

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALANA GABRIELLE D'ORNELAS

RELAÇÃO ENTRE O EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA SUPLEMENTAÇÃO COM
ÓLEO DE PEIXE E A INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO GRAXO POLI-INSATURADO
ÔMEGA 3 EM TECIDO NERVOSO PERIFÉRICO DE RATOS

CURITIBA
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALANA GABRIELLE D'ORNELAS

RELAÇÃO ENTRE O EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA SUPLEMENTAÇÃO COM
ÓLEO DE PEIXE E A INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO GRAXO POLI-INSATURADO
ÔMEGA 3 EM TECIDO NERVOSO PERIFÉRICO DE RATOS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biomedicina
da Universidade Federal do Paraná
como requisito à obtenção do título de
grau de Bacharel.

Orientadora: Profa. Dra Fabíola Iagher

CURITIBA
2017

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Fabíola Iagher, pelo acompanhamento e toda assistência necessária para o desenvolvimento desse projeto. À minha co-orientadora, Profa. Luana Fischer, e à Profa. Katya Naliwaiko pelas orientações e contribuições recebidas.

Ao Laboratório de Metabolismo Celular do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná pelo suporte oferecido para a realização desse trabalho.

Aos meus pais e irmãos, por todo incentivo, amor e apoio incondicional. E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e contribuíram nesta etapa da minha vida.

Nada na vida
pode substituir a persistência:
nem o talento o fará,
pois o mundo está cheio
de homens de talento fracassados;
nem o conhecimento o fará,
pois encontramos
muitos diplomados medíocres.
Só a persistência e a determinação
são onipotentes.

Calvin Coolidge

RESUMO

Os ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (AGPI n-3) contribuem para redução da resposta inflamatória. A carragenina é um agente amplamente utilizado em modelos animais de dor inflamatória. Dados prévios obtidos de ratos adultos suplementados com óleo de peixe (OP) durante 20 dias, e em ratos cujas mães foram suplementadas com OP durante a gestação e amamentação, relacionam a redução de hiperalgesia induzida por carragenina com a suplementação com OP. Isso sugere que a suplementação com OP tanto na vida adulta, quanto durante o desenvolvimento pré e pós-natal reduza a dor inflamatória, possivelmente por reduzir a síntese de prostaglandinas pró-inflamatórias (PG). De acordo com a literatura, AGPI n-3 presentes no OP privilegiam a síntese de PG anti-inflamatórias em detrimento das pró-inflamatórias. O presente estudo teve como objetivo determinar se os dois regimes de suplementação que se mostraram eficazes em reduzir a dor inflamatória resultaram de incorporação efetiva de AGPI n-3 na membrana de nervos periféricos e gânglios da raiz dorsal dos animais submetidos ao teste de hiperalgesia. Os animais foram divididos em grupos suplementados com diferentes concentrações de OP (3 e 6g/kg de peso corpóreo) por 20 dias antes do teste de hiperalgesia, grupo controle (sem suplementação) e ratos que passaram pelo teste de hiperalgesia 90 dias após o desmame cujas mães haviam sido suplementadas com OP (3g/kg) durante a gestação e lactação. Após ortotanásia, foram feitas a extração de lipídeos de nervos periféricos e de gânglios da raiz dorsal dos animais, saponificação dos extratos e derivatização dos ácidos graxos para a subsequente identificação e quantificação dos mesmos por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os dados obtidos expõem, por análise de variância ANOVA de uma via com níveis de significância $p < 0,05$, um aumento significativo da concentração de ácido docosahexaenóico (DHA) nas amostras obtidas de animais suplementados com ômega 3 na dose de 6g/kg quando comparados ao grupo controle (não suplementado), assim como o aumento de ácido eicosapentaenóico (EPA) quando comparados ao grupo controle e aos animais suplementados com 3g/kg. Os dados indicam que a incorporação dos ácidos graxos ômega 3 nos tecidos analisados, obtida com a dosagem de 6g/kg, está relacionada com a redução da dor inflamatória. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na concentração de ômega 3 entre o grupo de ratos cujas mães foram suplementadas e aqueles do grupo controle.

Palavras-chave: hiperalgesia; carragenina; ácido docosahexaenóico (DHA); ácido eicosapentaenóico (EPA); ômega 3; HPLC.

ABSTRACT

The polyunsaturated fatty acids Omega-3 (n-3 PUFAs) contribute to the reduction of the inflammatory response. Carrageenan is an agent widely used in animal models of inflammatory pain. Previous data obtained from adult rats supplemented with fish oil (FO) for 20 days, and in rats whose mothers were supplemented with FO during gestation and breastfeeding, relate reduction of carrageenan-induced hyperalgesia with FO supplementation. This suggests that FO supplementation both in adult life and during pre and postnatal development reduces inflammatory pain, possibly by reducing the synthesis of pro-inflammatory prostaglandins (PG). According to the literature, n-3 PUFAs present in the FO favor the synthesis of anti-inflammatory FO in detriment of the pro-inflammatory ones. The aim of this study was to determine if the two supplementation regimens that were effective in reducing inflammatory pain resulted from the effective incorporation of n-3 PUFA in the peripheral nerve membrane and dorsal root ganglion of the animals submitted to the hyperalgesia test. The animals were divided into groups supplemented with different concentrations of FO (3 and 6g/kg of body weight) for 20 days before the hyperalgesia test, control group (without supplementation), and rats that underwent the hyperalgesia test 90 days after weaning whose mothers had been supplemented with FO (3g /kg) during gestation and lactation. After orthothanasia, lipids were extracted from peripheral nerves and dorsal root ganglion of the animals, saponification of the extracts and derivatization of fatty acids for subsequent identification and quantification of them by high performance liquid chromatography (HPLC). The data obtained show, by analysis of variance one-way ANOVA with significance levels $p < 0.05$, a significant increase in the concentration of docosahexaenoic acid (DHA) in the samples obtained from animals supplemented with omega 3 at a dose of 6 g/kg when compared to the control group (not supplemented). In addition, was observed the increase of eicosapentaenoic acid (EPA) in the samples obtained from animals supplemented with omega 3 at a dose of 6g/kg, when compared to the control group and animals supplemented with 3g/kg. The data indicate that the incorporation of omega-3 fatty acids in the analyzed tissues, obtained with the dosage of 6g/kg, is related to the reduction of inflammatory pain. No statistically significant difference was found in omega 3 concentration between the group of rats whose mothers were supplemented and those in the control group.

Keywords: hyperalgesia; carrageenan; docosahexaenoic acid (DHA); eicosapentaenoic acid (EPA); Omega 3; HPLC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- METABOLISMO DO ÁCIDO α -LINOLÊNICO E ÁCIDO LINOLEICO.....	15
FIGURA 2- ESQUEMA DAS VIAS METABÓLICAS DE ÁCIDOS GRAXOS	16

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 1- REPRESENTAÇÃO GRADUAL DAS ETAPAS PARA A OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	20
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NAS AMOSTRAS DE NERVO E GÂGLIO DA RAIZ DORSAL DOS RATOS	24
TABELA 2- RAZÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES (%) DE ÁCIDOS GRAXOS N-6 E N-3.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA – ácido araquidônico
- ALA – ácido α -linolênico
- AGPI – ácido graxo poli-insaturado
- AINE's – anti-inflamatórios não esteroides
- Cg – carragenina
- COX – ciclo-oxigenase
- DHA – ácido docosaexaenoico
- EPA – ácido eicosapentaenoico
- IL – interleucina
- LA – ácido linoleico
- LOX – lipo-oxigenase
- LT – leucotrieno
- LTB4 – leucotrieno B4
- NE – norepinefrina
- OP – óleo de peixe
- OP6 – 6g/kg de óleo de peixe
- OP3 – 3g/kg de óleo de peixe
- PG – prostaglandina
- PGE2 – prostaglandina E2
- TNF – fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVO GERAL	11
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
1.3 JUSTIFICATIVA	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 DOR E INFLAMAÇÃO.....	13
2.2 ÁCIDOS GRAXOS	14
2.2.1 Ácidos graxos poli-insaturados e processos inflamatórios.....	15
2.2.2 Relação da suplementação com ômega 3 e redução da hiperalgesia	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	20
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	20
3.3 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS	21
3.4 SAPONIFICAÇÃO DE LIPÍDEOS	22
3.5 DERIVATIZAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PARA HPLC	22
3.6 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR HPLC	23
3.7 ANÁLISE DE DADOS	23
4 RESULTADOS	24
5 DISCUSSÃO	26
5.1 AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE AGPI EM MEMBRANA CELULAR.....	26
5.2 RAZÃO N-6/N-3 E SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA 3.....	27
5.3 SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA 3 E REDUÇÃO DE HIPERALGESIA	28
5.4 SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA 3 DURANTE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO ..	29
6 CONCLUSÃO	31
5 REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

A dor é uma das maiores complicações de saúde pública na atualidade. Apesar dos muitos mecanismos descobertos a respeito das vias nociceptivas, os fármacos para tratamento são os mesmos há décadas. São eles os anti-inflamatórios e os analgésicos opióides, os quais possuem elevada taxa de efeitos colaterais e falhas no alívio da dor. Os anti-inflamatórios são utilizados de forma indiscriminada pela população, aumentando o risco associado a efeitos adversos como gastropatias, nefropatias, além da imunossupressão (MESQUITA et al., 2011).

