcd.s/m². Para o teste fotópico e para o 30 Hzflicker a intensidade dos flashes foram: 3.000 e 10.000 mcd.s/m². Este protocolo foi repetido nos dias zero e trinta. Análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste-t. **Resultados:** Não foram observadas diferenças estatísticas comparando os ERGs ($P > 0.05$). **Conclusão:** As

respostas eletrorretinográficas após suplementação com clorofila não afetaram significativamente a resposta da retina em cães.

Palavras-chave: clorina e6, sensibilidade a luz vermelha, eletrorretinografia

3.1 Electrorretinographic findings in dog under chlorophyll supplementation

Abstract

Purpose. To investigate possible ERG changes in dog that received a chlorophyll-rich diet containing seaweed (*Chlorella pyrenoidosa*). **Methods.** Seven German Shepherd dogs, aged 1 to 5 years, received 5.6 grams of seaweed *Chlorella pyrenoidosa*, which have 123.76 grams of chlorophyll, once a day for 30 days. Two ERGs were performed, the first one before supplementation and the . Acepromazine (0.05 mg/kg IV) was used as pre-medication. Anesthesia was induced with tiletamine/zolazepan (5 mg/kg IM) associated with diazepam (0.5 mg/kg IM). The animals were pre-medicated with acepromazine (0.05 mg/kg IV), and, 15 minutes later, anesthesia was induced with tiletamine/ zolazepan (5 mg/kg IM) associated with diazepam (0,5 mg/kg IM). The ISCEV protocol (HMsERG, RetVetCorp, Inc., Missouri, USA) was used with a 20 minute dark adaption for scotopic and a 10 minute light adaption for photopic ERGs, respectively. Flash intensities for scotopic ERGs were: 10, 3,000 and 10,000 mcd.s/m². For photopic ERGs and 30 Hz flicker the flash intensities used were: 3,000 and 10,000 mcd.s/m². This protocol was repeated at 0 and 30 days. Statistical analyses to compare ERG responses using *t*-test were performed. **Results.** No significant differences were found comparing the ERGs ($P > 0.05$). **Conclusions.** As observed by ERG responses chlorophyll

supplementation with seaweed *Chlorella pyrenoidosa* (123.76 grams) does not significantly affect retinal responses in dog.

Key words: chlorin e6, sensible to the red light, electroretinography

3.2 Introdução

A retina se divide em duas partes: epitélio pigmentado e a retina neurosensorial, que é composta por nove camadas: camada de fotorreceptores, membrana limitante externa, camada nuclear externa, camada plexiforme externa, camada nuclear interna, camada plexiforme interna, camada de células ganglionares, camada de fibras nervosas e membrana limitante externa (Bacellar et al, 2008).

A eletrorretinografia (ERG) é um exame oftálmico que permite a captação da atividade eletrofisiológica da retina em resposta a um estímulo luminoso e, portanto é uma ferramenta muito útil para avaliar o fenômeno da fototransdução no olho. Trata-se de um procedimento seguro de análise da função retiniana *in vivo* uma vez que não é invasivo, mesmo quando necessita de anestesia, como ocorre no caso de sua utilização em animais de companhia (Heckenlively e Arden, 2006).

Algumas das várias indicações para a realização deste exame funcional são: avaliação pré-operatória da função retiniana antes do procedimento cirúrgico de catarata, avaliação das doenças retinianas em que pouca ou nenhuma anormalidade ao exame oftalmoscópico do fundo de olho é evidente, tais como atrofia progressiva da retina (APR) e degeneração súbita adquirida de retina (DSAR) (Bacellar et al, 2009).

Estudos mostram que um derivado da clorofila seria utilizado por alguns peixes que habitam fossas abissais e mares profundos, que não possuem pigmento visual sensível ao vermelho, em bastonetes verdes (sensíveis a cor verde) para enxergar também a cor vermelha. Em um estudo com bastonetes extraídos da retina de salamandras (*Ambystoma tigrinum*) constatou-se que estes podem acumular clorofila e6, que os torna tão sensíveis a luz vermelha como são para a verde (Isayma et al, 2006). Embora o mecanismo completo de fototransdução ainda não esteja bem esclarecido, tais pigmentos envolvidos já foram identificados como sendo oriundos de microorganismos que possuem a capacidade de sintetizar a clorofila, uma vez que nenhum vertebrado conhecido até agora é capaz de produzir estes produtos (Douglas et al., 2000).

A clorina e6 é um derivado da clorofila utilizado como corante na indústria alimentícia, como suplementação dietética e no tratamento de câncer. Um experimento realizado em ratos suplementados com clorina e6 para avaliar uma melhora da função da retina e, conseqüentemente, visão por meio da eletrorretinografia, mostrou que estes roedores quando suplementados com tal derivado da clorofila apresentaram quase o dobro da resposta a luz vermelha quando comparados aos ratos não suplementados. A clorina e6 foi encontrada na retina, mostrando assim que o aumento da sensibilidade visual é resultado da absorção da luz pelo derivado da clorofila (Washington et al, 2007).

Outro estudo realizado com salamandras mostrou que a clorina e6 quando pré-incubada nos bastonetes de olhos de salamandras podem aumentar em 15 vezes a sensibilidade a luz vermelha. O mecanismo que faz com que a clorina e6 faça os bastões serem sensíveis a luz vermelha ainda não está claro (Isayama et al, 2006).

Estudos sobre a suplementação com derivado de clorofila ainda são muito escassos, sendo que além de experimentos em ratos nada mais consta na literatura sobre a utilização deste derivado em mamíferos maiores e filogeneticamente mais complexos, portanto, certamente tornam-se necessárias pesquisas envolvendo estes animais uma vez que os potenciais benefícios da clorofila para os seres humanos ainda não são totalmente conhecidos. O objetivo deste trabalho é avaliar se há alteração nas respostas eletrorretinográficas em cães suplementados com 5,6 gramas diárias de *Chlorella pyrenoidosa*. por via oral.

3.3 Material e Métodos

Foram utilizados sete cães adultos da raça Pastor Alemão, - 4 machos e 3 fêmeas- com idade de 1 a 5 anos, provenientes do Canil Central da Polícia Militar do Paraná, PMPR. Foram realizadas duas avaliações nos animais sendo a primeira antes da suplementação com a clorofila e a segunda 30 dias após o uso diário do composto.

Os cães receberam alimentação isonutritiva e suplementação com 5,6 gramas diárias de *Chlorella pyrenoidosa* que corresponde a 1,23 gramas da substância clorofila (Clorofila, Terra Nova, Sanibras Bionutrientes LTDA., Brasil) no período de 30 dias.

