

SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA-3 PÓS-RECONSTRUÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR



ARTIGO ORIGINAL
ORIGINAL ARTICLE
ARTÍCULO ORIGINAL

SUPPLEMENTATION WITH OMEGA-3 AFTER RECONSTRUCTION OF THE ANTERIOR CRUCIATE LIGAMENT

SUPLEMENTACIÓN CON OMEGA-3 DESPUÉS DE LA RECONSTRUCCIÓN DEL LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR

Marlon Francys Vidmar¹
(Fisioterapeuta)

Luciano Oliveira Siqueira²
(Farmacêutico)

Verônica Bidinotto Brito¹
(Fisioterapeuta)

César Antônio de Quadros Martins³
(Médico)

Gilnei Lopes Pimentel²
(Fisioterapeuta)

Carlos Rafael de Almeida²
(Fisioterapeuta)

Luis Henrique Telles da Rosa¹
(Fisioterapeuta)

Marcelo Faria Silva¹
(Fisioterapeuta)

1. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

2. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

3. Hospital Ortopédico de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

Correspondência:

Rua José Bianchini, 77, São Pedro, 99930-000, Estação, RS, Brasil.
marlonfrancys@msn.com

RESUMO

Introdução: As lesões do ligamento cruzado anterior (LCA) contribuem para a formação de radicais livres de oxigênio que, em excesso, podem desencadear dano oxidativo na articulação do joelho. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da suplementação oral com ômega-3 sobre marcadores de estresse oxidativo em indivíduos submetidos à reconstrução do LCA. **Métodos:** Este estudo é um ensaio clínico prospectivo, randomizado, controlado e simples cego, com amostra de 25 indivíduos submetidos à reconstrução do LCA, separados aleatoriamente em: grupo ômega-3 (GO), suplementado diariamente com 2 g de ômega-3 durante 15 dias pós-reconstrução do LCA e grupo controle (GC), não suplementado. Foi realizada coleta de sangue e de líquido sinovial imediatamente antes do procedimento cirúrgico e 15 dias pós-reconstrução do LCA. As análises bioquímicas avaliaram os níveis de produtos de lipoperoxidação (MDA); atividade da catalase; grupos sulfidrílicos totais e polifenóis e proteína C reativa (PCR). **Resultados:** Observou-se diminuição significativa nos níveis de MDA no GO em comparação ao GC ($p < 0,05$), da mesma forma que a atividade da enzima antioxidante catalase foi significativamente menor no GO quando comparado ao GC ($p < 0,001$). Também foram observados níveis significativamente elevados de grupos sulfidrílicos totais no plasma dos indivíduos suplementados quando comparados aos do GC ($p < 0,001$). Além disso, foram observados níveis significativamente maiores de polifenóis ($p < 0,05$) tanto no plasma quanto no líquido sinovial dos indivíduos que receberam ômega-3 no período pós-cirúrgico comparado ao pré-cirúrgico. Entretanto, não foi observado um efeito protetor da administração do ômega-3 sobre a função anti-inflamatória. **Conclusão:** Verificamos um efeito protetor do ômega-3 na modulação dos marcadores de estresse oxidativo em indivíduos submetidos à reconstrução do LCA.

Descritores: joelho; ligamento cruzado anterior; suplementos nutricionais; ácidos graxos ômega-3.

ABSTRACT

Introduction: The injuries of the anterior cruciate ligament (ACL) contribute to the formation of oxygen free radicals, which in excess can trigger oxidative damage in the knee joint. **Objective:** To evaluate the effects of oral supplementation with omega-3 on markers of oxidative stress in individuals undergoing ACL reconstruction. **Methods:** This study is a prospective, randomized, controlled, and single blinded clinical trial, with a sample of 25 patients who underwent ACL reconstruction, randomly assigned to: Omega-3 group (OG), supplemented daily with 2 g of omega-3 for 15 days after ACL surgery; and Control group (CG), without supplementation. Blood and synovial fluid collection was performed immediately before the surgical procedure and 15 days after ACL reconstruction. The biochemical analyses assessed the levels of lipid peroxidation products (MDA); catalase activity; total sulfhydryl groups and polyphenols and C-reactive protein (CRP). **Results:** We verified a significant decrease in the levels of MDA in the OG compared to the CG ($p < 0.05$) and, similarly, that the catalase antioxidant enzyme activity was significantly lower in the OG when compared to the CG ($p < 0.001$). We also observed significantly elevated levels of total sulfhydryl groups in plasma in supplemented individuals when compared to the CG ($p < 0.001$). In addition, significantly higher levels of polyphenols ($p < 0.05$) were observed in both plasma and synovial fluid of individuals who received omega-3 in the post-surgical period compared to pre-surgical. However, no protective effect was observed with the administration of omega-3 on the anti-inflammatory function. **Conclusion:** The findings suggest that there is a protective effect of omega-3 on the modulation of oxidative stress markers in individuals undergoing ACL reconstruction.

Keywords: knee; anterior cruciate ligament; dietary supplements; fatty acids, omega-3.

RESUMEN

Introducción: Las lesiones del ligamento cruzado anterior (LCA) contribuyen a la formación de radicales libres de oxígeno, que en exceso pueden desencadenar daño oxidativo en la articulación de la rodilla. **Objetivo:** Evaluar los efectos de la suplementación oral con ácidos grasos omega-3 en los marcadores de estrés oxidativo en pacientes sometidos a reconstrucción del LCA. **Métodos:** Este estudio es un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado, controlado, simple ciego, con una muestra de 25 pacientes que se sometieron a la reconstrucción del LCA, divididos aleatoriamente en:

grupo omega-3 (GO), suplementado diariamente com 2 g de omega-3 por 15 días después de la reconstrucción del LCA y grupo control (GC), sin suplementos. Se hizo la recogida de sangre y de líquido sinovial inmediatamente antes de la cirugía y 15 días después de la reconstrucción del LCA. El análisis bioquímico evaluó los niveles de productos de la peroxidación lipídica (MDA); la actividad catalasa; polifenoles y el total de grupos sulfhidrilo y la proteína C reactiva (PCR). Resultados: Se observó una disminución significativa en los niveles de MDA en GO en comparación con el GC ($p < 0,05$) de la misma manera que la actividad de la enzima antioxidante catalasa fue significativamente menor en GO en comparación con el GC ($p < 0,001$). También se observaron niveles significativamente elevados de grupos sulfhidrilo totales en plasma de individuos suplementados en comparación con el GC ($p < 0,001$). Además, se observaron niveles significativamente más altos de polifenoles ($p < 0,05$) en el plasma y en el líquido sinovial de pacientes que recibieron ácidos grasos omega-3 en el postoperatorio en comparación con el preoperatorio. Sin embargo, no se observó un efecto protector con la administración de omega-3 en la función anti-inflamatoria. Conclusión: Se encontró un efecto protector del omega-3 en la modulación de marcadores de estrés oxidativo en pacientes sometidos a la reconstrucción del LCA.