Há vários estudos visando a identificação de alvos moleculares periféricos para tratamento de dor inflamatória, visto que a maior parte das condições dolorosas provêm da inflamação dos tecidos. A carragenina é um agente inflamatório bastante utilizado em estudos pré-clínicos experimentais de dor, para a análise fisiopatológica da inflamação aguda e triagem de compostos com princípios anti-inflamatórios (NUNES, 2012). Na inflamação e na injúria tecidual há síntese e liberação de mediadores inflamatórios, como a prostaglandina E2 (PGE2) e norepinefrina (NE), que agem diretamente nos nociceptores primários, levando à dor espontânea ou à sensibilização de receptores a estímulos antes inertes. Essa sensibilização é característica de dores de origem inflamatória e tem como natureza a diminuição do limiar nociceptivo, denominando esse processo de hiperalgesia (COUTAUX et al., 2005).

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) são lipídeos que apresentam diversas funções biológicas, e dentre elas está a participação como constituintes de membranas celulares. Os ácidos graxos ácido linoleico (LA, ômega 6; ω -6) e ácido α -linolênico (ALA, ômega 3; ω -3) são considerados essenciais ao ser humano, tendo como fonte a dieta. Quando metabolizados, o primeiro origina o ácido araquidônico (AA) e o segundo o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosaenoico (DHA). O óleo de peixe (OP) é uma fonte de AGPI que contém grandes quantidades de EPA e DHA.

O consumo elevado de AGPI ω -6 é correlacionado a efeitos pró-trombóticos, pró-aterogênicos e pró-inflamatórios (COVINGTON, 2004). Por outro lado, os estudos dos AGPI ω -3 têm demonstrado seus efeitos benéficos no organismo como a atenuação de níveis séricos de triglicerídeos, LDL e colesterol total; diminuição da incidência de aterosclerose, atividade anticoagulante e antiagregante, e redução de

incidência de doenças cardiovasculares (MESQUITA et al., 2011). Estes possuem também ação anti-inflamatória à medida que reduzem a síntese de derivados do ácido araquidônico, dentre eles a PGE₂, ao competirem pela enzima ciclo-oxigenase (COX), favorecendo a formação de prostaglandinas anti-inflamatórias (MAROON & BOST, 2006).

Baseando-se no estudo “Efeito anti hiperalgésico induzido pela suplementação alimentar com óleo de peixe” (SIQUEIRA, 2012), o qual demonstrou que a suplementação com OP (em ratos adultos e em ratas durante a gestação e a lactação) reduziu a hiperalgesia ocasionada por carragenina, o presente estudo visa relacionar a incorporação de ácidos graxos ômega 3 na membrana de nervos periféricos e gânglios da raiz dorsal de ratos e o efeito anti hiperalgésico observado. Com isso, espera-se fundamentar a suplementação com ácidos graxos ômega 3 como adjuvante do tratamento de estados dolorosos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a relação entre a incorporação de ácido graxo poli-insaturado ômega 3 em tecido nervoso periférico e a resposta antinociceptiva em modelo animal.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e quantificar ácidos graxos ômega 3 em nervos periféricos e gânglio da raiz dorsal de ratos adultos suplementados com óleo de peixe;
- Identificar e quantificar ácidos graxos ômega 3 em nervos periféricos e gânglio da raiz dorsal de ratos amamentados por mães que foram suplementadas com óleo de peixe;
- Avaliar a relação entre ingestão de ácidos graxos ômega 3 e resposta antinociceptiva.

1.3 JUSTIFICATIVA

A maior parte das condições dolorosas provêm da inflamação dos tecidos e é essencial a identificação de alvos moleculares periféricos e entendimento de mecanismos relacionados ao tratamento de dor inflamatória.

A suplementação com óleo de peixe está relacionada com redução de inflamação e dor por ela gerada, em estudos com animais e humanos. No entanto, permanecem dúvidas a respeito dos mecanismos envolvidos. No presente estudo, houve o interesse principal em avaliar se a resposta antinociceptiva promovida pela suplementação com óleo de peixe tem relação com a incorporação de AGPI ômega 3 na membrana celular de nervos periféricos e gânglios da raiz dorsal. Tendo isso em vista, a análise dessa possível correlação pode abrir caminhos para fundamentar a utilização da suplementação com ácidos graxos ômega 3 como adjuvante do tratamento de estados dolorosos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOR E INFLAMAÇÃO

A dor é caracterizada por uma “experiência sensitiva e emocional desagradável associada ou relacionada à lesão real ou potencial dos tecidos” segundo a definição da *International Association for the Study of Pain* (IASP). A nível periférico, os mecanismos associados à nocicepção iniciam-se com a conversão de estímulos agressivos em potenciais de ação conduzidos pelas fibras nervosas periféricas A δ e C, que possuem receptores específicos para dor (ROCHA et al, 2007). Essas fibras fazem a condução da informação do estímulo nocivo de natureza química, mecânica ou térmica até o córtex cerebral que interpretará o impulso como dor. Os nociceptores periféricos são sensibilizados por substâncias algio gênicas que são substâncias químicas presentes no local da lesão tecidual (ROCHA et al, 2007).

A carragenina é um agente inflamatório bastante utilizado em estudos pré-clínicos experimentais de dor, para a análise fisiopatológica da inflamação aguda e triagem de compostos com princípios anti-inflamatórios (NUNES, 2012). Ela estimula as células residentes a produção de TNF- α (fator de necrose tumoral) que acarreta na liberação de interleucinas (IL) IL-1b e IL-8. A IL-1b estimula a atividade enzimática da COX que, ao metabolizar o ácido araquidônico, leva à produção de prostaglandinas (PGs), em destaque a prostaglandina E2 (PGE2). A IL-8 promove a produção local de aminas simpatomiméticas, dentre elas a norepinefrina (NE). PGE2 e NE são mediadores inflamatórios que ocasionam a diminuição do limiar de excitabilidade dos nociceptores e ativam nociceptores antes silentes, caracterizando o processo de hiperalgesia. Em última instância, os efeitos hiperalgésicos induzidos pela carragenina são dependentes da síntese de PGE2 e NE (NUNES, 2012).

São conhecidos vários mecanismos a respeito das vias nociceptivas, mas os fármacos para tratamento da dor, os quais possuem alta taxa de efeitos colaterais e falhas no alívio da dor, são os mesmos há muitos anos. São eles os anti-inflamatórios e os analgésicos opióides. Os anti-inflamatórios não esteroides (AINE's), como a aspirina, são a classe de fármacos mais utilizada no mundo para tratamento da dor aguda e crônica proveniente de processo inflamatório. Seus efeitos analgésicos são decorrentes do bloqueio da enzima COX, inibindo a formação de prostaglandinas. A utilização de forma indiscriminada pela população

leva ao aumento de riscos adversos associados, como riscos gastrointestinais, hepáticos, renais, cardiovasculares, dentre outros (SILVA et al., 2014). Os corticóides, anti-inflamatórios esteroidais, atuam bloqueando o início da cascata inflamatória e estão associados a diversos efeitos adversos com o uso contínuo, como a imunossupressão. Os analgésicos opióides atuam no sistema nervoso central e podem levar à sedação, disforia e dependência (BICCA et al., 2012).

2.2 ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos são compostos orgânicos com ácido carboxílico de cadeia alifática que compõem os lipídeos. São relativamente insolúveis em água e solúveis em solventes não polares como clorofórmio, éter e benzeno. Os lipídeos apresentam diversas funções biológicas, dentre elas a capacidade de reserva energética e a participação como constituinte de membranas celulares. Nesta última função, são importantes na conservação da natureza fluida das membranas biológicas e também em processos de sinalização celular (SALEM et al., 2001).

Os AGPI são compostos identificados como n-3 (ômega 3), n-6 (ômega 6), n-7 (ômega 7) e n-9 (ômega 9) de acordo com a posição da primeira dupla ligação, a começar pela porção do grupamento metil terminal da molécula (MESQUITA et al., 2011). De acordo com a posição e o número de duplas ligações, os ácidos graxos terão diferentes propriedades químicas e funcionais. Os mamíferos estão aptos a sintetizar ácidos graxos saturados de precursores não lipídicos e as famílias de ácidos graxos das séries n-7 e n-9, mas não possuem as enzimas delta 12 e delta 15 desaturases as quais fazem a inserção de dupla ligação nas posições n-6 ou n-3 (LEE et al., 2016) .