Para o exame os animais foram anestesiados da seguinte forma: medicação pré-anestésica com acepromazina (0,05 mg/kg IV) (Acepran[®] 1%, Univet S/A, Cambuci, SP, Brasil). Neste momento, 1 gota do colírio de tropicamida 1%

(Mydriacyl[®], Alcon, São Paulo, SP) foi instilada nos olhos do animal. Uma vez iniciada a sedação, foi feita a venopunção com cateter (BD Angiocath[™] 20GAx1,00 IN – Becton/Dickinson Juiz de Fora, MG, Brasil), e administrado solução isotônica de Ringer Lactato de Sódio (10 mL/kg/h). A anestesia foi realizada com tiletamina/zolazepan (5 mg/kg IM) (Zoletil[®] 100, Virbac, São Paulo, SP, Brasil) associada com diazepam (0,5 mg/kg IM) (Compaz[®], Cristália, Itapira, SP, Brasil) 20 minutos depois. Quando necessário, doses subsequentes de tiletamina/zolazepan (1 mg/kg IV) foram feitas para manter a anestesia. Os animais receberam 1 L/min de oxigênio 100% via cateter nasal até o término da anestesia. Os parâmetros vitais foram aferidos a cada dez minutos durante o período anestésico, incluindo: eletrocardiograma, frequência cardíaca (FC) e saturação de oxigênio na hemoglobina (SpO₂) monitorado com um monitor multiparamétrico (DX 2022 L-D[®], Dixtal Biomedica, Manaus, AM, Brasil), frequência respiratória (FR) foi mensurada com estetoscópio e a pressão sanguínea arterial sistólica (PAS) foi obtida pelo método não-invasivo Doppler vascular (Model 812[®], Parks Medical Electronics, Aloha, USA). Os parâmetros foram aferidos a cada dez minutos durante todo o procedimento.

Após a anestesia os eletrodos foram posicionados. O eletrodo “terra” (Ground) (FD-E2-24, Grass Technologies, Astro-Medical, Inc., West Warwick, RI) foi colocado na região peri-lombar do animal; o eletrodo referência (FD-E2-24, Grass Technologies, Astro-Medical, Inc., West Warwick, RI) foi colocado a 2,5 cm da pálpebra do canto lateral do olho examinado; e o eletrodo corneano (ERG-*jet*, Nicolet Instruments, Madison, WI) diretamente na córnea do olho examinado após o blefaroestado ser posicionado segurando a membrana nictitante (Fig.3.1).

As ERGs foram feitas utilizando o protocolo *ISCEV* (HM_sERG, RetVetCorp, Inc., Missouri, USA), constituído por: 20 minutos de adaptação ao escuro para testes escotópicos; testes escotópicos com intensidades de *flashes* de 10, 3.000 e 10.000 mcd.s/m² ; 10 minutos adaptação ao claro (intensidade da adaptação de 30.000 mcd) para testes escotópicos; testes fotópicos e 30 Hz-flicker com intensidades de *flashes* de 3.000 e 10.000 mcd.s/m².

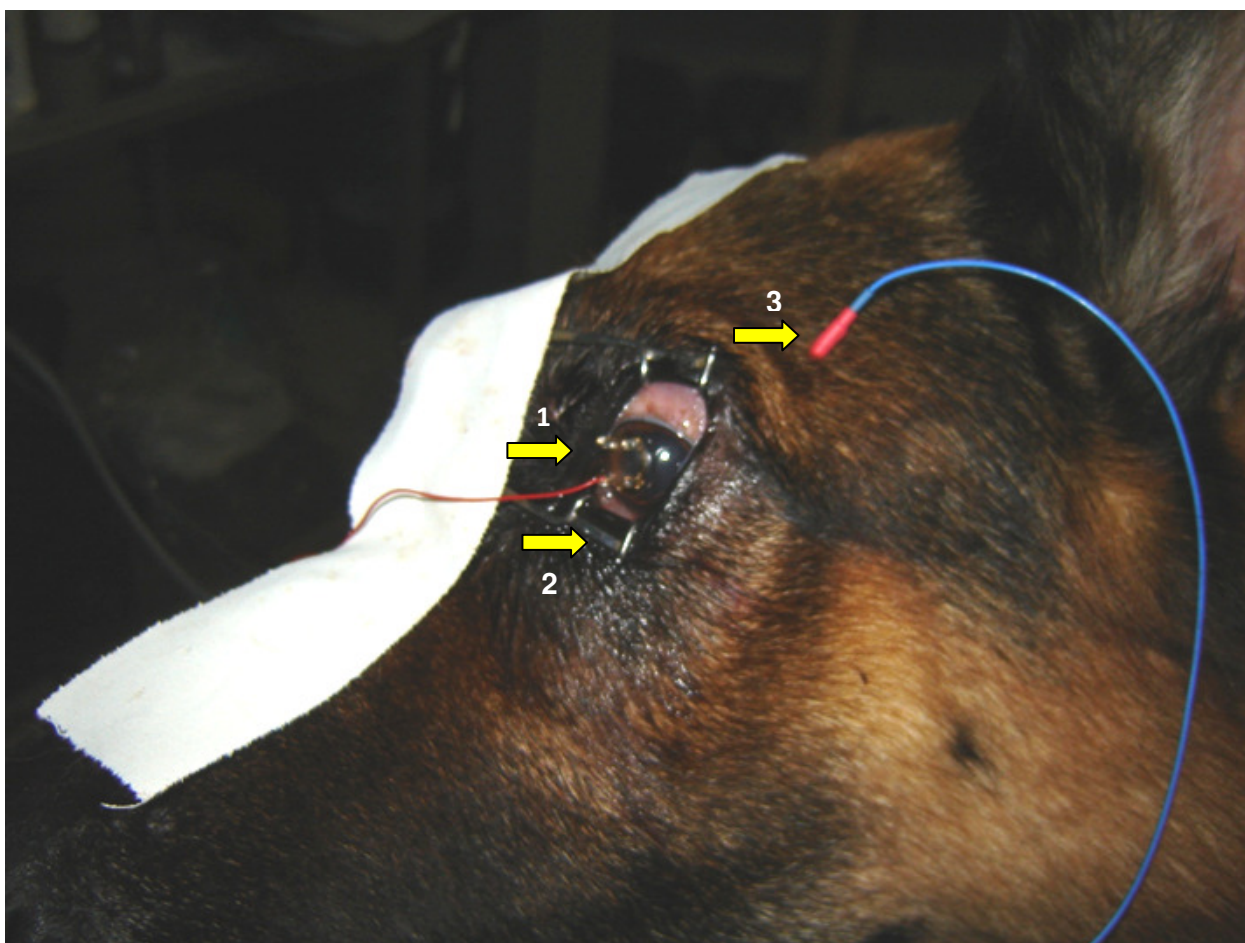


Figura 3.1- Detalhe fotográfico da face de um dos animais (cão da raça Pastor Alemão) investigados, já anestesiado e com os eletrodos posicionados para a realização do ERG. Note as posições dos eletrodos corneano (1), do blefarostato (2) e do eletrodo de referência (3).