Descriptor: rodilla; ligamento cruzado anterior; suplementos dietéticos; ácidos grasos omega-3.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1517-869220162202152503>

Artigo recebido em 25/07/2015 aprovado em 04/12/2015.

INTRODUÇÃO

Dentre os componentes que promovem a estabilização do joelho, o ligamento cruzado anterior (LCA) é o principal estabilizador estático, permitindo a estabilidade no plano sagital. Entretanto, é também a estrutura mais vulnerável nas lesões, estando envolvido em 50% das lesões ligamentares dessa articulação¹. A prevalência de lesões deste ligamento na população é elevada, principalmente no meio esportivo. Entre os esportes, o futebol é a atividade com maior número de lesões no LCA (53%), com ginastas e esquiadores também apresentando risco elevado^{2,3}.

Nas primeiras 24 horas que se seguem à lesão do LCA ocorre aumento local de agentes oxidantes, devido a invasão e ativação de um infiltrado de neutrófilos, secreção de proteases, bem como geração de espécies reativas de oxigênio (ERO)⁴. Além disso, estudos demonstram que citocinas pró-inflamatórias e marcadores de estresse oxidativo estão aumentados na circulação sanguínea e no líquido sinovial mesmo após a reconstrução do LCA^{5,6}. O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes, como, por exemplo as ERO e as espécies reativas de nitrogênio, e o sistema de defesa antioxidante do organismo⁷. Sendo responsável por alterações no metabolismo celular que, quando excessivas e não neutralizadas, conduzirão ao agravamento da lesão e ao maior dano das estruturas próximas à lesão⁴.

Entretanto, o dano oxidativo pode ser minimizado pela ação do sistema de defesa antioxidante endógeno, que pode ser auxiliado pela ação de suplementos antioxidantes exógenos⁸. Nesse sentido, a suplementação com ácido graxo ômega-3 tem recebido destaque por estimular as defesas antioxidantes do organismo. Estudos recentes em modelos experimentais descrevem os efeitos benéficos da suplementação com ácido graxo ômega-3 sobre o alívio dos sinais clínicos e redução da osteoartrose^{9,10}. Estudo *in vitro* também demonstrou efeito positivo do ácido graxo ômega-3 sobre produção de interleucina-6 e fibroblastos no processo de recuperação do ligamento colateral medial¹¹. Além desses, outros estudos têm demonstrado efeitos benéficos e potencial efeito terapêutico da suplementação com ácido graxo ômega-3 sobre inúmeros processos-doença, como hiperlipidemia, doença hepática alcoólica e trauma cerebral, dentre outros¹²⁻¹⁴.

Contudo, apesar do crescente interesse pelos benefícios da suplementação com ômega-3 e seu potencial efeito terapêutico, até o momento não há estudos descrevendo os efeitos da suplementação oral com ácido graxo ômega-3 sobre marcadores de estresse oxidativo e processo inflamatório em indivíduos submetidos à intervenção fisioterápica pós-reconstrução do LCA. Diante deste contexto, este

ensaio clínico randomizado tem como objetivo avaliar os efeitos da suplementação oral com ácido graxo ômega-3 sobre marcadores de estresse oxidativo e processo inflamatório em indivíduos submetidos à reconstrução do LCA.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo caracteriza-se como ensaio clínico prospectivo, randomizado, controlado e simples cego. No estudo foi avaliada a eficácia da suplementação oral com ácido graxo ômega-3 sobre marcadores de estresse oxidativo em indivíduos submetidos à reconstrução do LCA, recrutados por conveniência através dos registros de atendimento do Grupo de Joelho do Hospital Ortopédico de Passo Fundo. O estudo está de acordo com normas éticas e foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA, parecer sob o nº 075/05. Foram incluídos no estudo adultos jovens do sexo masculino; com idade acima de 18 anos e abaixo de 40 anos; presença de ruptura total ou parcial do LCA unilateral associada ou não à lesão meniscal e/ou condral nos últimos seis meses.

Foram excluídos do estudo pacientes reincidentes em lesões ligamentares do joelho acometido; história prévia de lesões musculoesqueléticas de membros inferiores; doença cardiovascular sistêmica ou periférica; trombose venosa profunda; tromboembolia pulmonar; distúrbios de coagulação; doença arteriocoronária; doença vascular periférica; acidente vascular cerebral; diabetes *mellitus*; câncer; disfunção hepática ou renal; uso de medicação antiinflamatória ou antioxidante; suplementação com Vitamina C ou E; dieta rica em salmão, atum, bacalhau, arenque, cavalinha, sardinha, truta e óleos de peixe; etilista; tabagista.

A população foi composta por indivíduos que foram submetidos à reconstrução do LCA do joelho no período de julho a novembro de 2012 pelo Grupo de Joelho do Hospital Ortopédico de Passo Fundo. Os indivíduos foram contatados para agendar um encontro no Hospital Ortopédico de Passo Fundo, para esclarecimento acerca da pesquisa e anuência em participar da mesma. A todos foi explicado e oferecido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Em seguida verificaram-se os critérios de elegibilidade.

Após, os indivíduos elegíveis que aceitaram participar livremente do estudo foram listados e alocados aleatoriamente em dois grupos por meio de um sorteio (moeda), Grupo Ômega-3 (GO) (13 indivíduos), e Grupo Controle (GC) (12 indivíduos), totalizando uma amostra de 25 indivíduos. Os investigadores foram cegados durante a alocação dos grupos, tendo em vista que a alocação foi realizada por um indivíduo que não estava envolvido no estudo.