As duas principais famílias de AGPI são as do ácido α -linolênico (ômega 3) e ácido linoleico (ômega-6) que são substratos essenciais para muitos dos principais lipídeos regulatórios do organismo, e como não são sintetizados pelo corpo, devem ser obtidos pela dieta. O ácido linoleico (LA; 18:2n-6) e ácido α -linolênico (ALA; 18:3n-3), são os ácidos graxos insaturados mais consumidos pelas pessoas (CALDER, 2003). Quando ingeridos são convertidos a derivados de cadeia maior e com maior insaturação (FIGURA 1). O LA é convertido a ácido araquidônico (ARA; 20:4n-6) e o ALA a ácido eicosapentaenóico (EPA; 20:5n-3) e a ácido docosaexaenoico (DHA; 22:5n-3) (CALDER, 2003).

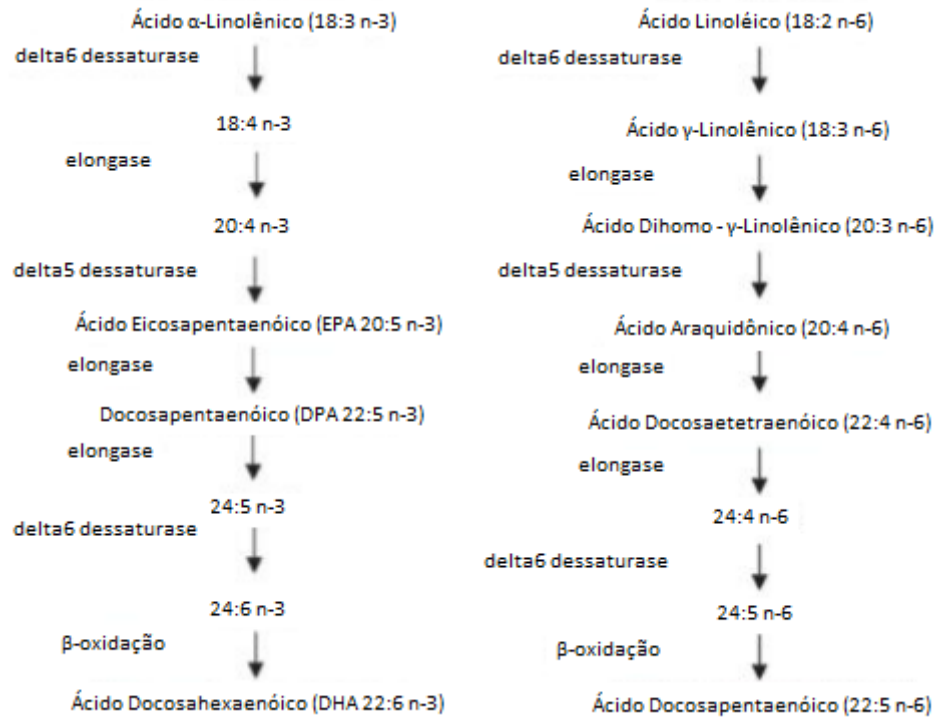


Figura 1- Metabolismo dos ácidos graxos essenciais, ácido α -linolênico (18:3 n-3) e ácido linoleico (18:2 n-6) (LEONARD et al., 2004).

O ALA e o LA podem ser encontrados em plantas oleaginosas, sendo a soja, o milho e o girassol ricos em LA enquanto a linhaça e a canola são ricas em ALA. O óleo de peixe (OP) possui alto teor de EPA e DHA que são os responsáveis por grande parte dos efeitos benéficos atribuídos aos ácidos graxos ômega 3. O óleo de peixe apresenta vantagem em relação a outras fontes de ALA, como a semente de linhaça, que pode ter comprometimento na conversão do ALA por falta de dessaturases específicas em tecidos de mamíferos (SIQUEIRA, 2012).

Os AGPI podem ser incorporados a triacilgliceróis, fosfolípídeos e proteínas plasmáticas, moléculas das quais se dissociam e incorporam-se na membrana celular. Uma vez integrados na membrana, as enzimas fosfolipases A2 podem liberar os ácidos graxos por meio da hidrólise dos fosfolípídeos de membrana. Entretanto, certa parcela desses ácidos graxos podem ser reesterificados e retornarem à membrana plasmática (BOUSQUET et al., 2011).

2.2.1 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS E PROCESSOS INFLAMATÓRIOS

Os AGPI têm papel essencial em processos inflamatórios, principalmente os compostos AA e DHA, os quais competem por metabolização pela enzima COX

(FIGURA 2). Quando metabolizado, o AA livre no citosol dá origem a mediadores inflamatórios potentes, sendo eles a prostaglandina E2 (PGE2) e o leucotrieno B4 (LTB4). A metabolização do DHA livre no citosol pela COX gera PGE3 e pela LOX gera LTB5 que são mediadores anti-inflamatórios (MAROON & BOST, 2006). Aumentando a ingestão de AGPI n-3, como o óleo de peixe, há maior incorporação de DHA nas membranas celulares, diminuindo conseqüentemente a de ácidos graxos n-6. Isto favorece a formação de docosanóides derivados do DHA, em contraposição aos derivados do AA, e elucidada possivelmente o mecanismo pelo qual ocorra o efeito anti-inflamatório atribuído a esses ácidos graxos (BRUNBORG, 2008).

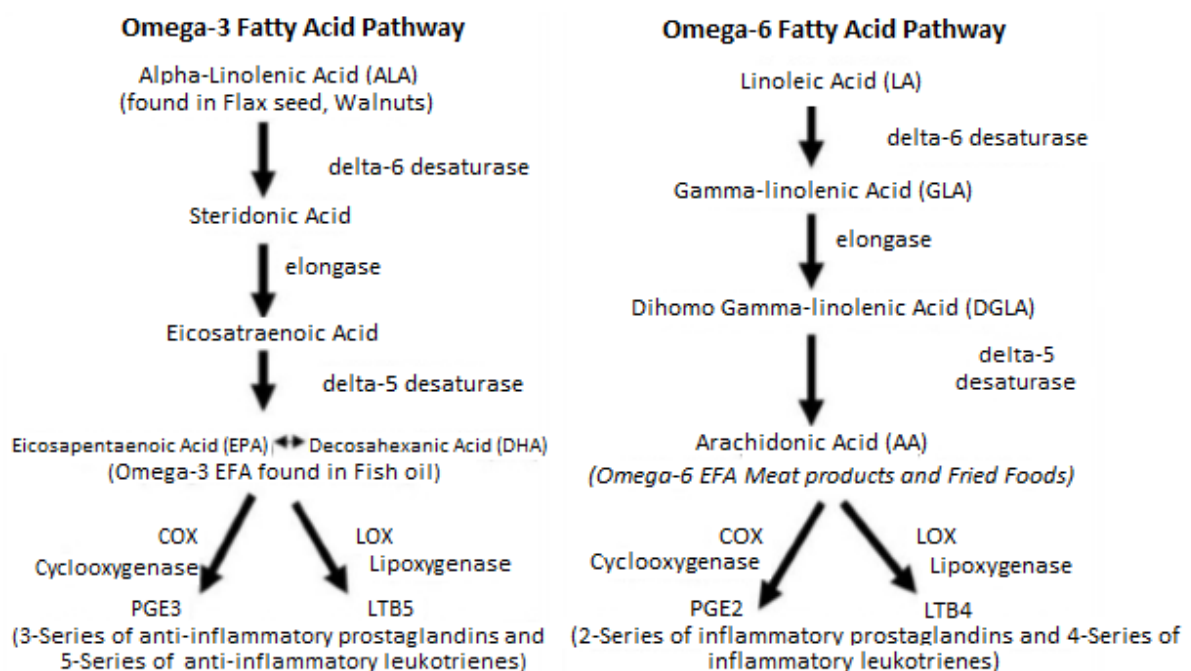


Figura 2- Esquema das vias metabólicas do ácido α -linolênico e do ácido (MAROON & BOST, 2006).

No decorrer dos anos tem-se aumentado substancialmente o consumo de AGPI n-6 e reduzido o de n-3, principalmente no Ocidente (STRANDVIK et al., 2011). Essa mudança nos hábitos alimentares tem sido relacionada com o aumento de várias doenças, como as inflamatórias, psiquiátricas (VINES et al., 2012) e até mesmo o crescimento de tumores (PINTO Jr et al., 2004).

O ômega 3 é uma família de ácidos graxos poli-insaturados que possuem

diversos efeitos benéficos à saúde: redução de níveis plasmáticos dos triglicerídeos, colesterol total e LDL; diminuição da incidência de aterosclerose; atividade anticoagulante e antiagregante; além de possível ação preventiva e/ou terapêutica em cânceres (mama, cólon e próstata), mal de Alzheimer e depressão. Há estudos desenvolvidos em animais e humanos que têm evidenciado uma associação negativa entre a ingestão de AGPI e a incidência de doenças cardiovasculares (MESQUITA et al., 2011).