Após as avaliações eletrorretinográficas, os dados foram mensurados usando o *software* ERGVIEWER 2.1.1.0 (RetVetCorp, Inc., Missouri, USA) e a análise estatística comparando as respostas obtidas no ERG foi realizada pelo *t*-test, considerando valores de $P < 0,05$ como significativos, usando o programa Statview (SAS Institute Inc. Copyright © 1992-1998).

3.4 Resultados

Não foram observadas diferenças significativas nas amplitudes e nos tempos implícitos ($p > 0,05$) das ondas “a” ou “b” após 30 dias de suplementação com clorofila por via oral nesta dosagem (Tabela 3.1 e 3.2)

Tabela 3.1- Valores médios das amplitudes de ondas “a” e “b” com desvio padrão (DP) antes e após suplementação dietética com clorofila ($p > 0,05$).

	Intensidade do <i>flash</i> (mcd.s/m ²)	Antes		Após	
		Média da amplitude da onda “a” (μV +DP)	Média da amplitude da onda “b” (μV +DP)	Média da amplitude da onda “a” (μV +DP)	Média da amplitude da onda “b” (μV +DP)
Escotópico	3.000	86,8 ± 29,29	204,48 ± 169,43	68,4 ± 15,39	211,62 ± 86,43
	10.000	131 ± 32,24	196,84 ± 101,05	90,6 ± 18,53	217,88 ± 102,76
Fotópico	3.000	9,2 ± 2,17	64,4 ± 27,70	9 ± 4,90	60,18 ± 36,35
	10.000	14,6 ± 5,41	80,24 ± 54,12	15,4 ± 4,45	99,8 ± 68,08

Também não foram observadas diferenças significativas nas frequências respiratória e cardíaca, temperatura retal, pressão arterial média, pressão arterial sistólica e diastólica e saturação de oxigênio parcial na hemoglobina.

Tabela 3.2- Valores médios do tempo implícito de ondas “a” e “b” com desvio padrão (DP) antes e após suplementação dietética com clorofila

	Intensidade do <i>flash</i> (mcd.s/m ²)	Antes		Após	
		Média do tempo implícito da onda “a” (mseg +DP)	Média do tempo implícito da onda “b” (mseg +DP)	Média do tempo implícito da onda “a” (mseg +DP)	Média do tempo implícito da onda “b” (mseg +DP)
Escotópico	3.000	12,92 ± 0,40	24,38 ± 0,87	13,7 ± 0,76	28,48 ± 1,75
	10.000	11,7 ± 0,61	16,9 ± 7,15	12,24 ± 0,78	33,94 ± 7,95
Fotópico	3.000	10,38 ± 1,27	23,52 ± 0,87	11,34 ± 1,42	25,96 ± 4,83
	10.000	15,94 ± 12,90	25,26 ± 1,82	12,32 ± 0,71	27,84 ± 2,61

3.5 Discussão

Como mencionado anteriormente, um estudo com ratos demonstrou que após fazer injeção intravenosa de clorina e6, a ERG destes animais apresentou aumento na amplitude da onda “b” após estímulo com luz vermelha. Com a suplementação com clorina e6, a resposta à luz vermelha como à azul, a amplitude das ondas “b” do ERG dobrou (Washington et al, 2007), fato que não foi observado no presente estudo, podendo este fato ser explicado por não ter sido utilizada a injeção intravenosa de um derivado da clorofila e sim suplementação oral com

clorofila. Possivelmente não ocorreu metabolismo da clorofila em clorina e6 no organismo dos cães. Sabe-se que o derivado da clorofila utilizado pelos peixes do mar profundo para enxergar a luz vermelha pode ser sintetizada pelos próprios animais ou então ser obtida pela dieta por meio da ingestão de bactérias formadoras de clorofila tais como a *Chlorobium chlorophylls 660* e a *Chlorobium chlorophylls 650*, sendo o segundo microorganismo a opção mais plausível (Douglas, 2000).

Outro fator alternativo que pode também ter influenciado a não observação de aumento de ondas no ERG no presente experimento foi a dose empregada que foi de 1,23 gramas diárias de clorofila, sendo que em ratos foi utilizada 2,0 gramas/Kg de um metabólito da mesma. Adicionalmente, como os pesos dos animais variaram a dose total por animal em mg/kg também variou. Por fim, muito embora a dose em mg/Kg tenha sido menor, não foi realizado qualquer cálculo que levasse em consideração o metabolismo dos cães frente ao metabolismo dos ratos, tais como fórmulas de extrapolação alométrica.

Embora uma melhora na função não tenha sido observada, não foi possível descartar a possibilidade de incorporação de um derivado da clorofila na retina nesta investigação. No estudo anteriormente citado realizado em ratos (Washington, 2007) as retinas foram dissecadas e o derivado da clorofila foi localizado por meio de espectometria fluorescente. Na presente pesquisa este procedimento não foi realizado, uma vez que os animais não sofreram eutanásia, sendo que tais informações poderiam ser muito úteis para identificar se o derivado da clorofila também pode ser encontrado na retina de mamíferos maiores e mais complexos, como cães. Em um próximo estudo estas informações poderiam ser investigadas para melhor elucidar o papel da clorofila e seus derivados na sensibilidade da retina à luz vermelha.

Peixes dos mares profundos, devido a pouca penetração de luz solar, são capazes de emitir a bioluminescência e identificar a luz. Embora a amplitude de ondas máxima emitida de forma bioluminescente seja muito parecida com a amplitude de ondas que chega ao fundo do mar (460 a 490 nm), existem exceções, *Malacosteus* sp, *Aristostomias* sp e *Pachystomias* sp são peixes que podem emitir bioluminescência azul e vermelha (700 nm) em uma frequência diferente dos demais peixes. Um experimento conduzido com retinas seccionadas de *Malacosteus niger* mostrou que existem somente dois pigmentos visuais nestas retinas, que absorvem comprimentos de onda de 542 e 517 nm. Outros pigmentos foram encontrados que mostram pico incomum de 667 nm, que é muito próximo a bioluminescência vermelha do *M. Níger*. Segundo o autor, isso pode ocorrer devido ao aumento da sensibilidade que ocorre quando dois pigmentos visuais conhecidos que são insensíveis a luz vermelha são conjugados a um pigmento fotosensibilizador, como, possivelmente, um derivado da clorofila encontrado nas bactérias *Chlorobium chlorophylls* 660 e 650 (Douglas et al, 1999).