Quanto ao cálculo amostral, por não haver estudos nesse tema, o

número foi inicialmente estimado de acordo com o estudo de Baker et al.¹⁵ que, através de um ensaio clínico randomizado duplo cego, investigou o efeito da pré-suplementação oral com antioxidantes (vitamina C e E) em indivíduos submetidos a reconstrução de LCA sobre desfechos como resposta inflamatória e disfunção muscular. Entretanto, como o estudo de Baker et al.¹⁵ não avaliava os mesmos marcadores, após os resultados preliminares obtidos neste estudo, e baseando-se na avaliação dos níveis de polifenóis, a qual demonstrou a maior variação inter-intragrupo foi realizado o cálculo amostral. Por meio do programa livre *WinPepi* (JH Abramson, 2012), estimou-se um valor amostral, com um intervalo de confiança de 95% e Desvio Padrão de $\pm 1,48$ entre o GO e GC, chegou-se a um total de 20 indivíduos, 10 no GO e 10 no GC.

Para o procedimento cirúrgico, utilizou-se a técnica de reconstrução anatômica do LCA por banda simples com enxerto autólogo dos tendões flexores (músculos semitendíneo e gracilis) quádruplos ipsilateral a lesão. Todas as cirurgias foram realizadas pelos mesmos cirurgiões de joelho, com conhecimento técnico e experiência prática para a realização dos procedimentos.

O GO foi submetido à suplementação com 2g de ácido graxo ômega-3 (Dauf 1000 mg, com registro no Ministério da Saúde - 6.2106.0024.001-3) diárias, durante 15 dias. Estes ingeriram 1 cápsula de ômega-3 a cada 12 horas, à partir do dia da reconstrução do LCA. Já o GC não fez uso de suplementação com ácido graxo ômega-3, realizando igualmente a reconstrução de LCA.

Os indivíduos dos dois grupos receberam o mesmo protocolo de intervenção fisioterápica nos primeiros 15 dias consecutivos após a cirurgia de reconstrução do LCA, com sessões diárias de 60 minutos. Esse procedimento é realizado de rotina após cirurgias de reconstrução do LCA, onde obtivemos 100% de frequência. O protocolo de intervenção baseou-se em:

- Ganho de amplitude de movimento do joelho: exercícios passivos, ativo-assistidos e ativos de flexão e extensão de joelho; 3 séries de 10 repetições cada; com intervalos de 20 segundos;
- Melhora da flexibilidade muscular: alongamento estático para a musculatura flexora e extensora do joelho; além da musculatura adutora, abduzora, extensora e flexora do quadril; dorsiflexora e plantiflexora do tornozelo; 2 séries de 30 segundos cada; com intervalos de 30 segundos;
- Aumento da força muscular do quadríceps: exercícios de *straight leg raise*, indivíduo posicionado em decúbito dorsal, realiza flexão do quadril (até 45°) com o joelho estendido e o membro contralateral flexionado em apoio ao solo. O exercício foi iniciado sem carga, e, evoluído com peso de 0,5 à 3kg conforme a tolerância de cada indivíduo; 2 séries de 10 repetições cada; com intervalos de 60 segundos;
- Reeducação neuromuscular e proprioceptiva: exercícios em cadeia cinética fechada bipodal evoluindo para unipodal, iniciando no solo e evoluindo para um circuito de dispositivos instáveis (balance, discobol e prancha de freemann); 2 séries de 30 segundos cada; com intervalos de 30 segundos;
- Treino de marcha: exercícios de deslocamento lateral, anterior e posterior entre as barras paralelas; 2 séries de 10 repetições cada; com intervalos de 60 segundos.

Ao término das sessões fez-se uso da crioterapia, por 20 minutos, para alívio da dor e redução do edema. O indivíduo foi posicionado em decúbito dorsal, com o gelo moído em sacos plásticos colocados sobre a região anterior e posterior do joelho acometido. Além disso, foi aplicada compressão sobre a região por meio de bandagem elástica e elevado o membro inferior com uma cunha (15° de flexão do quadril). Não houve intercorrências nesse período.

Os indivíduos foram orientados a manter a sua alimentação habitual durante o período de intervenção, evitando ingerir alimentos com potencial antioxidante adicional. Bem como, a não realizar exercícios físicos domiciliares e uso de qualquer medicamento anti-inflamatório e/ou analgésico.

O líquido sinovial (5 mL) foi coletado através de uma punção no joelho, com agulha introduzida na região supra patelar externa sob anestesia. Já a coleta de sangue foi realizada na fossa antecubital, em tubos de coleta a vácuo heparinizados (5 mL). O material foi mantido em gelo, centrifugado por 10 minutos a 5000 rpm, e o plasma e eritrócitos (lavados três vezes com igual volume de solução fisiológica) foram armazenados a temperatura de -80°C para análises posteriores.

As coletas do líquido sinovial e sangue foram realizados em duas situações:

- 1ª. imediatamente antes da cirurgia de reconstrução do LCA;
- 2ª. 15 dias após a reconstrução, durante o retorno para reavaliação.

A prescrição do ácido graxo ômega-3, bem como a coleta do sangue e líquido sinovial foram realizadas pelo mesmo Médico Ortopedista.

A determinação da peroxidação lipídica no plasma foi avaliada por meio do ensaio que quantifica espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como produto final da lipoperoxidação. Em resumo, 300 μ L de plasma foram adicionados em 600 μ L de ácido tricloroacético 15% e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. A 500 μ L do sobrenadante foi adicionado 500 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67%. As amostras foram aquecidas a 100°C durante 20 minutos e as espécies reativas ao TBA foram quantificadas a 535 nm. O 1,1,3,3, tetrametoxipropano foi utilizado para a curva padrão¹⁶. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína. O mesmo procedimento foi realizado para análise no líquido sinovial.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada pela velocidade de consumo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 240 nm. Em resumo, em 100 μ L de eritrócitos hemolisados (1:1) foi adicionado 1 mL de tampão fosfato de potássio, pH 7.4. Destes, 100 μ L foram adicionados ao meio que continha tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,4 e H_2O_2 10 mM. A diferença na leitura das absorvâncias a 240 nm, em determinado intervalo de tempo (15 segundos), permite estabelecer a velocidade de redução do H_2O_2 , que é proporcional à velocidade da reação enzimática catalisada pela CAT¹⁷. A atividade foi expressa como k/gHb/min.