Os AGPI ômega 3 possuem um papel bem documentado em doenças inflamatórias. Há inúmeros estudos com a suplementação de óleo de peixe em animais e em seres humanos que demonstram mecanismos possíveis pelos quais ocorre a diminuição da hiperalgisia inflamatória, como pela diminuição da produção de citocinas inflamatórias pelos macrófagos e monócitos (HUGHES, 2000; ESPERSON et al., 1992). Foi demonstrado que uma dieta com óleo de peixe inibe a alodinia mecânica e hiperalgisia termal em ratos diabéticos possivelmente pelo bloqueio de vias mediadas por NF- κ B (LI et al., 2015). Há demonstração também de redução de dor articular e rigidez em pacientes com artrite reumatóide pela redução de IL-1 β e TNF- α (NAKAMOTO et al., 2010). Outros estudos suportam a ideia de que os ácidos graxos n-3 têm ação antinociceptiva por meio da ativação de receptores opióides (KREMER, 2000), pela redução da proliferação de linfócitos, e pela inibição da progressão do ciclo celular induzida pela IL-2 (OTTON et al., 2011). Em estudos com avaliação por escala de dor em humanos, foi evidenciado em pacientes com osteoartrite que uma dosagem menor (0,45 g) de óleo de peixe obteve maior analgesia comparado a maior dosagem (4,5g) de suplementação (HILL et al., 2016). Em estudantes com dismenorreia a suplementação diária de óleo de peixe levou à redução da intensidade de dor (HOSSEINLOU et al., 2014), assim como em pacientes reumáticos, a ingestão do óleo foi associada a menor experiência de dor (MOGHADDAMI et al., 2015).

Atualmente, tem crescido o estudo de moléculas denominadas resolvinas, uma classe de mediadores lipídicos bioativos que são sintetizados in vivo oriundos dos derivados de ômega 3 (EPA e DHA). Essas moléculas possuem propriedades analgésicas possivelmente pela regulação ativa de receptores acoplados a proteína G específicas para iniciar sinais anti-inflamatórios e pró-resolução (SOUZA et al., 2016). A série E de resolvinas, que são derivadas do EPA, foram demonstradas serem importantes agentes de resolução de inflamação (KUMAR et al., 2016) e em

um estudo dosando-as em líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide suplementados com ômega 3 foram relacionadas negativamente aos escores de dor (BARDEN et al., 2016).

As pesquisas em torno dos ácidos graxos ômega 3 avançam em busca de maior compreensão de como funcionam e exercem seus papéis biologicamente. Há grandes evidências de seus benefícios à saúde, mas ainda há muito que ser descoberto. Na área de inflamação, muito do que tem sido discutido a respeito do ômega 3 é como ele se comporta sobre a reação inflamatória e na progressão de doenças inflamatórias.

2.2.2 RELAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA 3 E REDUÇÃO DA HIPERALGESIA

O estudo realizado no Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná (UFPR) intitulado “Efeito anti hiperalgésico induzido pela suplementação alimentar com óleo de peixe” (SIQUEIRA, 2012) teve como objetivo avaliar a relação entre a ingestão de AGPI e a redução de dor inflamatória. Nele foram utilizados ratos Wistar machos. Os ratos foram distribuídos em grupos suplementados durante a fase adulta e em grupos cujas mães foram suplementadas durante o período de gestação e lactação. Os animais adultos foram suplementados com óleo de peixe (12% DHA e 18% EPA) nas concentrações de 3 e 6g/kg de peso corpóreo (grupos OP3 e OP6, respectivamente) ou 420µL de água (grupo Controle) via oral, durante 20 dias antes do teste de hiperalgisia. Foram feitos outros dois grupos nos quais os ratos passaram pelo teste de hiperalgisia 90 dias após o desmame, e cujas mães foram suplementadas com óleo de peixe 3g/kg de peso corpóreo (grupo OP3 - Gestação/Lactação) ou suplementadas com 420µL de água (grupo Controle - Gestação/Lactação) durante a gestação e lactação. O teste de hiperalgisia caracterizou-se pela análise do limiar nociceptivo mecânico pelo método de Von Frey eletrônico (Insight, Ribeirão Preto – SP, Brasil). O estímulo para evocar o reflexo de retirada foi aplicado três vezes na pata, e a resposta considerada foi a média destas três aplicações. O animal foi testado antes e depois de cada tratamento, nos tempos pré-determinados. O resultado foi expresso pela diferença entre o valor basal (pré- tratamento) e a resposta em cada tempo pós-tratamento. Foi feita injeção intraplantar (30µL) de salina (NaCl 0,9%), carragenina (Cg),

prostaglandina E2 (PGE2) ou norepinefrina (NE). Foram utilizadas 100ng das drogas dissolvidas em salina a um volume final de 30 μ L. As medidas foram realizadas antes da injeção dos compostos (medida basal) e 1, 3 e 6 horas após a injeção, com os animais sendo eutanasiados imediatamente após o término do experimento. Foi feita a coleta do nervo ciático e gânglio da raiz dorsal para análise do perfil lipídico.

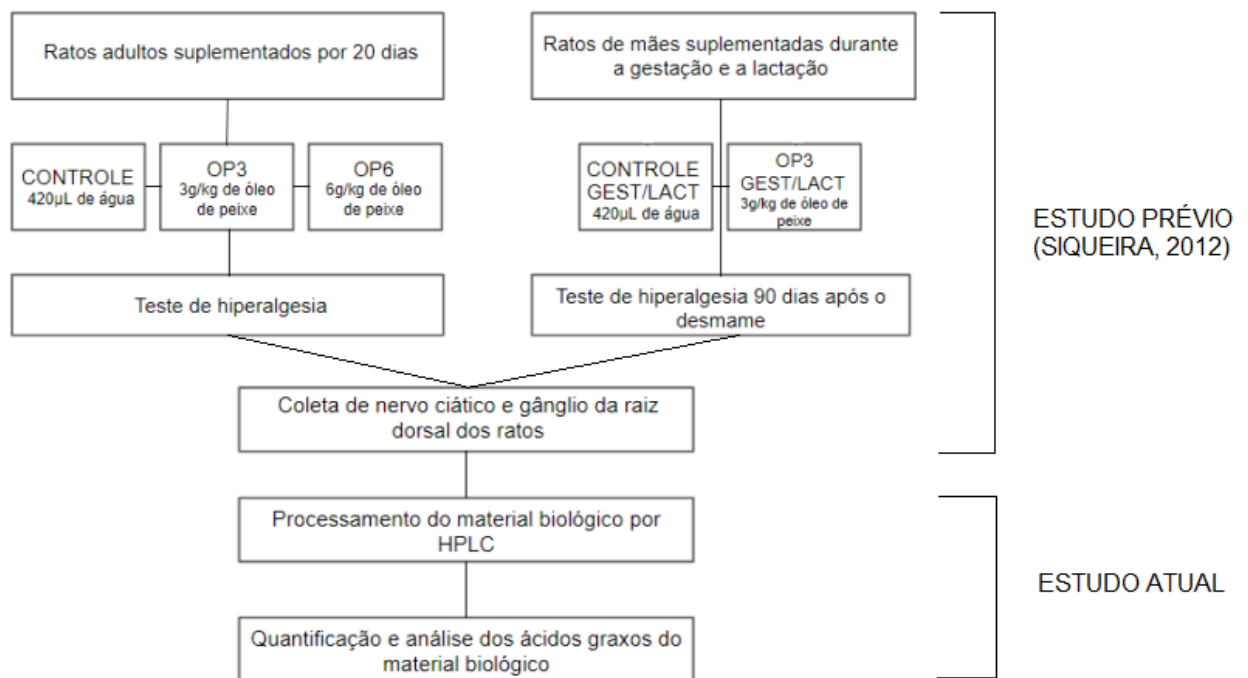
Os dados obtidos no estudo demonstram que a suplementação com óleo de peixe (12% DHA e 18% EPA) durante 20 dias em ratos adultos reduz a hiperalgisia induzida por carragenina, mas não aquela induzida por prostaglandina E2 ou norepinefrina. Resultados similares foram obtidos quando o óleo de peixe foi ofertado aos animais apenas durante a gestação e lactação, através da suplementação materna, e o teste de hiperalgisia realizado na vida adulta. Esses dados sugerem que a suplementação com óleo de peixe tanto na vida adulta, quanto durante o desenvolvimento pré- e pós-natal reduza a dor inflamatória, possivelmente ao reduzir a síntese de prostaglandinas, uma vez que a hiperalgisia induzida por carragenina, mas não por prostaglandina E2, foi reduzida. De acordo com a literatura, é estabelecido que os AGPI da família ômega 3, presentes no óleo de peixe, desviam a síntese enzimática de prostaglandinas privilegiando a síntese de prostaglandinas anti-inflamatórias em detrimento das pró- inflamatórias.

