

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO INDUZIDO PELA
SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM ÓLEO DE PEIXE

BETINA AISENGART DE SIQUEIRA

CURITIBA

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO INDUZIDO PELA
SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM ÓLEO DE PEIXE

Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Biologia Celular e Tecidual, oferecida pelo Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do Título de Especialista em Biologia Celular e Tecidual.

Aluna: Betina Aisengart de Siqueira

Orientadora: Profa. Dra. Luana Fischer

CURITIBA

2012



PÓS-GRADUAÇÃO *LATO SENSU* EM **BIOLOGIA CELULAR E TECIDUAL**



SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que Betina Aisengart de Siqueira foi aprovada no Curso de Especialização em Biologia Celular e Tecidual no Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, apresentando a Monografia "Efeito anti-hiperalgésico induzido pela suplementação alimentar com óleo de peixe", tendo como orientadora a Prof^a Dr^a Luana Fischer.

Por ser verdade firmo a presente declaração.

Curitiba, 04 de abril de 2013.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Randi'.

**Prof Dr Marco Antônio Ferreira Randi
Coordenador do Curso**

Marco Antonio Ferreira Randi
Coordenador do Curso de Especialização
Biologia Celular e Tecidual

Resumo

Tem sido descrito que a ingestão alimentar de ácidos graxos poliinsaturados da família Omega 3 encontrados, por exemplo no óleo de peixe, promove melhora significativa dos sintomas de diversas doenças inflamatórias, porém os mecanismos associados a esse efeito ainda são desconhecidos. Portanto, nossos objetivos para esse estudo foram testar a hipótese de que a suplementação com ácidos graxos poliinsaturados da família Omega 3 reduz a hiperalgesia induzida pela administração de carragenina na pata de ratos e avaliar funcionalmente o possível mecanismo envolvido, determinando o efeito da suplementação alimentar com óleo de peixe na hiperalgesia induzida pela administração de prostaglandina E2 e norepinefrina, que são os mediadores finais, responsáveis pela sensibilização induzida pela carragenina. Foram utilizados para este trabalho 45 ratos Wistar, divididos em 9 grupos experimentais. Os animais receberam, durante 20 dias, suplementação alimentar com óleo de peixe (1 ou 3g/Kg) cedido pela Herbarium Laboratório Botânico Ltda, gordura de coco (3g/Kg) ou água (420µl). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas (*Two Way repeated measure*) seguido pelo pós-teste de Tukey, com níveis de significância $p \leq 0,05$. A suplementação com óleo de peixe (3g/Kg), mas não com 1g/Kg ou com gordura de coco reduziu significativamente a hiperalgesia induzida pela administração de carragenina, não afetou a induzida pela prostaglandina e aumentou aquela induzida pela norepinefrina. Esses dados sugerem que os ácidos graxos poliinsaturados da família Omega 3 reduzem a hiperalgesia inflamatória pela redução da formação enzimática de prostaglandina da família E2.

Palavras chaves: efeito anti-hiperalgésico, ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 (AGPI n-3), carragenina, prostaglandina, norepinefrina

Abstract

It has been reported that intake polyunsaturated fatty acids omega 3 found for example in fish oil, provides a significant improvement of the symptoms of various inflammatory diseases, but the mechanisms associated with this effect is still unknown. Therefore, our aim for this study were to test the hypothesis that supplementation with polyunsaturated fatty acids omega 3 reduces carrageenan-induced hyperalgesia in rats and functionally to test the hypothesis that the mechanism responsible for anti-hyperalgesic effect depends on the reduction in the formation of final mediators responsible for the sensitization induced by carrageenin. We used for this study 45 rats that were divided into 9 experimental groups, they received for 20 days, a dietary supplementation with fish oil (1 or 3g/Kg) given by the Herbarium Laboratório Botânico Ltda, coconut oil (3g/Kg) or water (420 μ L). The data were analyzed by Two Way RM ANOVA followed by post-hoc Tukey and $p \leq 0.05$. Supplementation with fish oil (3g/kg), but not 1g/kg or coconut oil significantly reduced the Carrageenan-induced, did not affect the Prostaglandin-induced and increased the Norepinephrine-induced hyperalgesia. These data suggest that the polyunsaturated fatty acids omega 3 reduces the inflammatory hyperalgesia by reducing the enzymatic formation of prostaglandin E2.

Key words: anti-hyperalgesic effect, polyunsaturated fatty acids omega 3 (PUFA n-3), carrageenan, prostaglandin, norepinephrine.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – ácido araquidônico

ALA – ácido α -linolênico

AGPI – ácido graxo poliinsaturado

AGS – ácido graxo saturado

Cg – carragenina

COX – ciclooxigenase

DHA – ácido docosahexaenoico

DPA – ácido docosapentaenoico

EPA – ácido eicosapentaenoico

ERK – proteínas quinases reguladoras de sinais extracelular

GC – gordura de coco

IL – interleucina

LA – ácido linoléico

LT – leucotrienos

MEC – matriz extracelular

NaCl 0,9% – salina

NE – norepinefrina

OP1 – 1g/Kg de óleo de peixe

OP3 – 3g/Kg de óleo de peixe

PG – prostaglandina

PK – proteína quinase

TNF – fator de necrose tumoral

TX – tromboxano

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Representação esquemática da cascata inflamatória induzida pelo agente inflamatório Carragenina.	9
Figura 2. Representação esquemática da estrutura química dos ácidos graxos precursores e derivados das famílias ômega 3 e 6.	11
Figura 3. Representação esquemática das reações bioquímicas das vias metabólicas dos AGPIs n – 3 e 6.	13
Figura 4. Representação esquemática do mecanismo de ação de ácidos graxos poliinsaturados n – 3.	16
Figura 5. Representação esquemática das vias metabólicas do ácido α linoléico e do ácido linoléico.	17
Figura 6. Efeito da suplementação com óleo de peixe ou com gordura de coco na hiperalgesia induzida pela carragenina.	25
Figura 7. Efeito da suplementação com óleo de peixe na hiperalgesia induzida pela prostaglandina.	26
Figura 8. Eefeito da suplementação com óleo de peixe na hiperalgesia induzida pela norepinefrina.	27
Tabela 1. Média \pm EPM (erro padrão da média) da hiperalgesia induzida por diferentes tratamentos em ratos controles ou suplementados com 1 ou 3g/Kg de óleo de peixe ou 3g/Kg de gordura de coco.	28

SUMÁRIO

Introdução	8
Dor	8
Ácidos Graxos	9
Ácidos Graxos e Dor Inflamatória	17
Objetivos	20
Geral	20
Específicos	20
Materiais e Métodos	21
Animais	21
Suplementação	21
Drogas	21
Teste Comportamental de Hiperalgisia Mecânica	22
Delineamento Experimental	23
Análise dos Dados	24
Resultados	25
Efeito da suplementação com óleo de peixe ou gordura de coco na hiperalgisia induzida pela carragenina	25
Efeito da suplementação alimentar com óleo de peixe na hiperalgisia induzida pela prostaglandina E2	26
Efeito da suplementação alimentar com óleo de peixe na hiperalgisia induzida pela norepinefrina	27
Discussão	29
Conclusão	33
Referências	34

Introdução

Dor

A dor é considerada um dos maiores problemas de saúde pública da sociedade atual e embora nosso conhecimento sobre os mecanismos nociceptivos tenha evoluído muito nos últimos anos, os fármacos utilizados para o controle da dor hoje pertencem à mesma classe de fármacos utilizados há décadas. São basicamente antiinflamatórios e analgésicos opióides cujo uso clínico é marcado por um alto índice de insucessos e/ou de efeitos colaterais que se intensificam com o uso crônico. A maioria das condições dolorosas é de origem inflamatória periférica e vários estudos experimentais têm sido conduzidos com o objetivo de identificar novos alvos moleculares para o tratamento da dor inflamatória em sua origem, ou seja, na periferia.