Para a quantificação dos grupos sulfidrílicos totais (-SH totais) do plasma, a amostra foi diluída na proporção de 1:500 em tampão fosfato de potássio 1M, pH 7,0. Em 2 mL da diluição foi adicionado 20 μ L de ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 30 mM, conforme descrito por Ellman¹⁸. A absorvância de uma amostra referência, sem a adição de DTNB, foi descontada do valor obtido, a fim de subtrair a absorvância causada por substâncias interferentes, tais como o grupo heme no plasma. O desenvolvimento de cor se dá pela reação dos grupos tióis com DTNB, e consequentemente liberação de TNB, a qual pode ser medida espectrofotometricamente em 412 nm ($\epsilon = 13.600/M.cm$).

A determinação de polifenóis no plasma foi realizada utilizando o reagente Folin-Ciocalteu segundo Waterman e Amole¹⁹. A solução de Folin 1N foi preparada utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (Merck). Em tubo de ensaio foram adicionados 100 μ L de plasma e 300 μ L de ácido tricloroacético, após foram centrifugados a 10.000 rpm. Em 100 μ L do sobrenadante foram adicionados 100 μ L da solução Folin e 200 μ L de solução saturada de carbonato de sódio, após, o volume foi completado com água deionizada até 1900 μ L. A solução reagiu no escuro à temperatura ambiente por 30 minutos e posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro semiautomatizado (Biosystems BTS 350) a 750 nm utilizando uma curva padrão de ácido tânico 0,5 mg/mL. Os

resultados foram expressos em nmol de polifenóis/mg de proteína. O mesmo procedimento foi realizado para análise no líquido sinovial.

A determinação da Proteína C Reativa (PCR) no plasma e no líquido sinovial foi obtida pelo método de imunoturbidimetria (Kit Biotécnica). As determinações bioquímicas seguiram as instruções de fabricante e as leituras espectrofotométricas realizadas em espectrofotômetro semiautomático Biosystems BTS 350. Os resultados foram expressos em mg/L.

Análise estatística

A normalidade dos dados foi aferida mediante o uso do teste Shapiro-Wilk. Os dados foram expressos em mediana (p25;p75), média (desvio padrão) ou frequência absoluta e relativa. Na análise inferencial intragrupos foi utilizado o teste U de Wilcoxon e na intergrupos o teste U de Mann-Whitney, por meio do programa SPSS for Windows (versão 18.0). As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$, com um poder estatístico de 80%.

RESULTADOS

No presente estudo 30 indivíduos foram avaliados quanto a elegibilidade, no entanto cinco foram excluídos por serem reincidentes em lesões ligamentares do joelho acometido. Dos 25 indivíduos elegíveis, 13 foram alocados e analisados no GO e 12 no GC. Um fluxograma das inclusões, exclusões e o número final dos participantes está ilustrado na Figura 1.

Na Tabela 1 está expressa a caracterização (dados antropométricos e lado operado) dos grupos estudados.

A avaliação dos níveis de peroxidação lipídica demonstrou redução significativa no líquido sinovial dos indivíduos de ambos os grupos (GO e GC) pós-cirurgia quando comparados ao período pré-cirúrgico ($p < 0,001$; Figura 2). Por outro lado, na avaliação pós-cirurgia, os indivíduos que receberam suplementação com ácido graxo ômega-3 apresentaram níveis significativamente menores de peroxidação lipídica quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$; Figura 2).

avaliando os níveis de polifenóis, observou-se aumento significativo nos níveis tanto no plasma (Figura 3A) quanto no líquido sinovial (Figura 3B) dos indivíduos que receberam ácido graxo ômega-3 no período pós-cirúrgico comparado ao pré-cirúrgico ($p < 0,05$). Por outro lado, indivíduos do grupo controle apresentaram tanto no período pré

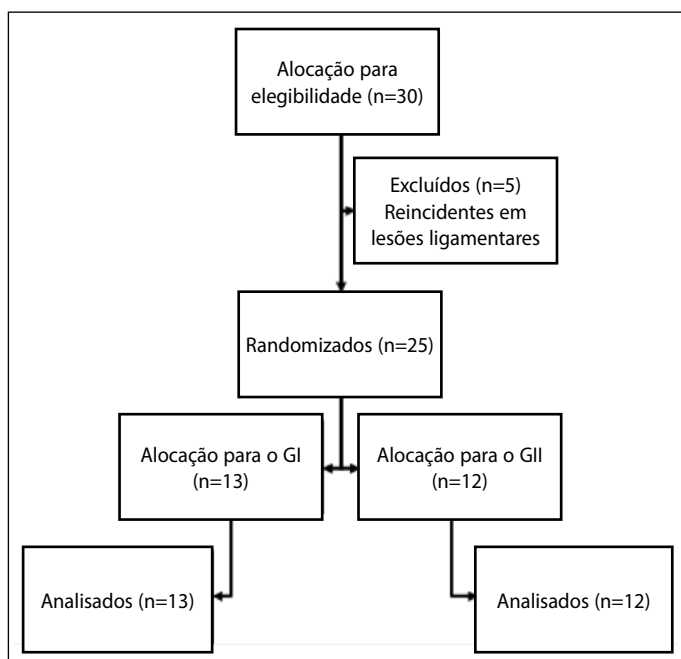


Figura 1. Fluxograma do processo de recrutamento e alocação dos participantes.

Tabela 1. Caracterização da amostra separada por grupos.

Grupo	Dados Antropométricos ^a			Lado Operado ^b	
	Idade (anos)	Massa Corporal (Kg)	Estatura (cm)	LD	LND
GO	25,7±5,6	75,7±12,9	173,2±5,3	8 (61,5%)	5 (38,5%)
GC	28,1±6,1	80,1±16,2	175,8±5,9	9 (75,0%)	3 (25,0%)

LD=lado dominante, LND=lado não dominante, GO=grupo ômega-3, GC=grupo controle. ^aValores expressos em média±desvio padrão. ^bValores expressos em frequência absoluta e relativa.