A possibilidade da suplementação com derivados da clorofila melhorar e visão noturna no espectro vermelho em mamíferos maiores e filogeneticamente mais complexos tais como cães e seres humanos, é certamente empolgante, uma vez que este espectro de luz não sensibilizada pelos bastões. Este potencial achado poderia ser aplicado posteriormente melhorar a eficiência do trabalho de pessoas que exerçam suas funções em baixa luminosidade tais como guardiões noturnos, mergulhadores, soldados e até mesmo astronautas. Não podemos esquecer que esta melhoria na visão em baixas condições de luminosidade já foi demonstrada em ratos e salamandras (Washington et al, 2007), sendo, portanto uma questão de tempo para esta realidade ser alcançada em seres humanos.

Em cães a suplementação oral não demonstrou qualquer alteração no ERG, nas condições desta investigação, fato que pode estar associado tanto ao método de suplementação que foi utilizado quanto ao desenho experimental empregado. Todavia, seguramente novos estudos poderiam ser realizados com cães e a suplementação neste caso deveria ser feita por via intravenosa com o mesmo composto utilizado por Washington et al (2007), a clorina e6, com doses individualmente calculadas por métodos que levem em consideração as diferentes taxas metabólicas dos animais.

3.6 Referências

BACELLAR, M.; MONTIANNI-FERREIRA, F.; SOMMA, A.T.; BARROS FILHO, I.R. História da eletrorretinografia. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.4, p.285-291, 2008.

BACELLAR, M.; BALDOTTO, S.B.; MONTIANNI-FERREIRA, F. Observações clínicas e eletrorretinográficas em cães com perda súbita de visão. **Revista MEDVEP** 7(23); p. 481-483, 2009.

DOUGLAS, R.H.; PARTRIDGE, J.C.; DULAI, K.S.; HUNT, D.M.; MULLINEAUX, C.W.; HYNINEN, P.H. Enhanced retinal longwave sensitivity using a chlorophyll-derived photosensitizer in *Malacosteus niger*, a deep-sea dragon fish with far red bioluminescence. **Vision Research**, v. 39, p.2817-2832, 1999.

DOUGLAS, R.H.; MULLINEAUX, C.W.; PARTRIDGE, J.C. Long-wave sensitivity in deep-sea stomiid dragonfish with far-red bioluminescence: evidence for a dietary

origin of the chlorophyll-derived retinal photosensitizer of *Malacosteus niger*.
Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological. v.355, p.1269-
1271, 2000.

ogyTURRO, **New Jersey Nature**, v. 443, p. 649, 2006.

WASHINGTON, I.; ZHOU, J.; JOCKUSCH, S.; TURRO, N.J.; NAKANISHI, K.;
SPARROW, J.R. Chlorophyll derivatives as visual pigments for super vision in the red.
Photochemistry and Photobiology Science. v. 6, p. 775-779, 2007.

4. USO DA LUTEÍNA EM ANIMAIS E PESSOAS

Resumo

A degeneração macular relacionada à idade e catarata nuclear senil são as principais causas de cegueira irreversível e reversível, respectivamente, em pessoas sendo que tais doenças estão relacionadas ao estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio formadas neste processo podem ser combatidas com substâncias antioxidantes, como os carotenóides. A luteína é um carotenóide, não convertido em vitamina A, encontrado em vegetais folhosos verde escuros e em algumas frutas. Estudos mostram que a luteína, presente na mácula e retina de seres humanos, é capaz de prevenir e tratar doenças degenerativas oculares como as citadas anteriormente. Em cães e gatos o uso deste carotenóide demonstrou estimular o sistema imune aumentando muitas respostas imunológicas após desafios.

PALAVRAS-CHAVE: carotenóide, antioxidante, imunidade

4.1 The use of lutein dietary supplementation in animals and human beings

Abstract

Age related macular degeneration and senile nuclear cataracts are important causes of blindness in human beings, and both these illnesses are associated to oxidative stress. The reactive species of oxygen made in these processes can be annulated by antioxidants like carotenoids. Lutein is a carotenoid, found in dark green vegetables and in some fruits. Some studies show that lutein, which are present in the human macula and in the retina, can help treating and preventing some degenerative illnesses, like senile nuclear cataracts and age related macular degeneration. In dogs and cats the use of this carotenoid was shown to stimulate the immune system, increasing the immunologic answers after challenges.

Key words: carotenoid, antioxidant, immunity

4.2 Introdução

A nutrição possui um grande efeito na imunidade e saúde dos animais. O grupo de vitaminas composto por vitamina E, vitamina C e carotenóides possuem atividades antioxidantes potentes contra espécies altamente reativas como o radical anion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH \cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (O_2), que são continuamente produzidos pelo metabolismo aeróbico celular.

A luteína, assim como a zeaxantina, é um carotenóide mais polar que a maioria dos carotenóides devido ao fato de possuir grupos hidroxilas no anel cíclico com duplas ligações conjugadas que agem como antioxidantes. Este carotenóide não pode ser convertido em vitamina A e sua presença nos tecidos animais é devido a ingestão de plantas, uma vez que não é sintetizado nos tecidos animais (Khachik et al.,1997) A luteína pode ser encontradas em vegetais verdes como espinafre e a couve e também em algumas frutas, como o abacate. No plasma de pessoas, os principais carotenóides encontrados são os β -carotenos, junto com o licopeno. A luteína é encontrada em vegetais com folhas verde-escuro como couve e espinafre, e vários estudos mostram que a concentração deste carotenóide é superior do que a de β -caroteno (Castenmiller, 1999) embora outros estudos afirmem o oposto (Chopra,2000).

Pesquisas mostram que os carotenóides, observados no plasma de seres humanos, não são encontrados no plasma de canídeos domésticos. Outros estudos relatam existir pequena quantidade de β -caroteno no sangue de cães (Chew, 2000). Na macula da retina de seres humanos encontra-se somente luteína e zeaxantina em exclusão de outros carotenóides, e é o local onde se encontra a maior proporção destes compostos (Schmitz et al., 1993). A luteína é transportada no sangue por lipoproteínas, principalmente pelo HDL. Evidências sugerem que a luteína chega até a retina, onde tem principal sítio de ação, carregada pelo HDL. Recentes estudos mostram que algumas espécies de HDL que contêm apolipoproteína E carregam luteína e zeaxantina para a retina (Jonhson et al., 2008). Esta revisão teve por finalidade relatar o uso da luteína em animais e em pessoas, demonstrando sua importância para a medicina e para a medicina veterinária.