A injúria tecidual e a inflamação estão associadas à síntese e liberação de mediadores inflamatórios que ativam diretamente os nociceptores primários, induzindo dor espontânea ou que os sensibilizam, fazendo com que respondam a estímulos anteriormente incapazes de ativá-los. Essa sensibilização é um fenômeno comum a todas as dores de origem inflamatória e caracteriza-se pela diminuição do limiar nociceptivo, um processo definido como hiperalgesia (COUTAUX, et al. 2005). O agente inflamatório carragenina (Cg) é muito utilizado em estudos animais de dor e inflamação e, numa perspectiva clínica, seu uso experimental satisfaz os critérios para simular a dor inflamatória em humanos (MORRIS, 2003). Ao induzir a formação de bradicinina e a liberação de citocinas inflamatórias induz a produção de prostaglandinas (PGs) e a liberação de aminas simpatomiméticas que medeiam, em última instância, a hiperalgesia observada nesse modelo (Fig. 1), (FERREIRA, et al. 1993).

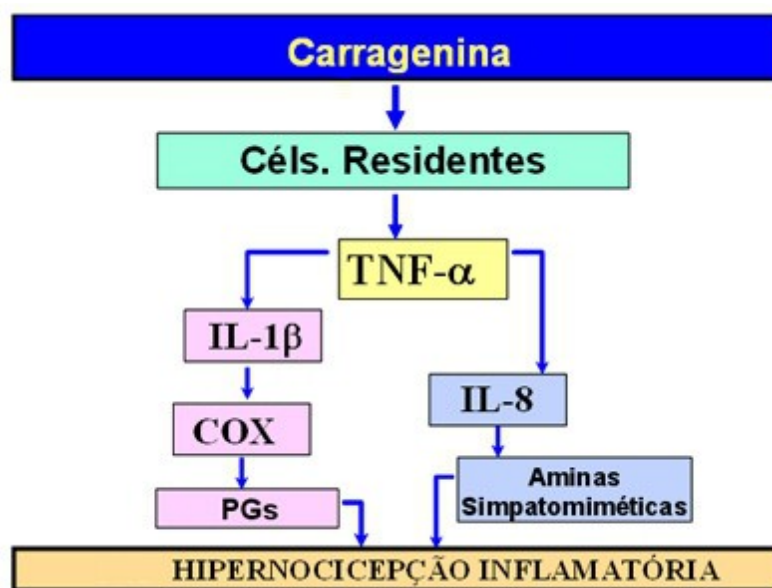


Figura 1. Representação esquemática da cascata inflamatória induzida pela administração do agente inflamatório carragenina. O esquema abaixo ilustra uma inflamação induzida pela Cg que estimula as células residentes do tecido a liberarem TNF- α que, por sua vez, induz a liberação de IL-1 β e IL-8. A IL-1 β promove a ativação de COX responsável pela produção de PGs. A IL-8 promove a produção local de aminos simpatomiméticas (p. ex. dopamina e norepinefrina). As PGs e as aminos simpatomiméticas atuam nos receptores dos neurônios sensitivos primários induzindo a sua sensibilização. TNF (fator de necrose tumoral), IL (interleucinas), COX (ciclooxigenase), Cg (carragenina) e PGs (prostaglandinas). Adaptado de FERREIRA & CUNHA 2012.

ÁCIDOS GRAXOS

Os lipídeos constituem um grupo heterogêneo que em sua maioria contém em sua constituição pelo menos uma molécula de ácidos graxos que são obtidos pela hidrólise das gorduras (WANNMACHER & DIAS, 1988). Têm a propriedade comum de serem relativamente insolúveis na água e solúveis nos solventes não polares como o éter, o clorofórmio e o benzeno (WANNMACHER & DIAS, 1988). Os lipídeos compreendem as gorduras, os óleos, as ceras e compostos relacionados, que exibem diversas funções biológicas no organismo, dentre as quais se destacam as funções de reserva energética e a participação como constituinte fundamental das membranas celulares (WANNMACHER & DIAS, 1988).

Os ácidos graxos são importantes para a manutenção da natureza fluida dos

lipídeos das membranas biológicas, determinam as propriedades biofísicas dessas membranas e participam ativamente de processos de sinalização celular (SALEM et al., 2001). Também desempenham papéis importantes, como agentes emulsificantes, transportadores de elétrons, mensageiros intra e extracelulares e, ainda, funcionam como âncora para as proteínas de membranas (GARRETT & GRISHAM, 1999).

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas de 4 a 36 átomos de carbono que podem apresentar cadeia saturada, a qual não contém dupla ligação entre carbonos, ou cadeia insaturada, com uma ou mais duplas ligações entre carbonos. As propriedades físicas dos ácidos graxos e dos compostos que os contêm são amplamente determinadas pelo comprimento e pelo grau de insaturação da cadeia hidrocarbônica (LEHNINGER et al., 1998). De acordo com o tipo de ligações presentes em cada estrutura molecular, podemos classificar os ácidos graxos como saturados (AGS), monoinsaturados e poliinsaturados (AGPI). A presença de insaturação na cadeia hidrocarbônica dificulta a interação intermolecular, fazendo com que, em geral, estes ácidos graxos se apresentem a temperatura ambiente no estado líquido. Já os saturados, que possuem maior facilidade desta interação, apresentam-se no estado sólido (HULBERT et al., 2005).

Os AGS são de cadeia curta ou média, portanto de fácil metabolização e baixa capacidade de oxidação, tanto no ambiente quanto no organismo (ITAHPHUAK, et al 2010). A ingestão exagerada de AGS, como por exemplo as encontradas em carne vermelha, margarinas e biscoitos, pode causar alterações desfavoráveis no perfil lipídico plasmático, levando a obesidade, hipertensão, dislipidemia e diabetes que são importantes fatores de risco para doenças cardiovasculares (GAGLIARDI, 2009).

No entanto, quando ingeridos em quantidades adequadas esses AGS desempenham relevante papel biológico (GAGLIARDI, 2009). A gordura de coco (GC)

é um derivado da massa do coco, rico em AGS e recentes pesquisas comprovam a sua atividade antiinflamatória devido à sua capacidade de elevar os níveis da interleucina (IL)-10, um poderoso agente antiinflamatório (ITAHPHUAK, et al 2010). Além disso, foi atribuído a GC a redução do risco de câncer, regularização do ritmo intestinal, controle do diabetes, melhora da digestão e absorção de nutrientes, aumento da taxa metabólica, prevenção da osteoporose, e devido sua ação antioxidante, reduz o processo de envelhecimento (ITAHPHUAK, et al 2010).

Os AGPIs podem ser subdivididos em duas famílias de acordo com a posição da primeira insaturação da cadeia carbônica em relação à extremidade metila terminal. Os ácidos graxos pertencentes à família ômega 3 (ω -3 ou n-3) possuem sua primeira dupla ligação no terceiro carbono a partir da extremidade metila e os pertencentes à família ômega-6 (ω -6 ou n-6), possuem sua primeira dupla ligação no sexto carbono (Fig. 2).

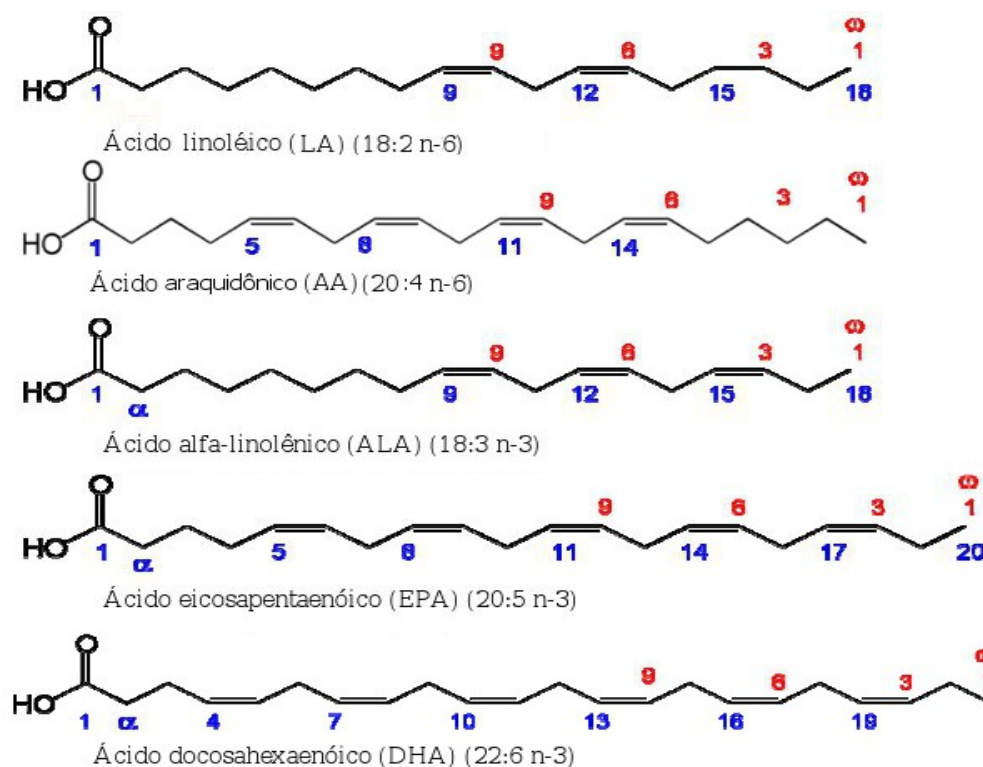


Figura 2. Representação esquemática da estrutura química dos ácidos graxos precursor e derivados das famílias ômega 3 e 6. Precursor ácido graxo linoléico (LA) e seu derivado o ácido araquidônico (AA), precursor ácido graxo α -linolênico (ALA) e seus derivados os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), mostrando as convenções de numeração fisiológica (em vermelho) e química (em azul). Adaptado de GARRETT & GRISHAM, 1999.