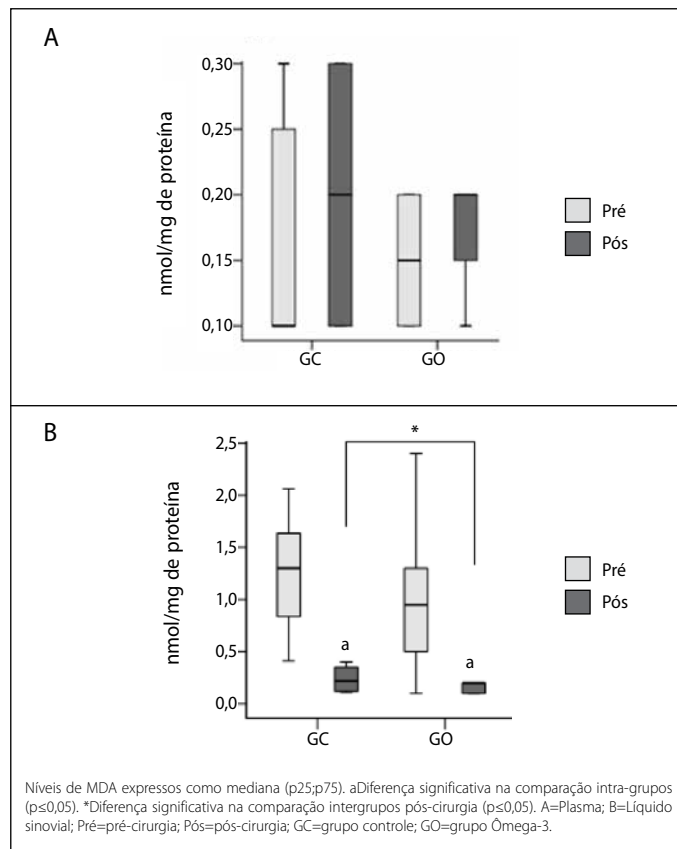


Figura 2. Níveis plasmáticos e sinoviais de peroxidação lipídica.

quanto pós-cirúrgico níveis significativamente maiores do que àqueles do grupo intervenção ($p < 0,001$), nas diferentes amostras biológicas.

Outro marcador antioxidante avaliado foi a atividade da enzima CAT, a qual demonstrou atividade eritrocitária significativamente diminuída no período pós-cirúrgico de indivíduos suplementados com ácido graxo ômega-3 quando comparados aos níveis pré-cirúrgicos ($p < 0,03$). Diferença significativa também foi observada no grupo tratado com ômega-3 quando comparado ao controle, no período pós-cirúrgico ($p < 0,001$), como ilustra a Figura 4.

Além dos marcadores descritos acima, a quantificação dos grupos -SH demonstrou que, em indivíduos não suplementados, no período pós-cirúrgico houve uma diminuição significativa nos níveis de -SH plasmáticos comparados ao período pré-cirurgia ($p < 0,001$). Por outro lado, houve um aumento significativo nos níveis do grupo intervenção no período pós-cirúrgico comparados ao período pré-cirurgia ($p < 0,05$). Além disso, a suplementação com ácido graxo ômega-3 foi capaz de aumentar significativamente os níveis de grupos -SH plasmáticos dos indivíduos suplementados quando comparados aos não suplementados no período pós-cirurgia ($p < 0,001$), como mostra a Figura 5.

Na avaliação do marcador inflamatório PCR plasmático, os indivíduos suplementados com ômega-3 demonstraram aumento significativo no período pós-cirúrgico comparado ao pré-cirúrgico (Figura 6A, $p < 0,001$). Por sua vez, no líquido sinovial o aumento significativo no

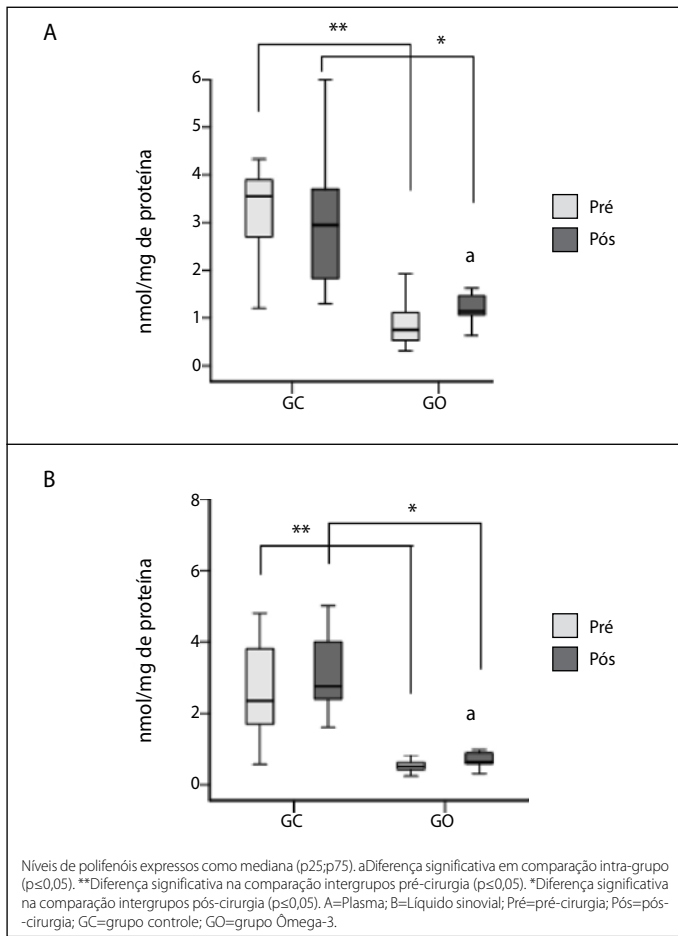


Figura 3. Níveis plasmáticos e sinoviais de polifenóis.