4.3 Desenvolvimento

4.3.1 Prevenção do desenvolvimento de catarata e degeneração macular

A luteína, bem como a zeaxantina, pode reduzir o risco e retardar o desenvolvimento de duas doenças oculares em seres humanos: catarata e degeneração macular. Estas doenças ocorrem porque o estresse oxidativo é alto devido a alta intensidade de luz e também devido a alto metabolismo que a retina possui. As propriedades antioxidativas da luteína retardam tal estresse, pois diminuem a quantidade de oxigênio que penetra nas membranas (Young et al.,2001).

A luteína e o β -caroteno eliminam radicais peróxidos e demonstram propriedades antioxidantes em testes realizados *in vitro* (Sujak,1999). Devido às propriedades antioxidantes anteriormente citadas, a luteína, assim como outros carotenóides, diminui o risco de doenças cardíacas. A luteína pode diminuir a adesão de moléculas na superfície do endotélio da carótida de seres humanos, bem como diminuir a adesão de monócitos *in vitro* em modelo de artéria (Martin et al.,2001. Dwyer et al.,2001).

Os radicais livres - moléculas independentes com dois ou mais elétrons pareados nos orbitais externos, são produzidos durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas reações bioquímicas. O fato de ter elétrons livres nos orbitais externos faz com esta molécula seja altamente reativa e possua ação oxidante. As organelas citoplasmáticas, onde ocorre a maioria das reações bioquímicas, produzem alta quantidade de radicais

livres quando metabolizam oxigênio, nitrogênio e cloro. Os radicais livres quando produzidos em excesso podem causar danos celulares que levam a varias doenças e para prevenir o organismo da ação deletéria desses são utilizadas moléculas antioxidantes. Os antioxidantes conhecidos são a vitamina C, a glutathione, o ácido úrico e os carotenóides. Dentro os radicais livres o radical hidroxila é o mais reativo na indução de lesões nas células (Shami e Moreira, 2004).

A luteína é um carotenóide capaz de dissipar a energia dos radicais livres e seqüestrar o oxigênio singlete, protegendo assim as membranas protéicas, moléculas de lipídios, proteínas de baixa densidade, proteínas e o DNA celular dos ataques dos radicais livres como no caso da degeneração macular ligada a idade. Segundo Dagnelie et al.(2000) este pigmento protege os fotorreceptores foveais ao filtrar a luz azul prejudicial à mácula, reduzindo em 40% a incidência da luz danosa à retina.O princípio da proteção conferida pela luteína contra reações de fotossensibilização baseia-se num mecanismo de transferência de energia, que devolve o oxigênio singlete ao seu estado basal. O retorno da luteína triplete ao seu estado original, pela dissipação de energia na forma de calor, torna possível a reação com outro oxigênio singlete.

As reações em cadeia dos radicais peróxidos podem ser interrompidas pelos carotenóides através de três possíveis mecanismos: por transferência de elétrons, doação de hidrogênio ou por adição. Sob uma tensão adequada de oxigênio o curso das reações se completa.

4.3.2 Estímulo da imunidade em cães e gatos

A luteína pode ser adicionada na dieta estimulando assim a resposta humoral e mediada por células. Um estudo realizado com cães mostrou aumentou

da concentração da luteína plasmática após 12 semanas de suplementação. Houve aumento também na proliferação de linfócitos e na porcentagem de células que expressam CD5, CD4, CD8 bem como a expressão de complexos MHC de classe II. Nos cães submetidos a desafio vacinal houve aumento da produção de IgG e não em nada afetou a produção de IgM ou IL-2. Também houve aumento na resposta de hipersensibilidade tardia após 6 e 12 semanas de suplementação com luteína a 20 mg por dia (Kim et al.,2000).

Felinos suplementados com luteína na dieta mostraram aumento na concentração da luteína plasmática. A concentração de IgG aumentou significativamente até 8 semanas em gatos suplementados com 1mg e até 12 semanas em gatos que ingeriram 10 mg diariamente. Assim como foi mostrado em cães, a hipersensibilidade tardia aumentou até 6 semanas após o tratamento porem não persistiu ate 12 semanas. Houve proliferação de linfócitos e aumento nas células que expressam CD4 e CD21, mas neste estudo não foi mostrado alteração na contagem de IL-2 (Kim et al.,2000). Em um estudo realizado por Hughes et al. (2000) a luteína não demonstrou poder de aumentar o numero de monócitos, enquanto o β -caroteno apresentou tal resultado.

Três estudos conduzidos por Chew et al, (2000) mostraram que após administração oral de β -caroteno o pico plasmático deste antioxidante foi entre 12 e 24 horas, sendo a meia-vida entre 12 e 30 horas. Após o sétimo dia de alimentação com β -caroteno, observou acúmulo de 40 a 52% deste nas mitocôndrias de leucócitos com pequenas quantias nos microssomos, citosol e núcleo. Gatos domésticos podem absorver o β -caroteno através da membrana intestinal e então transferir para leucócitos periféricos sanguíneos e suas organelas.

Estudos semelhantes realizados por Chew et al, (2000) com cães da raça beagle demonstrou aumento de neutrófilos e linfócitos em cães suplementados com β -caroteno. Os cães também mostraram capacidade de absorver o beta caroteno e transferi-lo para citosol, mitocôndrias e núcleo de linfócitos e neutrófilos.

O β -caroteno aumenta o numero de células *T helper* e aumenta a expressão de receptores de IL-2 em células *natural killer* (Alexander et al, 1989). O β -caroteno também aumenta a proliferação e indução de células T citotóxicas em ratos (Seifter, 1982).

4.3.3 Prevenção de doenças tumorais

A luteína é um carotenóide encontrado no plasma de seres humanos e de alguns animais e possui propriedades capaz de modular a imunidade e prevenir e tratar algumas doenças: tumores mamários tiveram crescimento interrompido em ratos tratados com luteína (Chew et al., 1996). Também em ratos foi observado prevenção da peroxidação lipídica (Stahl et al., 1996). Park et al.,(1998) demonstraram que ratos suplementados com 0,02% de luteína tiveram diminuição na freqüência de tumores mamários, bem como no crescimento e latência dos mesmos.

Carotenóides como α -caroteno, β -caroteno e luteína, mas não o licopeno, estão associados com a diminuição dos riscos de cânceres do epitélio, como da cavidade oral, faringe, laringe, pulmão, esôfago, estômago, pâncreas e cérvix. O licopeno mostrou associação com a diminuição do câncer de próstata (Giovanucci et al.,1995).

Os carotenóides diminuem o risco de surgimento de câncer devido ao fato de removerem radicais livres, sendo antimutagênicos e proporcionando melhora no sistema imune. Sllatery et al., mostraram que pacientes que possuíam câncer de cólon melhoraram com luteína.

4.3.4 Degeneração macular relacionada à idade (DMRI)

A degeneração macular relacionada a idade (DMRI) é a causa mais comum de cegueira em pessoas idosas de países desenvolvidos. Nesta doença ocorre um desequilíbrio de mediadores angiogênicos, peptídeos, citocinas e proteínas.