As diferentes posições e o número de duplas ligações conferem aos ácidos graxos, diferentes propriedades químicas, nutricionais e funcionais (GARRETT & GRISHAM, 1999). Cada família, n-3 e n-6 tem um ácido graxo precursor, sendo o ácido linoléico (LA, 18:2 n-6) o precursor dos AGPIs n-6, dentre eles o AA (ácido araquidônico) e o DPA (ácido docosapentaenoico) e o ácido α -linolênico (ALA, 18:3 n-3) precursor dos AGPIs n-3, representados pelo EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosahexaenóico). Ambos, os precursores são considerados essenciais, devendo ser providos pela dieta, pois os mamíferos não possuem enzimas específicas para sintetizá-los (Fig. 3), (OZIAS et al., 2007). Ambos são encontrados em abundância em sementes de plantas oleaginosas, por exemplo, soja, milho e girassol são ricas em LA, enquanto linhaça e canola contêm grandes quantidades de ALA (HULBERT et al., 2005). O fitoplâncton, que constitui a base da cadeia alimentar nos oceanos sintetiza ambos os precursores, e por este motivo, tanto o LA quanto o ALA são encontrados em abundância em animais marinhos, especialmente em peixes de águas frias e profundas (HULBERT et al., 2005). O óleo de peixe (OP), utilizado na suplementação alimentar nesse estudo, tem grandes quantidades de EPA e DHA, derivados do ALA, que são os responsáveis por grande parte dos efeitos benéficos atribuídos aos AGPIs n-3, conforme exposto abaixo. A presença de quantidades significativas desses derivados confere ao OP vantagens quando comparado a outras fontes de ALA, como por exemplo, a semente de linhaça, uma vez que a conversão do ALA, presente na linhaça, pode estar comprometida em função da diminuição da expressão das enzimas dessaturases específicas, situação comum, por exemplo, em indivíduos idosos.

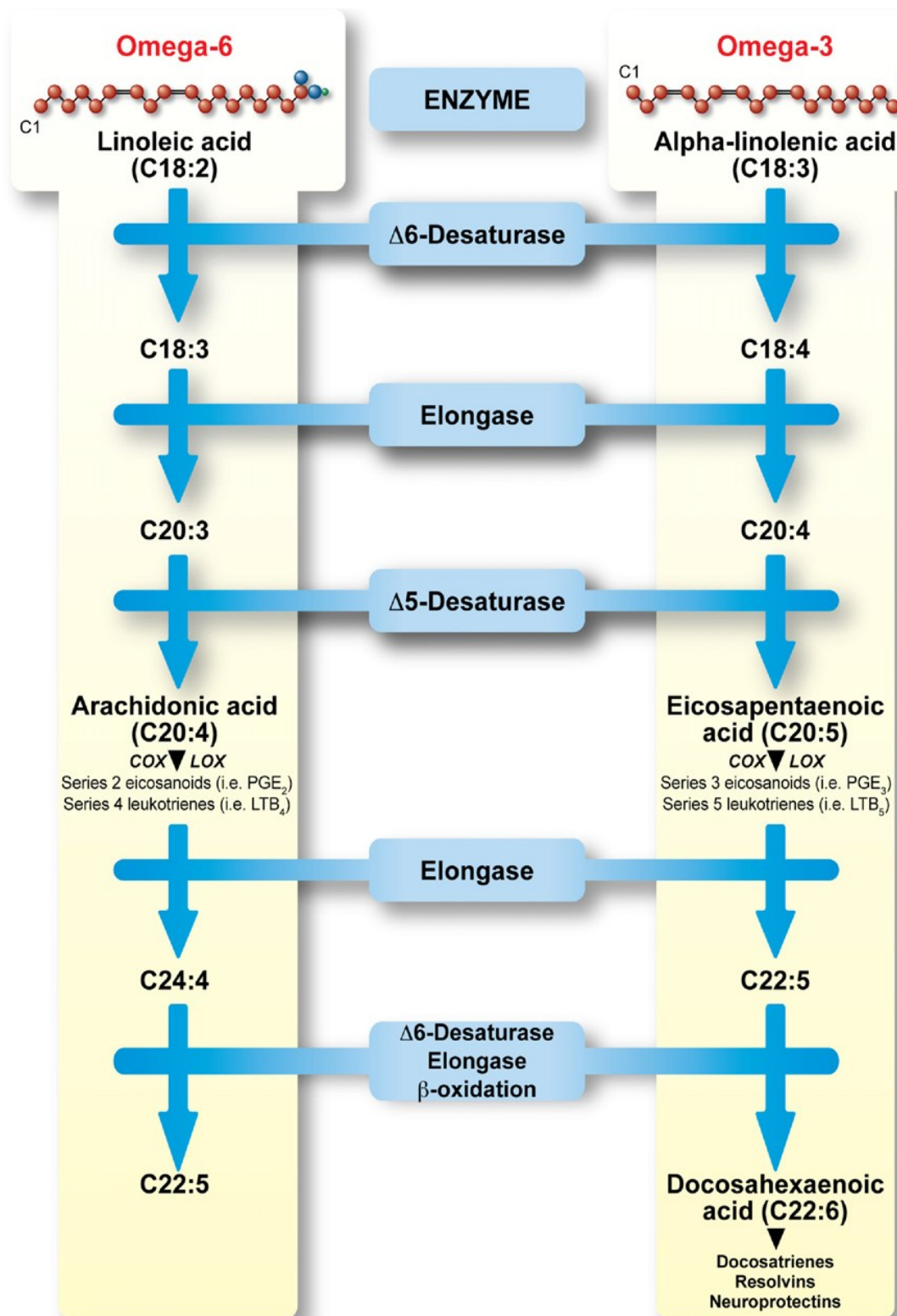


Figura 3. Representação esquemática das reações bioquímicas das vias metabólicas dos AGPIs n-3 e 6. Fonte: BOUSQUET, et al. 2011.

Nos últimos anos houve um substancial aumento no consumo de AGPIs n-6 e redução de n-3, especialmente na sociedade ocidental (PINTO Jr, et al 2004). Essa alteração nos hábitos alimentares tem sido associado com um aumento da incidência e da prevalência de várias doenças. Por exemplo, acredita-se que haja uma relação direta entre a mudança nos hábitos alimentares e o desenvolvimento e crescimento de diversos tumores e a suplementação alimentar com AGPI n-3 tem se mostrado eficiente na prevenção e supressão do crescimento tumoral (PINTO Jr, et al 2004). Também tem sido sugerido que a razão n-3/n-6 tem um importante papel na fisiopatologia de doenças psiquiátricas. Por exemplo, foi demonstrado que o metabolismo dos neurotransmissores serotonina e dopamina é sensível a essa razão, que quando aumentada, promove um aumento da liberação desses neurotransmissores e conseqüentemente, induz a efeitos antidepressivo (VINES, et al 2012). Além disso, o AGPI n-3 apresenta, um efeito antitrombótico devido ao aumento da produção de tromboxanos (TX) A₂ que reduz a agregação plaquetária e dilata os vasos sanguíneos, resultando na redução de riscos de doenças cardiovasculares e de acidente vascular encefálico isquêmico (CLARKE, et al 2005). No entanto, o efeito dos AGPIs n-3 parece ser especialmente proeminente nas doenças inflamatórias, como exposto a seguir.