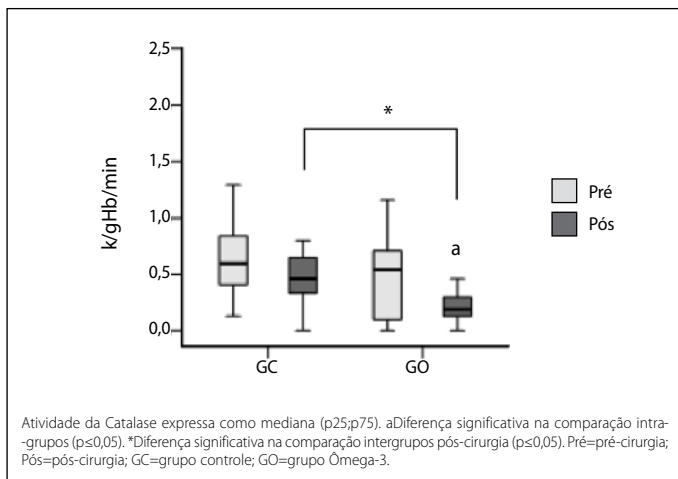


Figura 4. Atividade eritrocitária da enzima antioxidante catalase.

período pós-cirúrgico comparado ao pré-cirúrgico foi observado em ambos os grupos (figura 6B, $p < 0,001$). Além disso, uma diferença basal no período pré-cirúrgico foi observada entre indivíduos suplementados quando comparados aos controles ($p < 0,001$) nas diferentes amostras biológicas, como mostra a figura 6A e B.

DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado que a ingestão diária de 2g de ácido graxo ômega-3 durante 15 dias, apresenta efeito benéfico sobre a modulação de marcadores de estresse oxidativo de indivíduos submetidos à reconstrução do LCA. Tendo em vista, que se observou redução do estado oxidante celular, representado pelo biomarcador

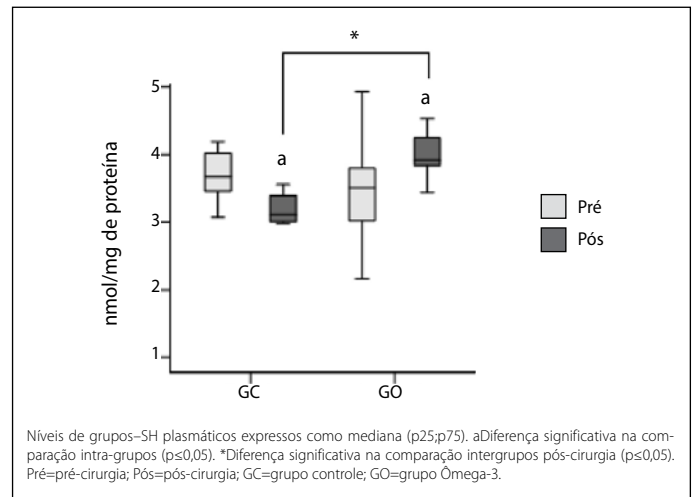


Figura 5. Níveis plasmáticos de grupos-SH.

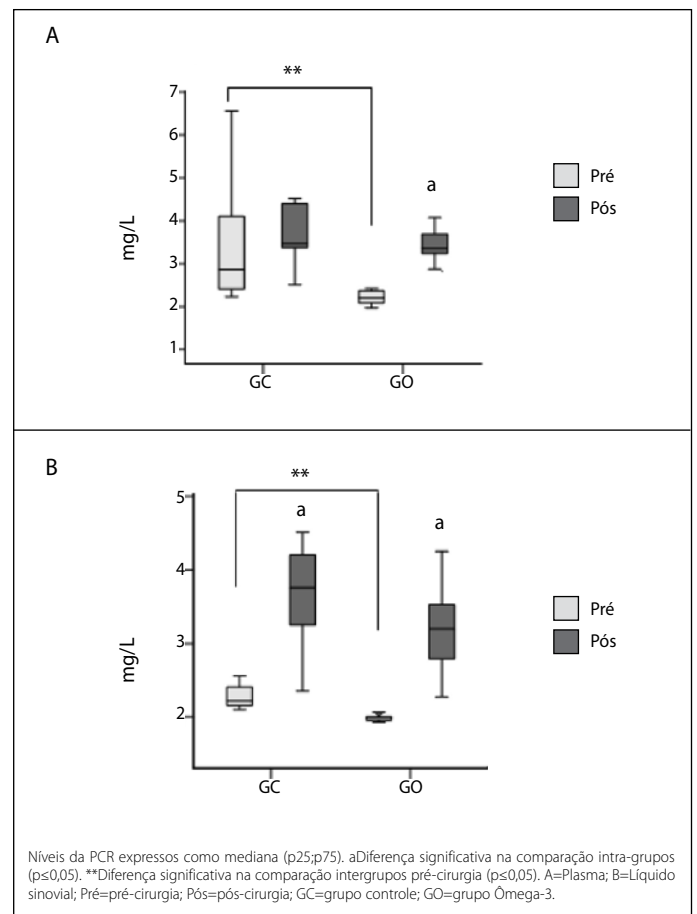


Figura 6. Níveis plasmáticos e sinoviais da PCR.

da peroxidação lipídica, e um aumento no estado antioxidante não enzimático (grupos -SH e polifenóis), com redução da necessidade de ação da enzima antioxidante catalase.

Observamos diminuição dos níveis de peroxidação lipídica no período pós-cirúrgico em ambos os grupos comparados ao período pré-cirúrgico. Esse dado era esperado tendo em vista a diminuição do quadro inflamatório responsável pela produção de radicais livres e dano oxidativo tecidual. Entretanto, no período pós-cirúrgico a administração de ômega-3 foi capaz de reduzir significativamente os níveis de MDA dos indivíduos suplementados quando comparados aos controles, demonstrando o efeito protetor do ácido graxo poliinsaturado na redução do estresse oxidativo tecidual.

Nesse sentido, este trabalho corrobora com dados da literatura que demonstram efeito protetor da administração do ácido graxo ômega-3 ou dieta rica no ácido graxo sobre a redução dos níveis de lipoperoxidação^{12,20}.