O presente estudo é a avaliação subsequente desse trabalho (“Efeito anti hiperalgésico induzido pela suplementação alimentar com óleo de peixe” SIQUEIRA, 2012). O processamento e análise do nervo ciático e gânglio da raiz dorsal para análise do perfil lipídico dos ratos utilizados serviram de suporte à hipótese de que a presença dos AGPI n-3 nas membranas celulares estariam envolvidos com a diminuição da hiperalgisia inflamatória. Apesar das evidências do envolvimento dos ácidos graxos ômega 3 na diminuição da dor, tanto em modelos animais quanto em humanos, há necessidade de elucidar melhor os mecanismos pelos quais a diminuição da hiperalgisia é obtida. Tendo isso em vista, este estudo visou identificar e quantificar ácidos graxos ômega 3 no material biológico gerado e determinar se as diferentes doses (3g/kg e 6g/kg) de óleo de peixe suplementadas e os diferentes tipos de suplementação (na fase adulta e durante a gestação e lactação), que promoveram redução da hiperalgisia, ocorreram devido à incorporação de AGPI ômega 3 na membrana de nervos periféricos e gânglios da raiz dorsal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizados para caracterização de ácidos graxos ômega 3 o nervo ciático e o gânglio da raiz dorsal de ratos Wistar machos obtidos de estudo prévio (SIQUEIRA, 2012), de acordo com o fluxograma 1 abaixo.



Fluxograma 1 – Representação gradual das etapas para a obtenção do material biológico. As primeiras etapas foram realizadas em estudo prévio (SIQUEIRA, 2012), no qual foram obtidos nervo ciático e gânglio da raiz dorsal de ratos utilizados no presente estudo.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O atual projeto visou avaliar a incorporação de ácidos graxos ômega 3 na membrana celular de nervo periférico e gânglio da raiz dorsal dos animais de acordo com as diferentes concentrações de óleo de peixe administradas. Diante disso, os grupos avaliados aqui tomaram como base apenas o princípio de presença ou ausência de suplementação.

Nos grupos Controle, OP3 e OP6, os animais adultos foram suplementados

20 dias antes do teste de hiperalgesia com 420 μ L de água, óleo de peixe na concentração de 3g/kg e óleo de peixe na concentração de 6g/kg de peso corpóreo, respectivamente. Nos grupos Controle - Gestação/Lactação e OP3 - Gestação/Lactação os animais realizaram o teste de hiperalgesia 90 dias após o período de amamentação, no qual as mães foram suplementadas diariamente durante a gestação com água ou com óleo de peixe por 3g/kg, respectivamente.

Os grupos experimentais que foram avaliados neste projeto foram dispostos da seguinte maneira:

- Grupo Controle (n=8): ratos adultos suplementados com água (420 μ L).
- Grupo OP3 (n=10): ratos adultos suplementados com óleo de peixe 3g/kg de peso corpóreo.
- Grupo OP6 (n=8): ratos adultos suplementados com óleo de peixe 6g/kg de peso corpóreo.
- Grupo Controle - Gestação/Lactação (n=8): ratos filhotes de mães suplementadas com água (420 μ L).
- Grupo OP3 - Gestação/Lactação (n=10): ratos filhotes de mães suplementadas com óleo de peixe (3g/kg de peso corpóreo).

3.3 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS

As amostras de nervo e gânglio da raiz dorsal armazenadas em freezer a -80°C foram processadas, homogeneizadas em eppendorff contendo 1,33 mL de solução de clorofórmio e metanol (2:1), e adicionados 0,240 mL de metanol ao meio. Subsequentemente, passaram por centrifugação a 2500 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo de vidro de 5 mL, no qual foram adicionados 0,480 mL de clorofórmio e 0,410 mL de água. Os tubos com as amostras passaram por leve agitação até o surgimento de coloração esbranquiçada em todo conteúdo. Foram feitas três lavagens com alíquotas de 1 mL de Solução de Folch (FOLCH et al., 1957). Após a obtenção da porção lipídica, as amostras foram evaporadas com fluxo de nitrogênio gasoso.

3.4 SAPONIFICAÇÃO DE LIPÍDEOS

Aos tubos contendo as amostras que passaram pelo processo de extração lipídica foram adicionados 100 μ L de metanol, seguidos de 2 mL de solução de NaOH 0,5M em metanol 90%. Cada tubo foi agitado em vórtex por 1 minuto e levado a banho-maria a 37°C com agitação durante 2 horas. Após o resfriamento das amostras, foram adicionados 1,5 mL de HCl 1M para acidificação. Foi dado início a uma sequência de inserção de 1 mL de hexano, agitação no vórtex e coleta com pipeta de sobrenadante contendo o hexano colocando-o em novo tubo, a qual foi repetida mais duas vezes. Os sobrenadantes coletados de cada amostra foram evaporados com fluxo de nitrogênio gasoso, em banho-maria a cerca de 40°C.

3.5 DERIVATIZAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PARA HPLC

A reação de derivatização foi baseada no método descrito por Abushufa et al., (1994). O reagente 1 foi preparado adicionando-se 10 mg de BMCC em 10mL de acetonitrila. O reagente 2 foi preparado adicionando-se 26,5 mg de 18-crown-6 e 100mg de carbonato de potássio em 5mL de acetonitrila. O reagente 2 foi sonificado por 30 minutos e outros 5 mL de acetonitrila foram adicionados. O sobrenadante foi separado do precipitado e a solução foi estocada a 4-8°C. As amostras contendo ácidos graxos a serem derivatizados foram reconstituídas em 100 mL de acetonitrila e homogeneizadas em vórtex. Após 30 segundos, foram adicionados 100 μ L do reagente 1, e 100 μ L do reagente 2. As amostras foram novamente homogeneizadas, mantidas a 60°C por 15 minutos e em seguida transferidas para frascos apropriados para injeção no equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência. Para a análise dos ácidos graxos derivatizados através do detector de fluorescência, foram realizadas injeções de 20 μ L dos derivados diluídos. O fluxo foi de 1,0mL/min, à temperatura controlada de 23°C. Os compostos foram detectados fluorimetricamente com excitação a 325nm e emissão a 398nm. Quanto à fase móvel, foi realizado gradiente binário com acetonitrila e água, iniciando com a proporção de 77:23% (acetonitrila:água) e finalizando com 90:10, em um total de 45 minutos.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR HPLC

As amostras que passaram pelos processos de extração lipídica, saponificação e derivatização dos ácidos graxos foram injetadas em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Potência (HPLC; Varian, modelo LC-10^a) com detector de fluorescência (325 nm de excitação e 395 nm de emissão). A coluna analítica utilizada para a separação dos ácidos graxos derivatizados foi a C-8 de fase reversa (25 cm × 4,6 mm i.d., 5 µm de partícula), com um fluxo de 1mL/min de acetonitrila/água (73:23, vol/vol). Foram utilizados padrões de ácidos graxos Sigma-Aldrich para a devida identificação dos ácidos graxos nas amostras.

3.7 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram avaliados por ANOVA com valores de significância de $p \leq 0,05$ e pelo pós teste de Tukey. Os grupos Controle – Gestação/Lactação e OP3 - Gestação/Lactação foram comparados estatisticamente pelo teste t de Student. Os dados foram dispostos com a média do grupo \pm erro padrão da média (média \pm e.p.m). Para realização dos cálculos estatísticos foi utilizado o programa Graph Pad Prisma.

4. RESULTADOS

Para a avaliação da relação entre o efeito antinociceptivo da suplementação com óleo de peixe e a incorporação de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 na membrana celular de nervos periféricos em ratos adultos e em ratos cujas mães haviam sido suplementadas durante a gestação e lactação, foram determinados os perfis lipídicos por cromatografia líquida de alta eficiência. Foram processadas ao total 44 amostras de nervo e gânglio da raiz dorsal, de acordo com os grupos pré-estabelecidos. A Tabela 1 apresenta a média da porcentagem dos ácidos graxos insaturados ômega 6 (araquidônico e linoleico), ômega 3 (α -linolênico, DHA e EPA) e ômega 9 (oleico), e dos ácidos graxos saturados (esteárico, láurico, palmítico e mirístico) presentes nos tecidos avaliados (média \pm e.p.m).