No sangue, os AGPIs podem estar incorporados a triglicerídeos, fosfolipídios, colesterol e/ou a proteínas plasmáticas, tais como albumina, da qual eles se separam e penetram a membrana celular, incorporando-se a ela (BOUSQUET, et al. 2011). Vista a importância dos lipídeos na função celular, a regulação de sua incorporação na membrana celular e seu metabolismo são críticos.

Os AGPIs uma vez incorporados a membrana, podem sofrer a ação de fosfolipases A₂ que são um grupo de enzimas responsáveis por liberar ácidos graxos pela hidrólise dos fosfolipídeos de membrana (BOUSQUET, et al. 2011). No entanto,

mais de 90% dos derivados de AGPIs (DHA da família n-3 e AA da família n-6) liberados da membrana são rapidamente re-esterificados e retornam a ela (BOUSQUET, et al. 2011). Parte do AGPI livre no citosol fornece energia para a célula, através de vias de degradação específicas, tais como reações de β -oxidação na mitocôndria ou servem como lipídeos mensageiros que podem engatilhar cascatas de sinalização intracelular, incluindo apoptose, proliferação celular e processos inflamatórios (Fig. 4), (BOUSQUET, et al. 2011). Com relação aos processos inflamatórios, o AA e DHA têm papel essencial, ambos são metabolizados pela enzima ciclooxigenase (COX), competindo por sua ação. A metabolização do AA livre no citosol pela COX, formam prostaglandina (PG) E2 e leucotrieno (LT) B4 que são mediadores inflamatórios potentes, o DHA livre no citosol quando metabolizado pela COX, formam PGE3 e LTB5 que são mediadores antiinflamatórios (Fig. 5), (MAROON & BOST, 2006). Com o aumento na ingestão de AGPIs n-3, por exemplo, devido ao consumo de óleo de peixe, ocorre uma maior incorporação de DHA na membrana celular, diminuindo a proporção n-6/n-3, e portanto, aumentando a formação de eicosanóides derivados do DHA em comparação com aqueles derivados do AA (CALDER, 2007).

Possivelmente esse seja o mecanismo responsável, em grande parte, pelo efeito antiinflamatório atribuído a esses ácidos graxos, pois os eicosinóides inflamatórios derivados de DHA são antiinflamatórios (BRUNBORG, 2008).

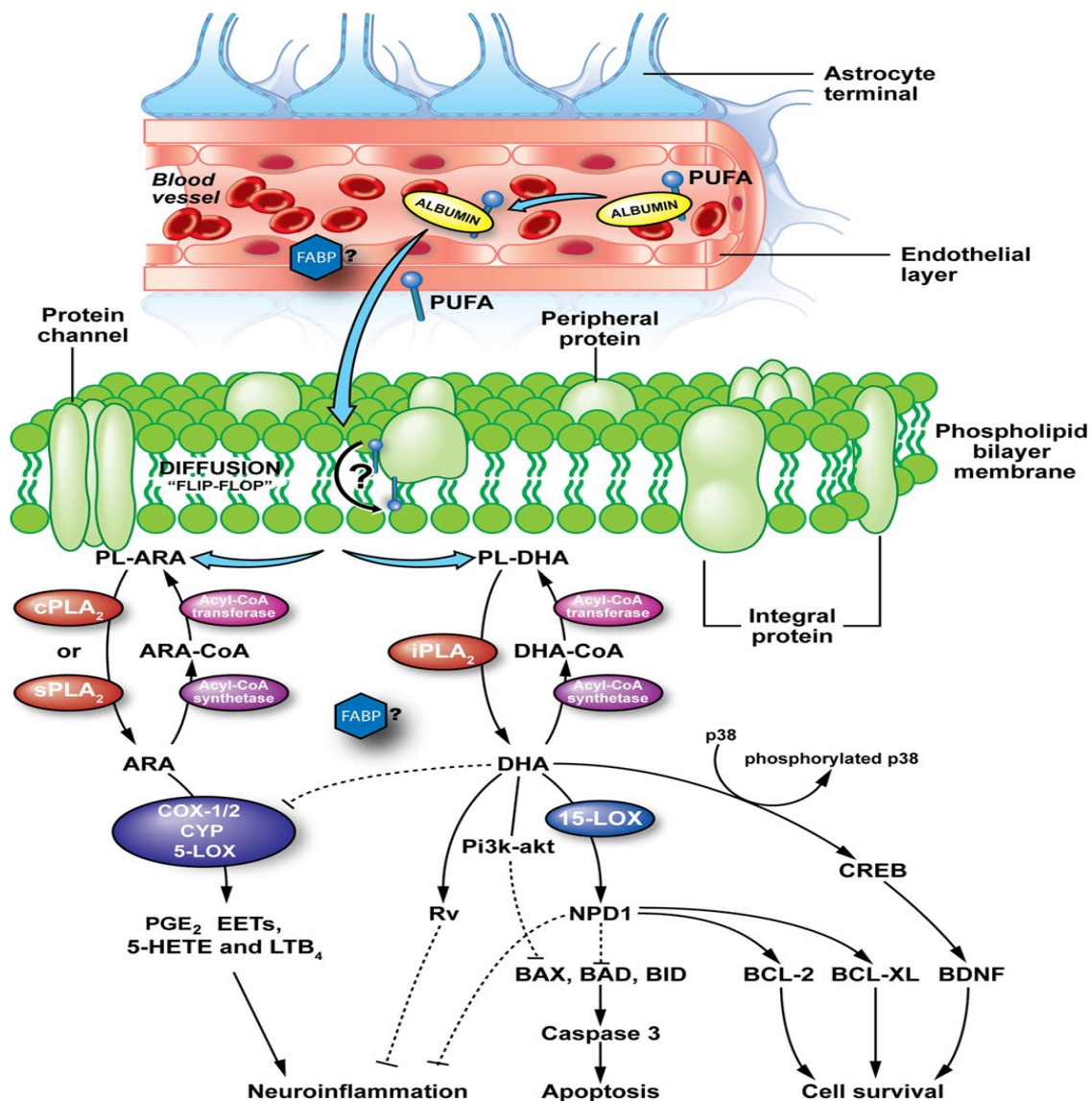


Figura 4. Representação esquemática do mecanismo de ação de ácidos graxos poliinsaturados n – 3. Antes de atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE) e integrar a membrana celular, PUFAs circulam na corrente sanguínea. A maior parte de DHA no sangue estão ligados às proteínas, principalmente albumina, mas pensa-se que os ácidos graxos atravessam a BHE predominantemente no seu estado livre, não acoplado. Embora ainda hipotética, FABP podem se ligar a ácidos graxos para o transporte interno dentro das células endoteliais e do cérebro. A presença de DHA na bicamada de fosfolípido aumenta a fluidez da membrana e contribui para melhorar as funções de vários receptores e canais de membrana, bem como outras proteínas. Através da ação catalítica de uma PLA₂, PUFAs são liberados no compartimento citosólico e agem em várias vias, incluindo a apoptose, neuroinflamação e sobrevivência celular. (ARA, o ácido araquidônico; BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo; cPLA₂, fosfolipase A2 citosólica; COX, ciclooxigenase; DHA, ácido docosahexaenóico; FABP, proteína de ligação de ácido graxo; iPLA₂, fosfolipase A2 independente de Ca₂; LOX, lipoxigenase; LTB, leucotrieno B; PGE, prostaglandina E; PL, fosfolipídios; NPD1, neuroprotetina D1; Rv, resolvina; sPLA₂, fosfolipase A2 secretada; PUFA, ácidos graxos poliinsaturados; 5-HETE, ácido 5-hidroxiicosatetraenóico; EETs, ácidos Epoxieicosatrienoico; PI3K, fosfoinositida 3-quinase). Fonte: BOUSQUET, et al. 2011.