Em relação à atividade enzima antioxidante da CAT, os resultados demonstraram redução significativa na atividade da enzima no pós-operatório do grupo suplementado quando comparada ao grupo controle. A produção excessiva de ERO pode causar dano celular, incluindo a lipoperoxidação, a oxidação de proteínas e DNA²¹. Dessa forma, a suplementação com ômega-3, ao inibir os metabólitos do ácido araquidônico e prostaglandina E₂, pode levar à redução das ERO, e possivelmente de H₂O₂ formado em decorrência da sequência de eventos oxidativos. Esse efeito do ômega-3 sobre o estado oxidativo celular justificaria a menor atividade da enzima catalase nos indivíduos suplementados quando comparados aos controles no período pós-operatório. Entretanto, avaliando o efeito da suplementação sobre uma população de indivíduos saudáveis, Ottestad et al.²² verificaram que a ingestão de óleo de peixe por 3 e 7 semanas não proporciona alterações significativas na atividade plasmática de enzimas antioxidantes como a catalase, glutatona redutase e glutatona peroxidase.

A suplementação alimentar de ácidos graxos poliinsaturados, como o ômega-3, tem a capacidade de proteger os tecidos de lesões desencadeadas por radicais livres em diversas doenças em que o mecanismo de defesa oxidante/antioxidante está alterado²³. Em outras palavras a suplementação dietética com ômega-3 conduz a um aumento na capacidade antioxidante total no plasma²⁴. Esse efeito foi observado em nosso estudo, pois encontramos níveis elevados de grupos -SH totais no plasma dos indivíduos suplementados quando comparados ao grupo sem suplementação pós-cirurgia. Além disso, a suplementação com ômega-3 representou um aumento significativo dos polifenóis, o que ocorreu tanto no plasma quanto no líquido sinovial no período pós-cirúrgico quando comparado ao pré-cirúrgico. Compostos bioativos tais como os polifenóis, encontrados em diversas fontes alimentares, dentre elas o ácido graxo ômega-3, são capazes de prevenir ou atenuar o dano causado pelo estresse oxidativo. Os polifenóis são os antioxidantes mais abundantes da dieta, e tem demonstrado melhorar o estado de diferentes biomarcadores do estresse oxidativo, neutralizando radicais livres e protegendo as células do dano oxidativo. Nesse estudo, maiores níveis de polifenóis observados no líquido sinovial do pacientes no pós-cirúrgico, podem estar relacionados com menores níveis do biomarcador de estresse oxidativo MDA.

Apesar do ácido graxo ômega-3 demonstrar efeitos antioxidantes, ao analisarmos a concentração dos níveis plasmáticos e sinoviais da PCR, não verificamos um efeito positivo na sua função antiinflamatória. Tendo em vista que o ômega-3 está diretamente ligado à inflamação por ser precursor de uma família de compostos conhecidos como eicosanóides, os quais são responsáveis por mediar e regular o processo inflamatório²⁵. No entanto, outros estudos não encontraram alterações significativas em marcadores inflamatórios quando comparado o nível sérico basal da PCR^{22,26,27}. Já Bowden et al.²⁸ verificaram uma diminuição significativa nos valores da PCR plasmática em pacientes com doença renal que fizeram uso de cápsulas de óleo de peixe. Nesse

estudo observamos que no plasma e no líquido sinovial de indivíduos suplementados houve um aumento dos níveis da PCR no período pós-cirúrgico quando comparado ao pré-cirúrgico. Este achado também foi encontrado no grupo controle, demonstrando assim que o procedimento cirúrgico pelo qual os indivíduos são submetidos pode elevar os níveis da PCR, no entanto, abaixo do previsto para indicar um processo inflamatório (> 5mg/L)²⁹.

Os benefícios do consumo do ácido graxo ômega-3 foram acumuladas ao longo das últimas décadas³⁰. Porém, do nosso conhecimento esse é o primeiro estudo que avaliou o impacto da suplementação dietética com ômega-3 sobre o estresse oxidativo plasmático e do líquido sinovial de indivíduos submetidos à reconstrução do LCA.

De maneira importante, essa capacidade do ácido graxo ômega-3 em modular os marcadores de estresse oxidativo pelo aumento na capacidade antioxidante total, previne danos às demais estruturas articulares, como o menisco e a cartilagem articular, proporcionando assim a manutenção da funcionalidade articular do joelho, com repercussões positivas sobre as atividades de vida diárias e qualidade de vida destes indivíduos.

O presente estudo apresenta limitações que podem gerar discussão. O período de suplementação está abaixo daquele descrito na literatura para a otimização dos efeitos benéficos da suplementação com ômega-3. Os indivíduos foram orientados a manter a sua alimentação habitual durante o período de intervenção, evitando ingerir suplementos antioxidantes adicionais. Entretanto, ainda assim, uma ingestão de alimentos com potencial antioxidante desproporcional entre os grupos pode ter ocorrido. Isso justificaria as diferenças pré-operatórias encontradas nos níveis de polifenóis das amostras coletadas. Porém, mesmo em um curto período de suplementação, com uma amostra pequena, e por tratar-se de um ensaio clínico, alguns resultados demonstram um poder de 80%, o que é satisfatório.

Outros estudos, em processos-doença distintos, encontraram efeitos similares sobre o nível de estresse oxidativo quando indivíduos foram suplementados com ômega-3, corroborando os resultados encontrados. Entretanto, ainda permanece a lacuna da investigação dos efeitos clínicos e sobre marcadores do processo inflamatório nessa mesma população. Desta forma, destacamos a importância de novas pesquisas que elucidem os efeitos da suplementação com ômega-3 sobre outros parâmetros, em longo prazo e no tratamento de diferentes lesões musculoesqueléticas, que possam desencadear estresse oxidativo e causar lesão tecidual e comprometimento da qualidade de vida do paciente.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstraram efeito benéfico da suplementação dietética com ácido graxo ômega-3 na modulação dos marcadores de estresse oxidativo em indivíduos submetidos à intervenção fisioterápica pós-reconstrução do LCA, fato que pode prevenir os danos causados pelos radicais livres nas estruturas periarticulares e o agravamento da lesão no joelho acometido.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES: MFV (0000-0002-0543-2107)* responsável pelo planejamento dos métodos, execução do projeto e escrita do manuscrito. LOS (0000-0002-0415-2226)* responsável pela coleta e análise do material. VBB (0000-0002-6970-612X)* organização e execução do projeto e da escrita do manuscrito; CAQM (0000-0002-3997-6380)* cirurgias, acompanhando os pacientes e reunião de dados clínicos. GLP (0000-0002-2263-3189)* e CRA (0000-0003-4373-3944)* se dedicaram a reabilitação dos pacientes, pesquisa bibliográfica e levantamento de artigos. LHTR (0000-0002-4807-7176)* revisou o conteúdo intelectual do manuscrito antes da apresentação final. MFS (0000-0002-7894-5915)* efetuou análise estatística, avaliação e apresentação dos resultados. *Número ORCID (*Open Researcher and Contributor ID*).