Muitos são os tratamentos propostos para a DMRI como: fotocoagulação a laser, translocação macular, cirurgia submacular, protrombose mediada por indocianina. O primeiro agente terapêutico aprovado pelo FDA é o aptâmero pegaptanib sódio (Macugen®), que inativa a isoforma fundamental para a angiogênese intra-ocular: VEGF165. Também existem outros inativadores de VEGF como ranibizumab RhuFab V2 (Lucentis®) e bevacizumab (Avastin®) (Rodrigues et al., 2006).

Estudos sugerem que esta doença esta relacionada a espécies reativas de oxigênio e que carotenóides como a luteína e a zeaxantina protegem a mácula de seres humanos de danos oxidativos (Ward et al., 2008). Muitos estudos epidemiológicos demonstram a relação inversamente proporcional que existe entre o consumo de uma dieta rica em antioxidantes- vitamina C e vitamina E, e o desenvolvimento da catarata nuclear (Leske, 1991). Olhos autopsiados que

apresentavam degeneração macular continham 30% menos luteína que olhos normais (Landrum et al, 1996).

A luteína e a zeaxantina são os únicos carotenóides que estão concentrados na macula e nas lentes do olho humano. A densidade do pigmento macular esta diretamente associada com a acuidade visual e inversamente associada com a densidade das lentes. A densidade do pigmento macular pode ser aumentada pela ingestão de vegetais contendo luteína, como o espinafre, e também pela suplementação desta. A baixa densidade do pigmento é um fator de risco para o desenvolvimento da degeneração, pois permite um maior dano causado pela luz azul (Larson et al., 2009). A densidade do pigmento macular também pode ser aumentada com suplementação dietética de luteína por 80 dias (Landrum et al., 1996). Também Johnson et al., 2008 observaram aumento na densidade do pigmento macular após suplementação de luteína com ácido docosahexaenóico durante 4 meses. A luteína aumenta a densidade ecentricamente enquanto que o ácido docosahexaenoico aumenta no centro. Em suplementações feitas por 140 dias observou-se aumento entre 21 e 39% na densidade do pigmento macular, que correspondeu a 30 a 40% menos danos na retina resultante da luz azul, aumentando a absorbância de luz em $1,13 \pm 0,12$ unidades de miliabsorbancia/ dia (Landrun et al., 1997)

A luteína e a zeaxantina possuem a capacidade de se ligar aos radicais hidroxila e superóxido, protegendo as células epiteliais da lente contra a peroxidação lipídica induzida por raios ultravioleta. A quantidade de carotenóides presente na retina e na lente são reflexo da densidade ótica destes carotenóides na mácula ocular (Moeller et al., 2008).

A alta ingestão de luteína e zeaxantina esta relacionada com um menor risco de desenvolver degeneração macular. Também diminui em 19% em homens e 22% em mulheres o risco de desenvolver catarata (Seddon et al., 1994).

Em diabéticos as concentrações séricas de luteína/zeaxantina e licopeno e as concentrações de luteína e zeaxantina na retina ficam diminuídas (Em adultos jovens a retinopatia relacionada a diabetes é a causa mais comum de cegueira. A hiperglicemia aumenta o estresse oxidativo gerando espécies reativas de oxigênio na retina. Pessoas e animais diabéticos possuem maior concentração do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na retina e no vítreo sendo este aumento relacionado com a retinopatia diabética. Em diabéticos também observa-se elevados níveis de moléculas de adesão ICAM – 1, bem como outros fatores inflamatórios (Kowluru et al, 2008).

Um estudo desenvolvido pelo AREDS (*Age-Related Eye Disease Study*) mostrou que a combinação de vitamina C 500 mg, vitamina E 400UI, beta caroteno 15 mg, óxido de zinco 80 mg e óxido cúprico diminuiu o risco da progressão da DMRI em 25% e diminuiu o risco de diminuição da visão em 27% (Cho et al., 2001)

4.3.5 Catarata relacionada à idade em seres humanos

A catarata relacionada à idade é um distúrbio que ocorre no cristalino, sendo mais comum conforme aumenta a idade. O cristalino possui um centro com baixa exposição ao oxigênio, sendo exposto ao estresse ambiental e também ao estresse do próprio olho em si. Os mecanismos que iniciam a formação deste tipo de catarata

são desconhecidos, muito embora estudos indiquem que cada tipo de catarata tenha uma patofisiologia própria (Andley et al, 2000)

Uma das principais causas da catarata nuclear senil é o estresse oxidativo, que ocorre quando danos e mudanças ocorrem no cristalino do olho devido a oxidação. As principais espécies reativas de oxigênio são: radical ânion superóxido (O_2^-), H_2O_2 e radical hidroxila (OH \cdot). Também ocorre formação de oxigênio singlete, devido à fotoxidação. O ânion superóxido é formado na mitocôndria, durante a cadeia transportadora de elétrons ou durante o processo de inflamação. Este radical liga-se a proteínas causando perda de função biológica. O radical hidroxila pode reagir com lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. O peróxido de hidrogênio tem a habilidade de atravessar membranas e danificar células, sendo considerado como a espécie reativa mais comum e mais prejudicial para os sistemas biológicos, inclusive para o cristalino (Eagle e Spencer, 1997)

Para reparar os danos oriundos da oxidação, as lentes possuem sistemas enzimáticos, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalases, além de sistemas não enzimáticos como as vitaminas E e C, glutathione e carotenóides. Tais sistemas anteriormente citados podem destruir proteínas defeituosas e também reparar os ácidos nucleicos. A enzima tioltransferase tem o poder de manter as lentes reduzidas por clivar pontes dissulfeto formadas na oxidação das proteínas do cristalino. Entre os antioxidantes moleculares a glutathione é a mais importante (GSH) e também se encontra em abundância nas lentes, porém conforme a idade de uma pessoa vai avançando a síntese de GSH declina e predispõe ao surgimento de danos oriundos do estresse oxidativo. Um cristalino com catarata relacionada a idade possui depleção de 60% de sua GSH (Andley et al, 2000).

Muitas são as evidências que relacionam este tipo de catarata com a oxidação. A seguir serão discutidas algumas destas evidências.

1) Danos às proteínas do cristalino.

Em lentes jovens não são observados sinais de oxidação nas proteínas citosólicas ou de membrana, enquanto que em lentes com mais idade são observado sinais de oxidação nas proteínas de membrana.

2) Danos aos mecanismos de defesa

Observa-se perda de 60% de glutathione em lentes de pessoas acima de 70 anos de idade.

3) Danos às membranas.