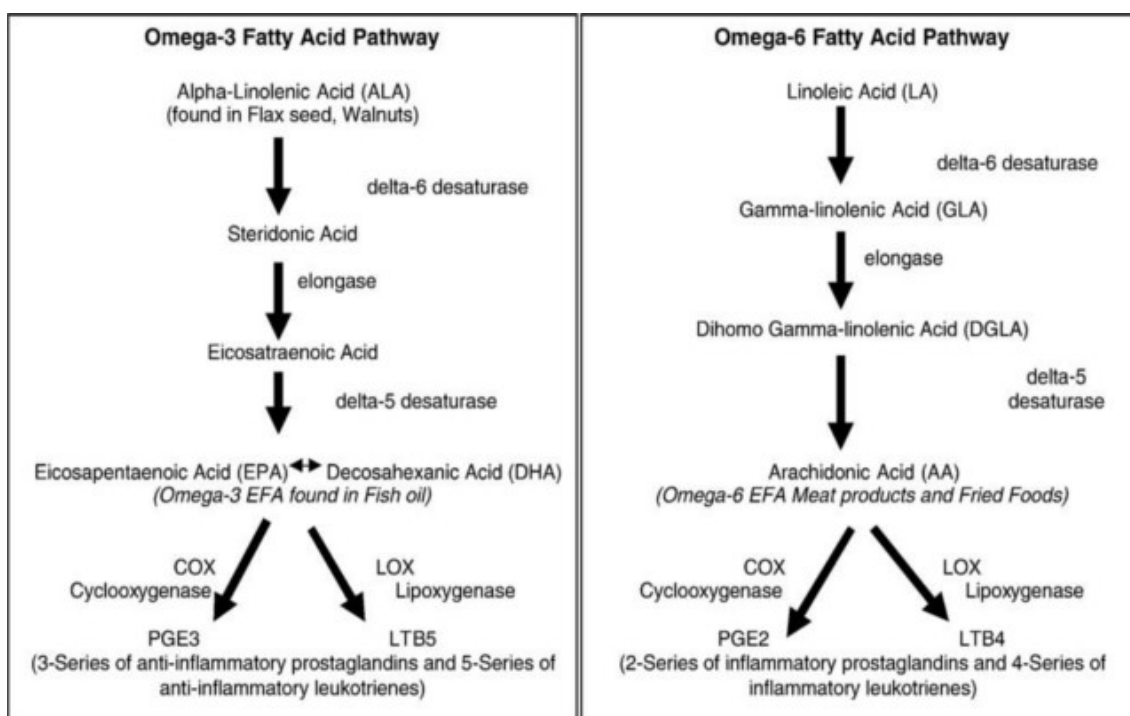


Figura 5. Representação esquemática das vias metabólicas do ácido α linoléico e do ácido linoléico. Fonte: MAROON & BOST, 2006.

Ácidos Graxos e Dor Inflamatória

Dor inflamatória se desenvolve em resposta a mediadores liberados no local da lesão tecidual, enquanto alguns destes mediadores ativam diretamente nociceptores, levando a nocicepção evidente, outros agem por sensibilizá-los (CUNHA, et al.2010).

Eicosanoides e aminas simpáticas são os mediadores primários mais importantes responsáveis pela hiperalgesia mecânica em ratos (CUNHA, et al.2010). Esses mediadores ativam vias de segundo mensageiros responsáveis pelo baixo limiar hiperalgésico e aumento da excitabilidade da membrana neuronal (CUNHA, et al.2010). Neste estado, a ativação do nociceptor e transmissão de impulsos pelos neurônios aferentes primários são facilitados (CUNHA, et al.2010).

As prostaglandinas, especialmente aquelas da série E2, são consideradas mediadores chave da sensibilização dos nociceptores e, conseqüentemente, da dor inflamatória, como é extensamente demonstrada e suportada pela eficácia analgésica dos inibidores de COX (BURIAN & GEISSLINGER, 2005). Os receptores de

prostaglandina E₂ (EP₂) encontram-se nos neurônios aferentes primários e são acoplados a proteína G (DRAY, 1995). Ao se ligar ao EP₂, a PGE₂ ativa a adenilato ciclase, que por sua vez, induz a formação de adenosina monofosfato cíclico (DRAY, 1995). Estes eventos iniciais, induzem a ativação secundária de PK-A, que está amplamente envolvida nas mudanças bioquímicas que medeiam o processo de sensibilização do neurônio aferente primário (DRAY, 1995).

A norepinefrina produz hiperalgesia diretamente através de sua ação em receptores β ₂-adrenérgicos, que são acoplado a proteína G, localizados no neurônio aferente primário (KHASAR, et al. 1999). Este efeito é mediado por PK-C e resulta na modulação de canais iônicos que controlam a excitabilidade desses neurônios (KHASAR, et al. 1999). Os mecanismos iniciados pela NE nesses neurônios induzem alteração da matriz extracelular (MEC), na qual estão fixadas uma família de proteínas transmembrana compostas por duas subunidades α e β , ligadas não covalentemente, conhecidas como integrinas, estas interagem tanto com o meio extra (interações célula-célula) quanto intracelular (interações célula – MEC) com outras proteínas, e desencadeia uma casacata de eventos que modulam a função celular em resposta a mudanças no ambiente (HYNES, 2002).

É bem conhecido que AGPIs n-3 tem um papel importante nas doenças inflamatórias, vários estudos relatam mecanismos pelos quais a suplementação de roedores ou seres humanos com OP reduzem a hiperalgesia inflamatória, como por exemplo, pela redução da produção de citocinas inflamatórias pelos monócitos e macrófagos (HUGHES, 2000; ESPERSON, et al 1992), a ingestão de AGPIs n-3 demonstra reduzir a dor articular e a rigidez matinal de pacientes portadores de artrite reumatóide pela inibição de IL-1 β e TNF- α (NAKAMOTO, et al 2010). Diferentes modelos experimentais de dor demonstraram que AGPIs n-3 tem efeito antinociceptivo

associado a ativação de receptores opióides (KREMER, 2000). Segundo OTTON, et al (2011), o efeito antiinflamatório do OP é devido os AGPIs n-3 reduzirem a proliferação de linfócitos pela inibição da progressão do ciclo celular induzida pela IL-2 (OTTON, et al 2011). A razão dessa discrepância de mecanismos antiinflamatórios associados ao AGPIs n-3, não está totalmente clara, mas a dose de OP usada, os fatores técnicos, as diferenças entre os sujeitos estudados e o tempo da suplementação, de fato seriam os mais prováveis fatores de contribuição (CALDER, 2007).

Como visto acima, a literatura sobre o efeito dos AGPIs n-3 na inflamação, até o momento, tem se concentrado em avaliar seus efeitos sobre a reação inflamatória e sobre a progressão de doenças inflamatórias. Poucos estudos se dedicaram a avaliar especificamente a ação dos AGPIs da família Omega 3 na dor inflamatória e os dados obtidos até o momento são insuficientes para determinar se, de fato, esses ácidos graxos diminuem a síntese de prostaglandinas em nível suficiente para amenizar a dor inflamatória. Portanto, é essencial que se façam estudos controlados que avaliem especificamente a ação dos AGPIs n-3 na dor inflamatória, pois se comprovada sua eficácia, o potencial terapêutico é enorme.

Objetivos

Geral

O objetivo desse estudo é testar a hipótese de que a suplementação alimentar com ácidos graxos poliinsaturado ômega 3, presentes no óleo de peixe, diminui a hiperalgesia inflamatória.

Específicos

Avaliar o efeito de diferentes doses de AGPI n-3, presentes no OP, na hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de carragenina.

Avaliar funcionalmente o possível mecanismo envolvido, determinando o efeito da suplementação alimentar com OP na hiperalgesia induzida pela administração de prostaglandina E2 e norepinefrina, que são os mediadores finais, responsáveis pela sensibilização induzida pela carragenina.

Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizadas para este trabalho 45 ratos (machos) da linhagem Wistar de 50 dias de idade pesando aproximadamente 200 gramas, obtidos do Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e mantidos no Biotério de Fisiologia em gaiolas plásticas contendo cepilho (cinco animais por gaiola), em ambiente com controle de luminosidade (ciclos claro/escuro de 12hs) e de temperatura ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) com alimentação e água *ad libitum*. A troca do cepilho e gaiolas foi feita em dias alternados. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Paraná (protocolo número 597) estando de acordo com as diretrizes propostas pela Associação Internacional para Estudo da Dor (ZIMMERMANN, 1983).

Suplementação

Animais de 50 dias de idade receberam suplementação alimentar com óleo de peixe 1 ou 3g/Kg (OP 1 ou 3 respectivamente), gordura de coco 3g/Kg (GC) ou 420 μL de água (grupo controle C) durante 20 dias antes do teste de hiperalgesia, via oral, por meio de pipeta de volume ajustável. O óleo de peixe é composto de 12% de ácido docosahexaenóico (DHA), 18% de ácido eicosapentaenóico (EPA) e antioxidante tocoferol e foi cedido pela Herbarium Laboratório Botânico Ltda. A gordura de coco foi utilizada como controle para ingestão de lipídeos.