Tabela 1- Concentração de ácidos graxos (%) nas amostras de nervo e gânglio da raiz dorsal dos ratos. Grupos Controle, OP3 (suplementação com 3g/kg), OP6 (suplementação com 6g/kg), controle gestação/lactação e grupo gestação/lactação (suplementação materna com 3g/kg durante gestação e lactação). Os dados são expressos como média \pm EPM. ^a $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

NERVO E GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL					
ÁCIDO GRAXO (%)	CONTROLE (n=8)	OP3 (n=10)	OP6 (n=8)	CONTROLE GEST/LACT (n=8)	OP3 GEST/LACT (n=10)
DHA (22:6 n-3)	1,10 \pm 0,45	2,86 \pm 0,82	4,61 \pm 0,69 ^a	1,02 \pm 0,32	1,92 \pm 0,38
EPA (20:5 n-3)	ND	0,23 \pm 1,50	1,02 \pm 0,41 ^a	ND	ND
α -linolenico (18:3 n-3)	0,78 \pm 0,31	1,28 \pm 0,38	1,14 \pm 0,36	1,58 \pm 0,38	1,44 \pm 1,17
Araquidônico (20:4 n-6)	10,18 \pm 1,14	9,99 \pm 1,54	9,88 \pm 0,43	11,65 \pm 0,81	12,28 \pm 0,58
Linoleico (18:2 n-6)	33,53 \pm 3,06	29,76 \pm 3,79	34,08 \pm 1,33	33,48 \pm 1,69	38,16 \pm 1,49
Oleico (18:1 n-9)	23,39 \pm 1,38	24,01 \pm 0,99	23,27 \pm 0,81	26,21 \pm 1,01	23,73 \pm 1,20
Esteárico (18:0)	3,94 \pm 1,77	4,28 \pm 0,40	3,02 \pm 0,42	3,73 \pm 1,12	2,25 \pm 0,35
Láurico (12:0)	ND	0,67 \pm 0,49	0,65 \pm 0,65	ND	0,28 \pm 0,28
Palmítico (16:0)	25,88 \pm 3,55	24,61 \pm 1,18	20,07 \pm 1,36	20,20 \pm 1,05	18,46 \pm 0,76
Mirístico (14:0)	1,19 \pm 0,38	1,26 \pm 0,39	2,24 \pm 0,51	1,53 \pm 0,36	1,46 \pm 0,22

Com a suplementação de OP a 6g/kg (grupo OP6) foi observado aumento (319%) com nível de significância $p < 0,05$ da concentração do DHA em relação ao grupo controle. Embora não tenha apresentado diferença estatística significativa ($p < 0,05$), o grupo OP6 obteve um aumento da concentração de DHA quando comparado ao grupo OP3 ($p < 0,224$). Entre os grupos controle gestação/lactação e OP3 gestação/lactação não houve diferença estatística significativa no que se refere à concentração de DHA. O ácido graxo EPA foi encontrado em concentração estatisticamente superior no grupo OP6 quando comparado ao grupo controle, e houve aumento em relação ao grupo OP3 ($p < 0,081$).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (níveis de significância $p > 0,05$) entre os grupos em relação aos demais ácidos graxos avaliados. A Tabela 2 expõe a razão entre as concentrações (%) de ácidos graxos da família ômega 6 e ômega 3.

Tabela 2- Razão entre as concentrações (%) de ácidos graxos n-6 e n-3 das amostras de nervo e gânglio da raiz dorsal dos ratos. Grupos controle, OP3 (suplementação com 3g/kg), OP6 (suplementação com 6g/kg), controle gestação/lactação e OP3 gestação/lactação (suplementação materna com 3g/kg)

RAZÃO DE ÁCIDOS GRAXOS n-6/n-3					
	CONTROLE (n=8)	OP3 (n=10)	OP6 (n=8)	CONTROLE GEST/LACT (n=8)	OP3 GEST/LACT (n=10)
Razão n-6/n-3	23,25	9,09	6,49	17,35	15,11

É possível notar que entre os grupos Controle, OP3 e OP6, a medida que a suplementação com OP é realizada em maior dose, há redução da razão n-6/n-3, indicando a maior presença proporcional de ácidos graxos n-3 nas membranas celulares. Entre os grupos Controle e OP3 houve redução de 60,9% na razão e entre os grupos Controle e OP6 a redução foi de 72,09%. O grupo OP6 apresentou uma redução de 28,6% quando comparado ao grupo OP3. Já entre os grupos Controle Gestação/Lactação e OP3 Gestação/Lactação, foi obtida diminuição de 12,92% da razão n-6/n-3.

5. DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE AGPI EM MEMBRANA CELULAR

Os AGPI têm papel essencial em processos inflamatórios e há estudos que demonstram sua importância na redução de dor e de hiperalgisia inflamatória. No trabalho “Efeito anti hiperalgésico induzido pela suplementação alimentar com óleo de peixe” (SIQUEIRA, 2012) no qual o presente estudo se baseia, foram encontrados dados que evidenciam que a suplementação com OP nas concentrações de 3g/kg e 6g/kg de peso corpóreo, tanto em ratos adultos (3 e 6 g/kg) como em ratos que receberam esses ácidos graxos durante o período de vida intrauterina e de lactação (3g/kg), reduz a hiperalgisia inflamatória induzida pela administração de carragenina na pata. No atual projeto, com o material biológico gerado nesse estudo prévio, os dados obtidos expõem um aumento significativo da concentração de ácido docosahexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA) nas membranas de animais suplementados com ômega 3 na dose de 6g/kg quando comparados ao grupo controle, além de uma tendência de aumento de EPA e DHA quando comparado grupo OP6 com grupo OP3. Não foram observadas diferenças significativas pelo teste t quanto à concentração de EPA e DHA na membrana de animais do grupo controle gestação/lactação e OP3 gestação/lactação.

É documentado que a ingestão de AGPI ômega 3 na dieta impacta na distribuição desses compostos em todas as células do organismo, alterando composição das membranas e, conseqüentemente, sua fluidez, organização de *lipid rafts*, formação de eicosanóides, e regulação da atividade de fatores de transcrição, dentre outros processos fisiológicos (JUMP, 2002). Diante disso, as elevações na concentração de DHA e EPA encontradas nas membranas celulares de nervos e gânglios da raiz dorsal de ratos suplementados durante a fase adulta (grupo OP6) corroboram com esse conhecimento sobre o metabolismo de ácidos graxos no organismo.

5.2 RAZÃO N-6/N-3 E SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA 3

O perfil lipídico do material avaliado no presente estudo apresentou a redução da razão n-6/n-3 tanto nos tecidos dos ratos suplementados durante a fase adulta quanto nos tecidos da prole das mães que foram suplementadas. Foi uma diminuição diretamente proporcional ao aumento da dose de suplementação, sendo a relação dose-dependente. A dieta suplementada com OP, de fato, privilegia a substituição de AA por DHA e EPA nos fosfolípidos de membrana. Em estudo que analisou pacientes em nutrição parenteral domiciliar de longa duração (PIRONI et al., 2017), foi constatado que os que receberam emulsões lipídicas intravenosas de OP obtiveram o maior percentual de DHA e EPA em detrimento de AA e conseqüentemente uma menor razão n-6/n-3. O perfil lipídico da membrana celular influencia diretamente nos processos metabólicos e a razão diminuída encontrada pode ter relação direta com a redução de hiperalgesia nos ratos suplementados com OP. No cenário oposto, foi constatado que uma dieta tipicamente contemporânea, que privilegia a ingestão de ácidos n-6, induz alterações no tecido de forma a aumentar a razão n-6/n-3 e possivelmente esteja associada a uma susceptibilidade bioquímica ao desenvolvimento de dor crônica (RAMSDEN et al., 2016).

Como os ácidos n-3 e n-6 são ambos metabolizados pela enzima COX, a maior disponibilização de n-3 (menor razão n-6/n-3) leva à produção de mediadores inflamatórios menos potentes que os gerados pelo AA, como na formação de prostaglandina E3 em detrimento da prostaglandina E2 que possui grande potencial inflamatório. Além disso, há mudanças na expressão gênica, atividade de receptores e sinalização celular (CALDER, 2003). Devido à diversidade de processos fisiológicos nos quais os n-3 estão envolvidos, os mecanismos através dos quais esses ácidos graxos atuam sobre o perfil inflamatório e desfecho clínico ainda não estão bem esclarecidos. Há na literatura, vários estudos com humanos e animais que mostram evidências da relação da ingestão de ácidos graxos n-3 e redução de dor e sintomas inflamatórios. No estudo de Siqueira (2012) foi constatada a diminuição de hiperalgesia nas dosagens de 3g/kg e de 6 g/kg, sendo a diminuição mais pronunciada quando 6g/kg foi utilizado. O presente estudo encontrou uma maior concentração de EPA e DHA nas membranas dos ratos adultos que foram suplementados com 6 g/kg em relação ao grupo controle. Diante disso, supõe-se que os mecanismos de redução hiperalgésica nos ratos adultos estejam

relacionados ao nível periférico de modulação inflamatória, como a diminuição da formação de PGE2 em detrimento da formação de prostaglandinas com caráter anti-inflamatório (Siqueira, 2012). Esse conhecimento pode fundamentar a utilização de uma dieta rica em AGPI n-3 com potencial terapêutico, utilizando-os como adjuvantes para redução de hiperalgisia em processos inflamatórios.