Ocorre oxidação das membranas lipídicas em lentes com catarata. Nestas pode-se observar aumento de esfingomielina e diminuição da fosfatidilcolina que aumenta a rigidez das membranas. Tais mudanças, entre outras, podem influenciar e alterar a função de algumas enzimas que estão associadas a membrana plasmática como a Na^+K^+ ATPase e Ca^{2+} ATPase (Eagle e Spencer, 1997)

Um estudo conduzido por Moeller et al.(2008) mostrou que mulheres entre 50 e 79 anos que consumiram uma dieta com luteína e zeaxantina durante 7 anos mostrou prevalência 23% menor no desenvolvimento de catarata nuclear. Entre estas mulheres as que consumiram uma quantidade maior da mistura dos carotenóides luteína e zeaxantina obtiveram 32% menos chances de desenvolver catarata nuclear. Este estudo mostra que dietas ricas em luteína e zeaxantina apresentam moderado decréscimo na prevalência do desenvolvimento da catarata nuclear. A catarata nuclear é o tipo de catarata mais comum entre americanos

idosos e também a causa mais comum de procedimentos cirúrgicos realizados devido às cataratas.

4.4 Conclusões

A luteína é um carotenóide encontrado na natureza em frutas e verduras com alto poder antioxidante. Por se ligar a radicais livres no olho de ser humano previne duas das principais causas de cegueira no mundo: catarata nuclear senil e degeneração macular relacionada à idade. Em cães e gatos observa-se aumento na resposta imune. Alimentos industrializados adicionados de luteína estão à venda no mercado com a promessa de reduzir ou prevenir o surgimento de cataratas, porém nada há descrito sobre seu uso em doenças oculares destes animais. Inicialmente cabe aqui ressaltar que a degeneração macular não ocorrer em pequenos animais. Além disso, muitos veterinários prescrevem a luteína no combate à atrofia de retina progressiva, uma doença de cunho genético com etiologia completamente diferente da degeneração macular. Portanto, estudos oftálmicos com animais devem ser feitos para verificar se a luteína também tem poder de prevenir e tratar quaisquer doenças oculares em cães e gatos.

4.5 REFERÊNCIAS

ALEXANDER, M., NEWMARK, H. MILLER, R.G. Oral beta-carotene can increase the number of OKT41 cells in human blood. **Immunology**. v. 9, p. 221–224.1985.

ANDLEY, U.P., LIANG, J.J.N., LOU, M.F. Biochemical mechanisms of age-related cataract. In: ALBERT D.M; JAKOBIEK, F.A. **Principles and Practice of Ophthalmology**. 2.ed. Philadelphia : W.B. Saunders. Cap. 102. p. 1428-1449. 2000.

BONATTO, S.J.R., FOLADOR, A., AIKAWA, J., YAMAZAKI, R.K., PIZATTO, N., OLIVEIRA, H.H.P., VECCHI, R., CURI, R., CALDER, P.C., FERNANDES, L.C. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cellular Immunology** v. 231, p. 56–62. 2004.

CASTENMILLER J.J., WEST C.E., LINSSEN J.P., VAN HET HOF K.H., VORAGEN A.G. The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of beta-carotene and to a lesser extent of lutein in humans. **The Journal of Nutrition** v. 129 p. 349–355. 1999.

CHEW, B.P.; PARK, J.S.; WENG, B.C.; WONG, T.S.; HAYEK, M.G.; REINHART, G.A. Dietary b-Carotene Absorption by Blood Plasma and Leukocytes in Domestic Cats. **The Journal of Nutrition**. 2000.

CHEW, B.P.; PARK, J.S.; WENG, B.C.; WONG, T.S.; HAYEK, M.G.; REINHART, G.A. Dietary b-Carotene Is Taken up by Blood Plasma and Leukocytes in Dogs. **The Journal of Nutrition**. 2000.

CHEW, B.P.; WONG, M.W.; WONG, T.S. Effects of lutein from marigold extract on immunity and growth of mammary tumors in mice. **Anticancer Research**. v.16,p. 3689 – 3694, 1996.

CHO, E.; HUNG, S.; WILETT, W.C.; SPIEGELMAN, D.; RIMM, E.B.; SEDDON J.M.. Prospective study of dietary fat and the risk of age-related macular degeneration. **The American Journal of Clinical Nutrition** v.73 p.209-18, 2001.

CHOPRA M, O'NEILL M.E; KEOGH N; WORTLEY G; SOUTHON S; THURNHAM D.I. Influence of increased fruit and vegetable intake on plasma and lipoprotein carotenoids and LDL oxidation in smokers and nonsmokers. **Clinical Chemistry**. v. 46, p.1818–1829, 2000.

DAGNELIE, G.; ZORGE, I.; MCDONALD, T. M. Lutein improves visual function in some patients with retinal degeneration: a pilot study via the internet. **Optometry**, v. 71, p. 147-164, 2000.

EAGLE, R.C.Jr.; SPENCER, W.H. Lens. In: **Ophthalmic pathology**. 4ed. Filadélfia: W.B Saunders. p. 372-437. 1997.

GIOVANUCCI, E.; ASCHERIO, A.; RIMM, E.B.; STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.A.; WILLETT, W.A.; Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 87, p.1767–1776. 1995.

HUGHES, D. A; WRIGHT, A.J.A; FINGLAS, P. M; POLLEY, A.C.J; BAILEY, A. L; ASTLEY, S. B. Effects of lycopene and lutein supplementation on the expression of functionally associated surface molecules on blood monocytes from healthy male nonsmokers. **Journal of Infectious Disease**. v. 182: p.11–15. 2000.

JOHNSON, E.J; CHUND, HY; CALDARELLA, S.M; SNODDERLY, D.M. The influence of supplemental lutein and docosahexaenoic acid on serum, lipoproteins, and macular pigmentation. **The American Journal of Clinical Nutrition**. V. 87, p. 1521–1529, 2008.

KIM, H.W; CHEW, B.P; WONG, T.S; PARK, J.S; WENG, B.B.C; BYRNE, K.M; HAYEK, M.G; REINHART, G.A. Dietary lutein stimulates immune response in the canine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.74, p. 315-327, 2000.

KIM, H.W.;CHEW, B.P.;WONG, T.S.; PARK, J.S.; WENG, B.B.C.; BYRNE, K.M.; HAYEK, M.G. Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by dietary lutein in cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v. 73, p. 331-341, 2000.

KHACHIK, F; BERNSTEIN, P. & GARLAND, D. L. Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** v.38, p. 1802–1811, 1997.

KOWLURU R.A; MENON B. ,GIERHART D.L. Beneficial Effect of Zeaxanthin on Retinal Metabolic Abnormalities in Diabetic Rats. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** v. 49, n. 4, 2008.