Drogas

Salina (NaCl 0,9%), Carragenina (Cg) 100 μg (CUNHA et al., 2008), Prostaglandina E2 (PGE2) 100ng (CUNHA et al., 2008) e Norepinefrina (NE) 100ng (ALEY et al., 2003) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil. Todas as

drogas foram dissolvida em salina. As doses de Cg, PGE2 e NE foram baseadas em estudos da literatura e são doses classicamente utilizadas em estudos de hiperalgesia.

Teste comportamental de hiperalgesia mecânica

O limiar da hiperalgesia mecânica foi avaliado pelo método de Von Frey eletrônico (Insight, Ribeirão Preto – SP, Brasil). Para adaptação, os ratos foram colocados numa sala silenciosa em caixas de acrílico (12 x 12 x 17 cm) com assoalho de arame, 15 minutos antes de começar a avaliação. Durante o período de adaptação, as patas foram testadas três vezes. O teste consistiu em evocar um reflexo de retirada da pata induzida pela força de um transdutor adaptado e conectado a uma ponteira a qual possui uma ponta de 0,7 mm² de calibre (filamento de Von Frey eletrônico; IITC Life Science, Wood-land Hills, CA). Um espelho inclinado posicionado debaixo das caixas de acrílico permite uma visualização mais clara da face plantar das patas traseiras. O estímulo foi aplicado três vezes na pata, e a resposta do animal foi considerada a média destas três aplicações. Na ausência da resposta a 60 g, este valor foi anotado como limiar de resposta do animal (medida de corte). 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 medida em cada tempo pós-tratamento, ou seja, foi obtido um valor “ Δ ” calculado pela subtração dos valores obtidos depois do tratamento dos valores obtidos antes do tratamento. As medidas foram realizadas 1, 3 e 6 horas após a injeção.

Cada animal foi utilizado uma única vez e foi eutanasiado imediatamente após o término do experimento pela inalação em excesso de isoflurano (anestésico geral). A morte foi garantida pelo deslocamento cervical após a inalação do excesso de anestésico.

Delineamento Experimental

Todo o procedimento experimental foi realizado na seguinte seqüência: mensuração do limiar mecânica (medidas basais), injeção intraplantar (30 μ L), mensuração da hiperalgesia mecânica 1, 3 e 6 horas após a injeção de drogas. Esses tempos foram escolhidos em função bem determinada da curva temporal da resposta hiperalgésica, induzida pela carragenina (Cg) e seus mediadores finais prostaglandina E2 (PGE2) e norepinefrina (NE).

Determinação do efeito anti-hiperalgésico de diferentes doses de óleo de peixe (OP):

- Grupo 1 controle negativo (n=5): injeção de NaCl 0,9% na pata e suplementação com água (420 μ L).
- Grupo 2 controle (n=5): injeção de Cg (100 μ g) na pata e suplementação com água (420 μ L).
- Grupo 3 controle de ingestão lipídica (n=5): injeção de Cg (100 μ g) na pata e suplementação com GC (3g/Kg).
- Grupos 4 – 5 OP (n=5 cada grupo): injeção de Cg (100 μ g) na pata e suplementação com OP (1 ou 3g /Kg).

Efeito da suplementação alimentar com óleo de peixe sobre a hiperlagesia induzida pela PGE2:

- Grupos PGE2 6 – 7 (n=5 para cada grupo): injeção de PGE2 (100ng) na pata e suplementação com OP (3g/Kg) ou água.

Efeito da suplementação alimentar com óleo de peixe sobre a hiperlagesia induzida pela NE:

- Grupos NE 8 – 9 (n=5 para cada grupo): injeção de NE (100ng) na pata e suplementação com OP (3g/Kg) ou água.

Análise dos dados

Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas (*Two Way repeated measure*) seguido pelo pós-teste de Tukey, com o objetivo de avaliar as interações tempo vs. tratamento. O nível de significância foi determinado em $p \leq 0,05$. Os dados estão apresentados como média do grupo \pm erro padrão da média (média \pm e.p.m). Para realização dos cálculos estatísticos utilizamos o programa Sigma Plot.

Resultados

Efeito da suplementação com óleo de peixe ou com gordura de coco na hiperalgesia induzida pela carragenina

A suplementação com OP3, mas não com OP1, GC e água, reduziu significativamente a hiperalgesia induzida pela Cg em todos os tempos testados, ou seja, 1, 3 e 6 horas após a injeção (fig. 6 e tabela 1, ANOVA de duas vias com medidas repetidas (*Two Way repeated measure*) seguido pelo pós-teste de Tukey, com níveis de significância $p \leq 0,05$).

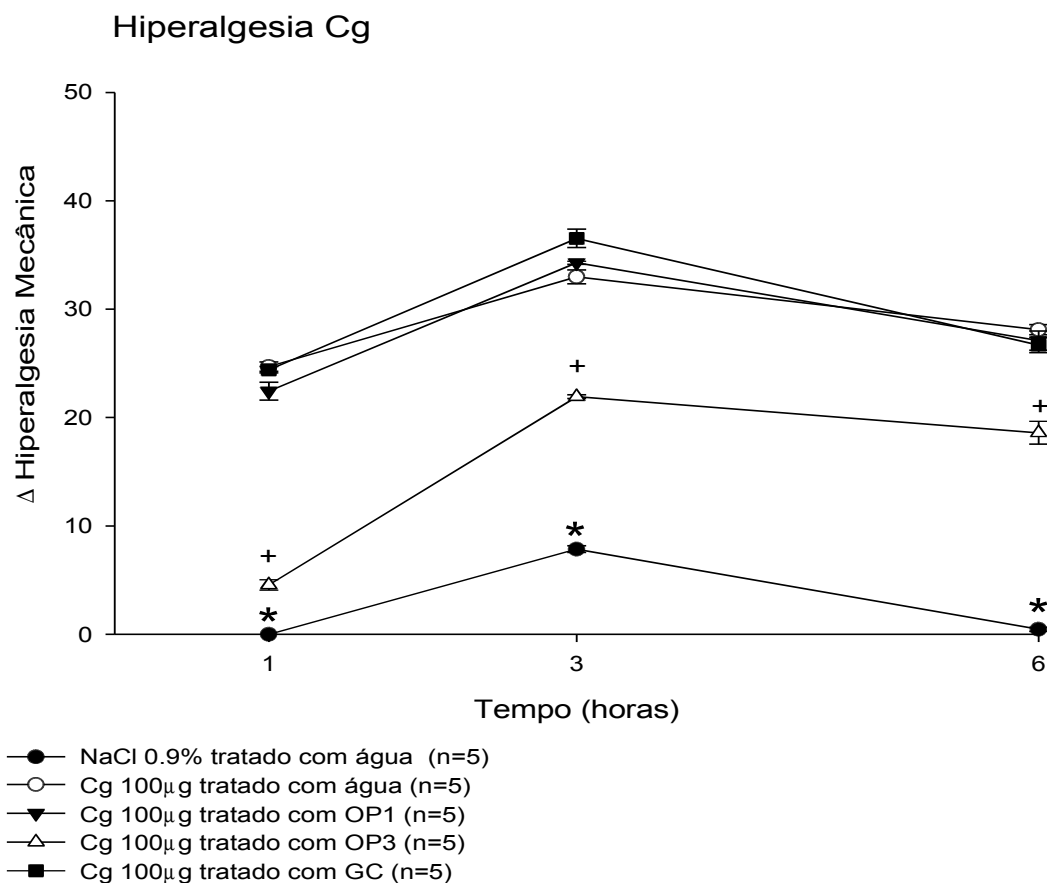


Figura 6. Efeito da suplementação alimentar com óleo de peixe na hiperalgesia e edema induzidos pela administração de carragenina na pata de ratos. A suplementação com 3mg/Kg de óleo de peixe (OP3) reduziu a resposta hiperalgésica nos 3 tempos testados após a injeção. Os símbolos * indicam resposta significativamente menor que aquela de todos os outros grupos e os símbolos + indicam resposta significativamente menor que aquela observada nos grupos que receberam água (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Tukey, com níveis de significância $p \leq 0,05$).