5.3 SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA 3 E REDUÇÃO DE HIPERALGESIA

Similarmente ao encontrado no estudo de Siqueira (2012), há evidências de que suplementação com doses de 460mg de EPA e 300mg de DHA diárias por 7 dias antes e 5 dias depois de experimentação animal com modelo de dor inflamatória foi capaz de aliviar a dor pela modulação de TNF- α e resolvinas (LOBO et al., 2016). A observação de efeitos positivos já com doses menores de suplementação de OP também foi encontrada em estudo com humanos no qual os pacientes relataram escores menores nos parâmetros de dor no joelho com doses diárias de 0,45g de n-3 (HILL et al., 2016). Em estudo com suplementação de óleo de peixe concentrado (46,5% EPA e 37,5% DHA) foi observado atraso significativo na sensibilidade à nocicepção térmica, assim como a significativa redução de expressão de canais iônicos em gânglios da raiz dorsal de ratos (VEIGAS et al., 2011), evidenciando, assim, outros mecanismos nos quais os n-3 podem estar associados na redução de efeitos inflamatórios. Diversos estudos apontam o papel de mediadores inflamatórios possivelmente envolvidos na redução da hiperalgisia com a suplementação de OP, como a diminuição de NF- κ B (LI et al., 2015) e aumento de resolvinas da série E (KUMAR et al., 2016). Há na literatura científica recente um crescente interesse por uma classe de moléculas derivadas de AGPI n-3. As pró-resolvinas, mediadores lipídicos bioativos denominadas de resolvinas, protectinas e maresinas, são sintetizadas *in vivo* a partir de EPA e DHA. Há evidências de que atuam regulando ativamente a resolução da inflamação pela ação em receptores acoplados à proteína G específicos para iniciar sinais anti-inflamatórios e pró-resolução (SOUZA et al., 2016). Elas foram associadas à diminuição de dor, cessação da infiltração leucocitária, neutralização de efeitos de mediadores pró-inflamatórios e regeneração tecidual (MARTINDALE et al., 2016). Devido aos seus mecanismos de ação e efeitos gerados, como a analgesia, tem-se a discussão de que possam ser utilizadas como agonistas terapêuticas para

tratamento de doenças inflamatórias (SOUZA et al., 2016).

5.4 SUPLEMENTAÇÃO DE ÔMEGA 3 DURANTE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

Diferente da avaliação dos tecidos de ratos adultos que foram suplementados, os tecidos dos ratos que receberam o aporte de ácidos graxos n-3 durante a fase de vida intrauterina e a amamentação não obtiveram aumento estatisticamente significativo nas concentrações de DHA e EPA quando comparados ao grupo controle gestação/lactação. É possível que esse achado se deva ao *turnover* de membrana, procedimento no qual ocorre o contínuo processo de substituição dos componentes da membrana celular, pelo uso dos ácidos graxos nos processos biológicos (DAWIDOWICZ, 1987). Entretanto, os animais cujas mães foram suplementadas também apresentaram fenótipo anti-hiperalgésico, mesmo tendo sido submetidos aos testes de hiperalgesia 90 dias após o desmame, mostrando a possível relação dos n-3 em algum outro mecanismo além do periférico, como o genético. Quando um organismo é submetido a uma condição em que há modulação a nível de DNA, nem sempre encontram-se alterações nas dosagens de um produto ou subproduto, embora o efeito daquela modulação esteja presente.

Os tecidos neurais são particularmente ricos em AGPI e é conhecido o papel fundamental dos ácidos graxos ômega 3 no desenvolvimento neural e a maturação dos sistemas sensoriais durante a gestação, como no processo de formação da bainha de mielina (UAUY et al., 2000). A atividade das enzimas delta 5 e delta 6 dessaturases, que fazem a conversão de ácido linoleico (LA) a ácido araquidônico e α -linolênico (ALA) a ácidos EPA e DHA, é insignificante antes do nascimento, fazendo com que o feto seja dependente da transferência placentária de AGPI. A composição do leite materno e os níveis de ácidos graxos foram altamente correlacionados com o consumo de EPA, DHA e demais AGPI (KIM et al., 2017). Assim, dieta materna com ingestão de AGPI é crítica para atingir níveis fetais adequados (MARCHLEWICH et al., 2016). Estudos recentes têm estabelecido a influência da dieta materna no desenvolvimento do metabolismo fetal. Um dos possíveis efeitos dos lipídeos encontra-se na participação desses metabólitos em mecanismos de programação epigenética do feto, como na metilação de genes associados ao desenvolvimento e crescimento (MARCHLEWICH et al., 2016). Encontraram-se evidências de que o DHA pode influenciar os padrões de metilação

global do DNA por meio do seu papel no metabolismo de um carbono (KULKARNI et al., 2011) e sua influência em genes candidatos metabólicos e inflamatórios, como o PPAR e o ESR1, em estudos *in vitro*, em animais e em humanos (MARCHLEWICH et al., 2016). Em um grande estudo de associação (ASLIBEKYAN et al., 2014), foi correlacionada a ingestão de AGPI n-3 e a metilação diferencial em 27 locais CpG em regiões biologicamente relevantes. Um desses locais, o CCL17, com a consequente diminuição de seu metabólito no plasma, foi associado à atenuação de resposta inflamatória (FURUHJELM et al., 2011). De acordo com esses achados, é possível sugerir que a diminuição da hiperalgesia encontrada na prole das mães que receberam AGPI n-3 durante a gestação e lactação do presente estudo esteja relacionada ao ambiente metabólico induzido pela metilação diferencial de genes. Cabe ressaltar que o período de modulação induzido a nível de DNA pode levar a manifestação constante de determinada característica ou pode se manifestar de acordo com o estímulo e/ou ambiente (JAENISCH & BIRD, 2003). Por isso, mesmo que não sejam observadas diferenças substanciais na quantidade de mediadores com caráter anti-inflamatório oriundos da metilação diferencial genética, é possível encontrar respostas biológicas diferentes.

As concentrações de EPA e DHA mensuradas nos tecidos dos diferentes grupos experimentais deste trabalho só foram estatisticamente superiores ao controle quando uma elevada dose de OP foi administrada aos animais (6g/kg). É possível que, pelo fato de ter sido utilizado material biológico de estudo prévio, o tempo de armazenamento de todo material biológico (cerca de 5 anos, a -80°C) tenha interferido na integridade dos ácidos graxos n-3. Essa dúvida pode ser dirimida com a realização de novo experimento, e processamento imediato do tecido nervoso periférico obtido. De qualquer forma, o fato de ter sido identificado e quantificado EPA e DHA nos tecidos mesmo após tal período de armazenamento sugere que a incorporação dos ácidos graxos n-3 em tecido nervoso periférico, e a subsequente geração de mediadores menos inflamatórios, seja importante mecanismo envolvido na redução da dor inflamatória de sujeitos suplementados.

6. CONCLUSÃO

Foi observada relação entre a incorporação de AGPI ômega 3 DHA e EPA em membrana de tecido nervoso periférico de ratos e o efeito anti-hiperalgésico observado na suplementação diária de 6g/kg de óleo de peixe em ratos adultos. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a composição de AGPI nas membranas de nervo ciático e gânglio da raiz dorsal da prole de ratos os quais as mães foram suplementadas durante a gestação e a lactação daqueles do grupo controle, embora tenha se constatado redução de hiperalgesia no grupo que foi suplementado durante a fase de vida intrauterina e a amamentação.

Os resultados obtidos suportam a ideia de que a presença dos AGPI n-3 nas membranas celulares dos tecidos avaliados modulam o processo de redução de hiperalgesia em nível periférico quando os animais são suplementados na vida adulta.