LANDRUM, J. T; BONE, R. A. AND KILBURN, M. D. The macular pigment: a possible role in protection from age-related macular degeneration. **Antioxidants in disease mechanisms and therapy adv. pharmacol.** (Ed. Sies, H.). p. 537, 1996.

LANDRUM J.T; BONE, R.A; JOA, H. KILBURN, M.D. MOORE, L.L; SPRAGUE, K.E. **Eye Research**. v. 65, p 57-62, 1997.

LARON, T; COKER, **Journal of Optometry**, V. 80, N. 10, 2009.

LESKE, M.C; CHYLACK, L.T; WU S.Y. The Lens Opacities Case-Control Study. Risk factors for cataract. **Archives of Ophthalmology** v.109, p. 244–251,1991

PARK, J. S; CHEW, B. P.; WONG, T. S. Dietary lutein from marigold extract inhibits mammary tumor development in BALB/c mice. **Journal of Nutrition**. v. 128, p. 1650–1656, 1998.

RODRIGUES, E.B; ROSSI, E.E; JUNIOR, A.G; MEYER, C.H; HO, A.C. Tratamento da forma neovascular de degeneração macular relacionada à idade com drogas antiangiogênicas. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**. V. 69(5) p. 756-65, 2006.

SCHMITZ , H. H; POOR, C. L; GUGGER, E. T; ERDMAN, J. W. Analysis of carotenoids in human and animal tissues. **Methods in Enzymology**. v. 214, p. 102–116,1993.

SEDDON J..M; AJANI U.A; SPERDUTO R.D. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. **Journal of the American Medical Association** v. 272(18) p.1413-1420, 1994.

SEIFTER, E; RETTARA, G; PADAWER, J; LEVENSON, S. M. Moloney murine sarcoma virus tumors in CBA/J mice: chemopreventive and chemotherapeutic actions of supplemental beta-carotene. **Journal of National Cancer Institute** v. 68, p. 835–840, 1982.

SHAMI, N.J.I.S.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Review of Nutrition**. v, 17(2), p.227-236, 2004.

STAHL, W.; JUNGHAUS, A.; BOER, A.B.; DRIOMINA, E.S.; BRIVIBA, K.; SIES, H. Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. **FEBS Lett**. v. 427,p. 305-308, 1998.

STRINGUETA, P.C.; NACHTIGALI, A.M.; OLIVEIRA, T.T.; RAMOS, A.M.; SANT`ANA, H.M.P.; GONÇALVES, M.P.J.C. Luteína: propriedades antioxidantes e benefícios a saúde.**Alimentos e Nutrição**. Araraquara v.17, n.2, p.229-238, 2006.

WARD, M.S; ZHAO, D.Y; BERNSTEIN, P.S. Macular and serum carotenoid concentrations in patients with malabsorption syndromes. **J Ocul Biol Dis Infor.** v.1(1), p. 12–18, 2008.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v. 385, p. 20–27, 2001

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da eletrorretinografia em animais no Brasil ainda é recente e necessita de muitos estudos. No que diz respeito a anestesia para este procedimento, muitos são os protocolos que podem ser utilizados, contudo o estudo com anestesia peribulbar em cães mostrou que esta técnica pode ser utilizada para se obter uma excelente centralização do globo ocular sem abolir a resposta eletrorretinográfica, tornando-se então muito útil para oftalmologistas e anestesistas, que podem escolher por opções mais seguras de anestesia geral sem interferir no exame eletrorretinográfico. Neste experimento observou-se um interessante aumento na amplitude de onda “a”, sendo, no entanto necessários para estudos para elucidar o mecanismo fisiológico que fez com que este evento acontecesse.

O uso da clorofila, neste estudo, não demonstrou alterações significativas nas respostas eletrorretinográficas. A não modificação pode ser devido ao desenho experimental e doses utilizadas. No entanto, sabemos que ratos e salamandras têm sua visão melhorada no escuro, em especial por conseguirem enxergar a luz vermelha – que não sensibiliza os bastões de mamíferos. De fato novos estudos são necessários para que possamos avaliar se esta condição também é válida para mamíferos superiores.

O uso da luteína é comprovadamente eficaz em seres humanos para combater e tratar doenças degenerativas oculares. Em animais, poucos são os estudos com este componente, sendo estes voltados para a resposta imune. Na

oftalmologia veterinária não existem estudos utilizando a luteína, muito embora produtos comerciais estejam sendo vendidos com a promessa de melhora nas condições de esclerose nuclear do cristalino em cães. Fazem-se necessários estudos que avaliem se a luteína possui os mesmo benefícios quando utilizada em cães e gatos.

6. ANEXOS

Veterinary Ophthalmology (2010) 13,6, 407- 423

Abstracts: 41st Annual Meeting of the American College of Veterinary Ophthalmologists, San Diego, CA, USA. October 6-9, 2010

ABSTRACT NO.: 038

The effects of lidocaine peribulbar block on dog scotopic ERGs

M Bacellar, T Charello, L Bevilacqua and F Montiani-Ferreira
Medicina Veterinária, UFPR, PR, Brazil

Purpose: To investigate possible ERG response changes after lidocaine peribulbar anesthesia. **Methods:** Eleven German Shepherd dogs (eight males and three females with a mean age of 3 years) were used. Acepromazine (0.05 mg/kg IV) was used as pre-medication. Anesthesia was induced with tiletamine/zolazepan (5 mg/kg IM) associated with diazepam (0.5 mg/kg IM). Electroretinograms (ERGs) (HMsERG; RetVetCorp, Inc., MO, USA) were performed after a 20 min dark adaptation. Flash intensities for scotopic ERG analyzed were: 3000 and 10 000 mcd.s/m². After the first ERG protocol, peribulbar blocks using 2% lidocaine were performed, under red light illumination, using the double trans-conjunctival injection technique (with a 25 mm, 25G needle). Mean injection volumes used were 4.73 mL in the superior point and 4.43 mL in the lower point. The same ERG protocol was repeated 20 min after the first ERG protocol and 8 min after the peribulbar block. Statistical analyses were performed using a *t*-test. **Results:** The following changes were observed: An increase of the mean a-wave amplitude with intensities of 3000 and 10 000 mcd.s/m² (from 80.9 ± 23.5 to 142.2 ± 74.4 μV and 115.2 ± 30.7 to 148.7 ± 32.7 μV, respectively), a decrease of the mean a-wave implicit time (from 13 ± 0.6 to 11.8 ± 1.1 msec and 11.6 ± 0.5 to 10.6 ± 0.7 msec) and an increase of the mean b-wave implicit time (from 17.4 ± 7 to 24.4 ± 3.4 msec) with a 10 000 mcd.s/m². **Conclusions:** Peribulbar block with lidocaine caused an unexpected increase in a-wave ERG responses.