REFERÊNCIAS

1. Camanho GL, Camanho LF, Viegas AC. Reconstrução do ligamento cruzado anterior com tendões dos músculos flexores do joelho fixos com Endobutton. *Rev Bras Ortop.* 2003;38(6):329-36.
2. Hootman JM, Dick R, Agel J. Epidemiology of collegiate injuries for 15 sports: summary and recommendations of injury prevention initiatives. *J Athl Train.* 2007;42(2):311-9.
3. Pujol N, Bianchi MP, Chablat P. The incidence of anterior cruciate ligament injuries among competitive alpine skiers: a 25-year investigation. *Am J Sports Med.* 2007;35(7):1070-4.
4. Toumi H, Best TM. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *Br J Sports Med.* 2003;37(4):284-6.
5. Saricaoglu F, Dal D, Salman AE, Atay OA, Doral MN, Salman MA, et al. Effect of low-dose N-acetylcysteine infusion on tourniquet-induced ischaemia-reperfusion injury in arthroscopic knee surgery. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2005;49(6):847-51.
6. Zysk SP, Fraunberger P, Veihelmann A, Dorger M, Kalteis T, Maier M, et al. Tunnel enlargement and changes in synovial fluid cytokine profile following anterior cruciate ligament reconstruction with petal tendon and hamstring tendon autografts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2004;12(2):98-103.
7. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radical in biology and medicine.* 2nd ed. London: Clarendon Press; 1989.
8. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova.* 2006; 29(1):113-23.
9. Vandeweerdt JM, Coisnon C, Cleqq P, Cambier C, Pierson A, Hontoir F, et al. Systematic review of efficacy of nutraceuticals to alleviate clinical signs of osteoarthritis. *J Vet Intern Med.* 2012;26(3):448-56.
10. Knott L, Avery NC, Hollander AP, Tarlton JF. Regulation of osteoarthritis by omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids in a naturally occurring model of disease. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011;19(9):1150-57.
11. Hankenson KD, Watkins BA, Schoenlein IA, Allen KGD, Turek JJ. Omega-3 fatty acids enhance ligament fibroblast collagen formation in association with changes in interleukin-6 production. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000;223(1):88-95.
12. Liu M, Wallin R, Saldeen T. Effect of bread containing stable fish oil on plasma phospholipid fatty acids, triglycerides, HDL-cholesterol, and malondialdehyde in subjects with hyperlipidemia. *Nutrition Res.* 2001;21(11):1403-10.
13. Shapiro H, Tehilla M, Attal-Singer J, Bruck R, Luzzatti R, Singer P. The therapeutic potential of long-chain omega-3 fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Nutr.* 2011;30(1):6-19.
14. Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H. *Oxidative stress.* London: Academic Press; 1985.
15. Barker T, Leonard SW, Trawick RH, Martins TB, Kjeldsberg CR, Hill HR, et al. Modulation of inflammation by vitamin E and C supplementation prior to anterior cruciate ligament surgery. *Free Radic Biol Med.* 2009;46(5):599-606.
16. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95(2):351-8.
17. Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol.* 1984;105:121-6.
18. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82(1):70-7.
19. Waterman P, Amole S. *Analysis of phenolic plant metabolites.* London: Blackwell Scientific; 1994.
20. Kenar L, Karayilanoglu T, Aydin A, Serdar M, Kose S, Erbil MK. Protective effects of diets supplemented with omega-3 polyunsaturated fatty acids and calcium against colorectal tumor formation. *Dig Dis Sci.* 2008;53(8):2177-82.
21. Hermes-Lima M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey KB. *Functional metabolism: regulation and adaptation.* Hoboken, NJ: John Wiley and Sons; 2004.
22. Ottestad I, Vogt G, Retterstol K, Myhrstad MC, Haugen JE, Nilsson A, et al. Oxidised fish oil does not influence established markers of oxidative stress in healthy human subjects: a randomised controlled trial. *Br J Nutr.* 2012;108(2):315-26.
23. Iraz M, Erdogan H, Ozyurt B, Ozugurlu F, Ozgocmen S, Fadillioglu E. Brief communication: omega-3 essential fatty acid supplementation and erythrocyte oxidant/antioxidant status in rats. *Ann Clin Lab Sci.* 2005;35(2):169-73.
24. Erdogan H, Fadillioglu E, Ozgocmen S, Sogut S, Ozyurt B, Akyol O, et al. Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant status in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2004;71(3):149-52.
25. Baker KR, Matthan NR, Lichtenstein AH, Niu J, Guermazi A, Roemer F, et al. Association of plasma n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids with synovitis in the knee: the MOST study. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012;20(5):382-7.
26. Balk EM, Lichtenstein AH, Chung M, Kupelnick B, Chew P, Lau J. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. *Atherosclerosis.* 2006;189(1):19-30.
27. Pooya SH, Jalali MD, Jazayeri AD, Saedisomeolia A, Eshraghian MR, Toorang F. The efficacy of omega-3 fatty acid supplementation on plasma homocysteine and malondialdehyde levels of type 2 diabetic patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010;20(5):326-31.
28. Bowden RG, Wilson RL, Deike E, Gentile M. Fish oil supplementation lowers C-reactive protein levels independent of triglyceride reduction in patients with end-stage renal disease. *Nutr Clin Pract.* 2009;24(4):508-12.
29. Farias TDJ, Canto LM, Medeiros MD, Sereia AFR, Back LKFC, Mello FM, et al. Ausência de associação entre os polimorfismos do gene interleucina-18 e artrite reumatóide. *Rev Bras Reumatol.* 2013; 53(2):199-205.
30. Katan MB. Fish and heart disease. *N Engl J Med.* 1995;332(15):1024-5.