REFERÊNCIAS

- ASLIBEKYAN, S.; WIENER, H.; HAVEL, P. J; et al. DNA Methylation Patterns Are Associated with n-3 Fatty Acid Intake in Yup'ik People. **J Nutr.** v. 144(4), p. 425-430, 2014.
- BARDEN, A.E.; MOGHADDAMI, M.; MAS, E; et al. N-3 Fatty acid supplementation and proresolving mediators of inflammation. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.** v. 107, p. 24-9, 2016.
- BICCA, C.; RAMOS, F.L.P.; CAMPOS, V.R., ASSIS, F.D.; Abuso e dependência dos opióides e opiáceos. **Associação Brasileira de Psiquiatria.** 2012.
- BOUSQUET, M.; CALON, F.; CICCHETTI, F. Impact of omega-3 fatty acids in Parkinson's disease. **Ageing Research Reviews.** v.10, p. 453-63, 2011.
- BRUNBORG, L.A.; MADLAND, T.M.; LIND, R.A.; et.al. Effects of short-term oral administration of dietary marine oils in patients with inflammatory bowel disease and joint pain: A pilot study comparing seal oil and cod liver oil. **Clinical Nutrition.** v. 27, p. 614-22, 2008.
- CALDER, P. C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 36, p. 433-446, 2003.
- CZEPIE, J.; GDULA-ARGASINSKA, J.; GARLICKI, A. n-3 and n-6 Fatty Acid Changes in the Erythrocyte Membranes of Patients with 658240251 Clostridium difficile Infection. **Folia Biol.** v. 64(1), p. 3-10, 2016.
- COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine.** v. 72(5), p. 359-71, 2005.
- COVINGTON, M. B. Omega-3 fatty acids. **Am Fam Physician** v. 70(1), p. 133-40, 2004.
- DAWIDOWICZ, E. A. Dynamics of Membrane Lipid Metabolism and Turnover. **Annual Review.** v. 56, p. 43-57, 1987.
- ESPERSON, G.T.; GRUNNET, N.; LERVANG, H.H.; et al. Decreased interleukin-1 beta levels in plasma from rheumatoid arthritis patients after dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids. **Clin. Rheumatol.** v. 11, p. 393-5, 1992.
- FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for isolation and purification of total lipid from animal tissue. **J. Biol. Chem.** v. 12, p. 497-509, 1957.
- FURUHJELM, C.; JENMALM, M. C.; et al. Th1 and Th2 chemokines, vaccine-induced immunity, and allergic disease in infants after maternal ω -3 fatty acid supplementation during pregnancy and lactation. **Pediatr Res.** v. 69(3), p. 259-64, 2011.
- HILL, C.L.; MARCH, L.M.; AITKEN, D.; et al. Fish oil in knee osteoarthritis: a randomised clinical trial of low dose versus high dose. **Ann. Rheum. Dis.** v. 75(1), p.23-9, 2016.
- HOSSEINLOU, A.; ALINEJAD, V.; ALINEJAD, M.; AGHAKHANI, N. The effects of fish oil capsules and vitamin B1 tablets on duration and severity of dysmenorrhea in students of high school in Urmia-Iran. **Glob. J. Health Sci.** v. 18(6), p. 124-9, 2014.

HUGHES, D. A. & PINDER, A. C. n-3 Polyunsaturated fatty acids inhibit the antigen-presenting function of human monocytes. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 71, p. 357–60, 2000.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat. Genet.** v. 33, p. 245-54, 2003.

JUMP, D. B. The Biochemistry of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. **J. Biol. Chem.** v. 277, p. 8755-58, 2001.

KIM, H.; KANG, S.; JUNG, B.M.; YI, H.; JUNG, J.A.; CHANG, N. Breast milk fatty acid composition and fatty acid intake of lactating mothers in South Korea. **Br. J. Nutr.** v. 117(4), p. 556-561, 2017.

KREMER, J.M. n-3 Fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 71, p. 349–51, 2000.

KULKARNI, A.; DANGAT, K.; et al.; Effects of altered maternal folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid on placental global DNA methylation patterns in Wistar rats. **Plos One.** v. 6(3), 2011.

KUMAR, A.; MASTANA, S.S.; LINDLEY, M.R. n-3 Fatty acids and asthma. **Nutr. Res. Rev.** v. 29(1), p. 1-16, 2016.

LEE, J.M.; LEE, H.; KANG, S.; PARK, W.J. Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. **Nutrients.** v. 8(1), p. 23, 2016.

LEONARD, A.E.; PEREIRA, S.L.; SPRECHER, H.; HUANG, Y.S. Elongation of long-chain fatty acids. **Prog Lipid Res.** v. 43(1), p. 36-54, 2004.

LI, M.Y.; WANG, Y.Y.; CAO, R.; HOU, X. H.; et al. Dietary fish oil inhibits mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in diabetic rats by blocking nuclear factor- κ B-mediated inflammatory pathways. **J. Nutri. Biochem.** v. 26(11), p. 1147-55, 2015.

LOBO, B. W.; LIMA, C.K.; TEIXEIRA, M.S; SILVA, N.L. et al. Fish oil attenuates persistent inflammatory pain in rats through modulation of TNF- α and resolvins. **Life Sci.** v. 152, p. 30-37, 2016.

MARCHLEWICH, E. H.; DOLINOY, D. C.; TANG, L.; et al. Lipid metabolism is associated with developmental epigenetic programming. **Scientific Reports.** 2016.

MAROON, J.C.; BOST, J.W. ω -3 Fatty acids (fish oil) as an anti-inflammatory: an alternative to nonsteroidal anti-inflammatory drugs for discogenic pain. **Surgical Neurology.** v. 65, p. 326–31, 2006.

MARTINDALE, R.G; WARREN, M.M; MCCLAVE, S.A. Does the use of specialized proresolving molecules in critical care offer a more focused approach to controlling inflammation than that of fish oils? **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.** v. 19(2), p. 151-4, 2016.

MESQUITA, T. R.; SOUZA, A. A.; CONSTANTINO, E., PELÓGIA, N. C. C.; POSSO, I. P.; PIRES, O. C. Anti-inflammatory effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids in rats. **Rev. Dor.** v. 12(4), p. 1806-13, 2011.

MOGHADDAMI, M.; JAMES, M.; PROUDMAN, S.; CLELAND, L.G. Synovial fluid and

plasma n3 long chain polyunsaturated fatty acids in patients with inflammatory arthritis. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**. v. 97, p. 7-12, 2015.

NAKAMOTO, K.; NISHINAKA, T.; MANKURA, M.; et al. Antinociceptive Effects of Docosahexaenoic Acid against Various Pain Stimuli in Mice. **Biol. Pharm. Bull.** v. 33(6), p. 1070—72, 2010.

NUNES, F.P.; Caracterização do efeito anti-inflamatório da crotoxina sobre a migração celular induzida pela carragenina. Instituto de Biociência da Universidade de São Paulo 2012.

OTTON, R.; MARIN, D.P.; BOLIN, A.P.; et al. Combined fish oil and astaxanthin supplementation modulates rat lymphocyte function. **Eur. J. Nutr.** 2011.

PINTO Jr, J.A.; FOLADOR, A.; BONATO, S.J.; et al. Fish oil supplementation in F1 generation associated with naproxen, clenbuterol, and insulin administration reduce tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing Rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 15, p. 358–65, 2004.

PIRONI, L.; GUIDETTI, M.; VERRASTRO, O. Functional lipidomics in patients on home parenteral nutrition: Effect of lipid emulsions. **World J. Gastroenterol.** v. 23(25), p. 4604-14, 2017.

RAMSDEN, C.E; RINGEL, A.; MAJCHRZAK-HONG, S.F. Dietary linoleic acid-induced alterations in pro- and anti-nociceptive lipid autacoids: Implications for idiopathic pain syndromes? **Mol. Pain**. v. 12, p. 1-14, 2016.

ROCHA, A.P.C.; KRAYCHETE, D.V.; LEMONICA, T.S.A; et al. Dor: Aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Rev. Bras. Anestesiol.** v. 57(1), p. 94-105.

SALEM, N.; LITMAN, B.; KIM, H.Y.; GAWRISCH, K. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. **Lipids**. v. 36, p. 945-79, 2001.

SIQUEIRA, B.A. Efeito anti-hiperalgésico induzido pela suplementação alimentar com óleo de peixe. Universidade Federal do Paraná. 2012.

SILVA. J.M.; MENDONÇA, P.P.; PARTATA, A.K.; Anti-inflamatórios não-esteróides e suas propriedades gerais. **Revista Científica do ITPAC**. v.7, n.4, 2014.

SOUZA, P.R; NORLING, L.V. Implications for eicosapentaenoic acid- and docosahexaenoic acid-derived resolvins as therapeutics for arthritis. **Eur. J. Pharmacol.** v. 785, p. 165-73, 2016.

STRANDVIK, B.; CHEN, Y.; DANGARDT, F., et al. From the swedish to the mediterranean diet and the omega-6/omega-3 balance. **World Rev. Nutr. Diet.** v. 102, p. 73-80, 2011.

UAUY, R.; MENA, P.; ROJAS, C. Essential fatty acids in early life: structural and functional role. **Proc. Nutr. Soc.** v. 59(1), p. 3-15, 2000.

VEIGAS, J.M.; WILLIAMS, P.J.; HALADE, G.; et al. Fish oil concentrate delays sensitivity to thermal nociception in mice. **Pharmacol Res.** v. 63(5), p. 377-382, 2011.

VINES, A.; DELLATRE, A. M.; LIMA, M. M.; et al. The role of 5-HT A receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: a possible antidepressant mechanism. **Neuropharmacology**. v. 62(1), p.184–91, 2012.