Efeito da suplementação alimentar com óleo de peixe na hiperalgesia induzida pela Prostaglandina E2

A suplementação com OP3 não afetou a hiperalgesia induzida pela PGE2, exceto por uma pequena redução 6 horas após a injeção (fig. 7 e tabela 1, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Tukey).

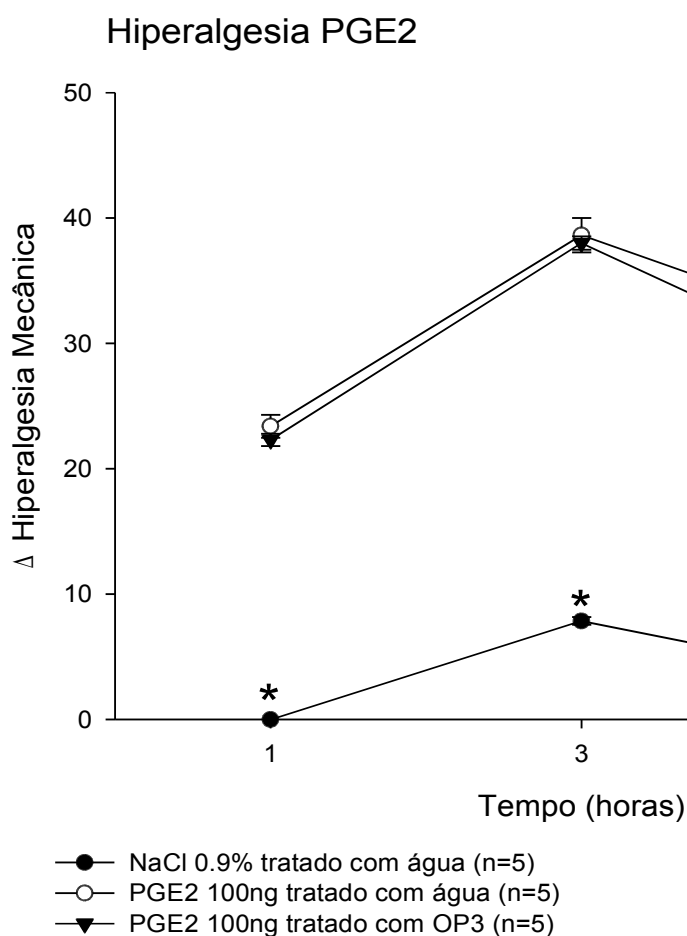


Figura 7. Efeito da suplementação alimentar com óleo de peixe na hiperalgesia e no edema induzidos pela administração de prostaglandina na pata de ratos. A suplementação alimentar com 3mg/Kg de óleo de peixe (OP3) reduziu ligeiramente a resposta hiperalérgica 6 horas após a injeção de PGE2. Os símbolos * indicam resposta significativamente menor que todos os outros grupos e os símbolos + indicam resposta significativamente menor que aquela observada nos grupos que receberam água (ANOVA de duas vias com medidas repetidas (*Two Way repeated measure*) seguido pelo pós-teste de Tukey, com níveis de significância $p \leq 0,05$).

Efeito da suplementação alimentar com óleo de peixe na hiperlagesia induzida pela Norepinefrina

A suplementação com OP3, aumentou significativamente a hiperlagesia induzida pela administração de NE na pata de ratos em todos os tempos testados, ou seja, 1, 3 e 6 horas após a injeção (fig. 8 e tabela 1, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Tukey).

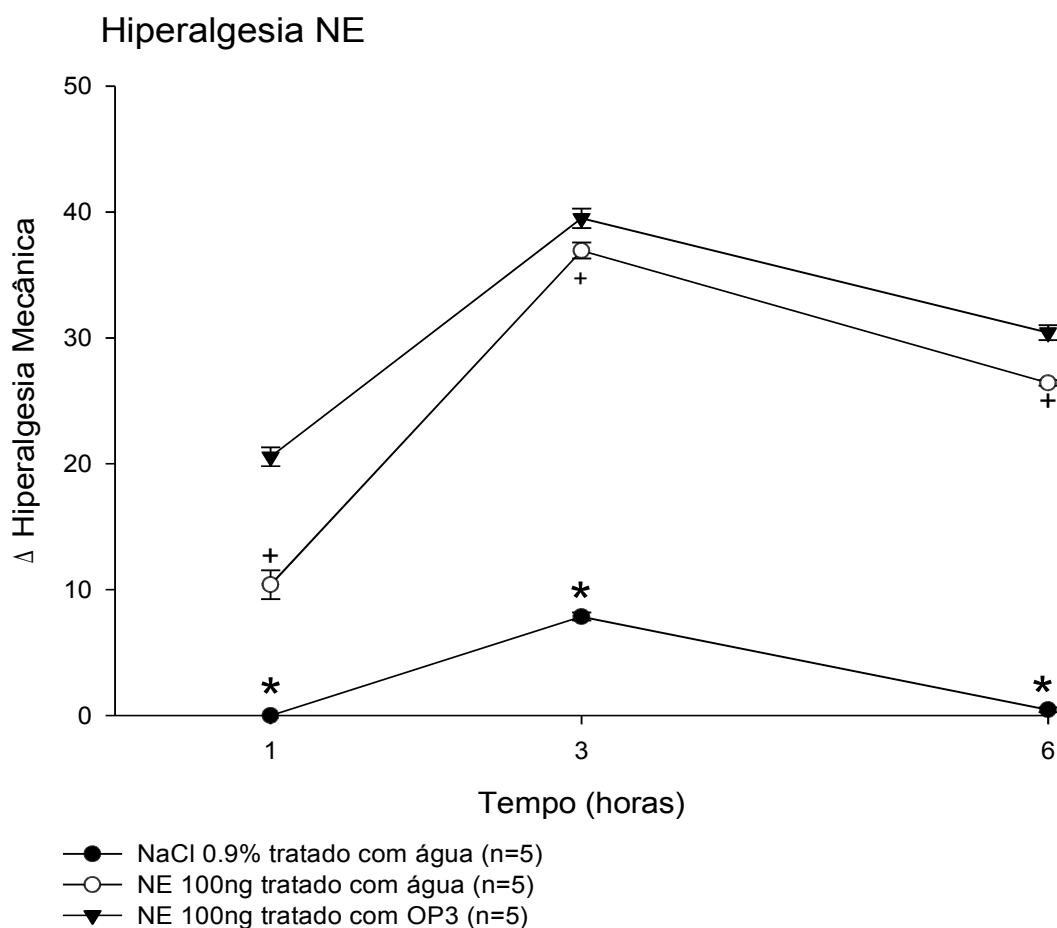


Figura 8. Efeito da suplementação alimentar com óleo de peixe na hiperlagesia e no edema induzidos pela norepinefrina na pata de ratos. A suplementação alimentar com OP3 (3g/Kg de óleo de peixe) aumentou a resposta hiperalgésica nos 3 tempos testados (1, 3 e 6 horas) após a injeção de NE. Os símbolos * indicam resposta significativamente menor que todos os outros grupos e os símbolos + indicam resposta significativamente menor que aquela observada nos grupos que receberam água (ANOVA de duas vias com medidas repetidas (*Two Way repeated measure*) seguido pelo pós-teste de Tukey, com níveis de significância $p \leq 0,05$).

Tabela 1. Média \pm EPM (erro padrão da média) da hiperalgesia induzida por diferentes tratamentos em ratos controles ou suplementados com 1 ou 3g/Kg de óleo de peixe ou 3g/Kg de gordura de coco.

<i>Hiperalgisia Média \pm EPM</i>	<i>NaCl 0,9%</i>	<i>Cg</i>	<i>OP1 Cg</i>	<i>OP3 Cg</i>	<i>GC Cg</i>	<i>PGE2</i>	<i>PGE2 OP3</i>	<i>NE</i>	<i>NE OP3</i>
1 hora	0 \pm 0	24,70 \pm 0,43	22,42 \pm 0,81	12,63 \pm 0,51	24,41 \pm 0,29	23,39 \pm 0,91	28,72 \pm 0,48	10,38 \pm 1,15	20,55 \pm 0,74
3 horas	7,85 \pm 0,31	32,99 \pm 0,64	34,28 \pm 0,14	26,76 \pm 0,38	36,53 \pm 0,83	38,63 \pm 1,37	38,00 \pm 0,52	36,94 \pm 0,63	39,50 \pm 0,77
6 horas	0,45 \pm 0,19	28,11 \pm 0,46	27,10 \pm 0,88	25,31 \pm 0,31	26,68 \pm 0,67	25,49 \pm 1,47	20,80 \pm 0,20	26,42 \pm 0,22	30,42 \pm 0,59

O tecido da pata traseira de todos os animais foi coletado com o objetivo de demonstrar, por HPLC, a incorporação de DHA nas membranas celulares. Nos animais tratados com Cg também avaliaremos se o OP diminuiu a formação enzimática de PGE2.

O estômago dos animais foi retirado com o objetivo de avaliar possíveis danos a mucosa gástrica induzidos pela redução da formação de prostaglandina protetora, o que seria um efeito deletério do OP. Os dados obtidos até o momento não indicam qualquer alteração na mucosa gástrica dos animais que receberam as diferentes doses (1 ou 3g/Kg) de OP (dados não mostrados).

Discussão

Este trabalho demonstra que a suplementação alimentar com óleo de peixe diminui substancialmente a hiperalgesia inflamatória induzida pela administração de carragenina na pata de ratos. Uma vez que a hiperalgesia induzida pela prostaglandina não foi afetada e aquela induzida pela norepinefrina foi aumentada por esse tratamento, os dados sugerem que o efeito anti hiperalgésico do óleo de peixe é mediado pela diminuição da formação enzimática de PGs.

O efeito anti hiperalgésico dos AGPIs n-3 presentes no óleo de peixe é dose dependente e não se estende a gorduras saturadas. Enquanto a suplementação com OP1 não afetou, aquela com OP3 reduziu em cerca de 50% a hiperalgesia inflamatória induzida pela administração intraplantar de Cg. Por outro lado, dose equivalente (3g/Kg) de GC não induziu qualquer efeito anti hiperalgésico. De acordo com os nossos dados já foi demonstrado que o efeito anti depressivo do OP também é evidente com a dose de 3g/Kg, mas não com a de 1g/Kg (dados não publicados) ou com GC (FERRAZ, et al. 2008). De fato, efeitos benéficos da suplementação com óleo de peixe nessa dose têm sido relatados em estudos sobre depressão e parkinson (VINES, et al. 2012; CORDELLINI, et al. 2011).

O agente inflamatório carragenina é muito utilizado em estudos animais de dor e inflamação e numa perspectiva clínica, satisfaz os critérios para simular a dor inflamatória em humanos. A Cg induz a liberação de fator de necrose tumoral- α (TNF) que induz subsequentemente a liberação de IL-1 β e IL-8 que por sua vez, estimulam a formação e a liberação respectivamente de prostaglandinas e de aminas simpatomiméticas que medeiam, em última instância, a hiperalgesia observada nesse modelo (Fig. 1), (CUNHA, et al.2010; MORRIS, 2003). Portanto, diante da relevante diminuição da hiperalgesia induzida pela Cg em animais que receberam suplementação

alimentar com OP, o passo seguinte foi testar o efeito desse tratamento na hiperlgesia induzida pelos mediadores finais responsáveis por essa hiperlgesia, ou seja, PGE2 e NE.

Nossos dados demonstraram que, ao contrário do que ocorre com a hiperlgesia inflamatória induzida pela Cg, a suplementação de ratos com 3g/Kg de OP não afeta aquela induzida pela PGE2, exceto por uma discreta redução observada 6 horas após a sua administração. Está bem estabelecido que o consumo de óleo de peixe leva ao aumento da incorporação de DHA na membrana celular (BOUSQUET, et al. 2011) e que esse compete com o AA pela ação da COX dando origem a eicosanóides antiinflamatórios (PGE3 e LTB5) em comparação com aqueles produzidos pelo AA (PGE2 e LTB4), (MAROON & BOST, 2006). Portanto, esses dados da literatura, em conjunto com nossos dados que demonstram que o OP não afeta a hiperlgesia induzida pela PGE2, sugerem fortemente que o efeito anti hiperlagésico do OP é mediado pela redução da formação enzimática de PGE2. Além disso, tem sido demonstrado que os AGPIs n-3 diminuem a expressão do gene da enzima COX 2 (CHAPKIN, et al. 2009), o que poderia contribuir de forma importante para seu efeitos antiinflamatório. A expressão gênica de COX 2 pode ser induzida pela ligação de receptores ativados pela proliferação de peroxissomos (PPAR), que regulam a expressão de genes alvos, mediado via elementos responsivos específicos da proliferação do peroxissomo (PPRE), na região promotora de COX 2 (CHÊNE, et al. 2007). A análise da região promotora de COX 2 revela a existência de diversos elementos regulatórios em potencial, que podem afetar a transcrição do gene, alterando sua expressão (SIVARAMAKRISHNAN & DEVARAJ, 2009). Estudos demonstram que AGPIs e certos produtos de sua oxidação são capazes de se ligar e ativar todas as isoformas (α , β e γ) de PPARs (HARUNA, et al. 2008). Ao contrário do gene que codifica a COX 2 que é altamente induzível e

normalmente está ausente nas células, sendo expresso em muitos tecidos ou células em resposta a lesões, aquele que codifica a COX 1 é expresso constitutivamente em uma grande variedade de tecidos, sendo responsável pela formação de prostaglandinas associadas com eventos fisiológicos como a integridade da mucosa gástrica e fluxo sanguíneo renal, necessita ainda de estudos adicionais para esclarecer de que forma os AGPIs n-3 o influencia, contudo já se sabe que a dieta rica, ao contrário da pobre, em AGPIs n-3, eleva a expressão de COX 1 e reduz a de COX 2 (KIM, et al. 2011; CHANDRASEKHARAN & SIMMONS, 2004).

Nossos dados demonstram também, que ao contrário do ocorrido com a hiperalgesia induzida pela administração de carragenina ou prostaglandina, a suplementação com 3g/Kg de OP aumentou aquela induzida pela administração de norepinefrina nos 3 tempos estudados, ou seja, 1, 3 e 6 horas após a injeção. A norepinefrina produz hiperalgesia diretamente através de sua ação em receptores β 2-adrenérgicos, que são acoplado a proteína G, localizados no neurônio aferente primário (KHASAR, et al. 1999). Este efeito é mediado por PK-C e resulta na modulação de canais iônicos que controlam a excitabilidade desses neurônios (KHASAR, et al. 1999). Esses eventos iniciais promovidos pela NE alteram a MEC, onde estão fixadas as integrinas cujas interações adesivas célula-célula e célula-MEC constituem funções essenciais no controle da morfogênese e reparo tecidual, migração celular controlada e formação de barreiras epiteliais (HYNES, 2002; KHASAR, et al. 1999). O AGPI n-3, interessante, ativa diretamente PK-C que aumenta indiretamente a atividade funcional da subunidade β 1 da integrina (PALMANTIER, et al. 2001). Essa alteração na função dessa subunidade, representa um mecanismo potencial para a adesão e/ou organização citoesquelética perturbada das células. Este mecanismo poderia talvez explicar o aumento da hiperalgesia induzida pela administração de norepinefrina em

animais suplementados com OP. No entanto, antes desses dados serem enviados para publicação, novos experimentos serão conduzidos com objetivo de confirmar se realmente a suplementação alimentar com OP aumenta a hiperlagesia induzida pela NE.

A dor é um importante fator debilitante, especialmente durante o envelhecimento ou em condições de patologias (VEIGAS, et al. 2011). A dor crônica afeta negativamente a qualidade de vida e é uma das principais causas de depressão (VEIGAS, et al. 2011). No entanto, é possível controlar a dor fisiológica, optando por uma estratégia nutricional adequada (VEIGAS, et al. 2011). Dieta com ácidos graxos poliinsaturados tem um papel determinante no processo inflamatório, enquanto AGPIs n-6 são conhecidos por serem precursores de agentes inflamatórios, os AGPIs n-3 são conhecidos por possuir propriedades antiinflamatórias (VEIGAS, et al. 2011).

Assim, o ácido graxo poliinsaturado n-3 emerge como um importante ponto de controle para atenuar o processo inflamatório, podendo ser útil no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento e controle da dor inflamatória. Este trabalho nos estimula a querer obter novas informações que elucidem e desafiem a nossa visão da fisiologia da dor inflamatória.

Conclusões

1- A suplementação alimentar com óleo de peixe reduziu em cerca de 50% a hiperalgesia inflamatória induzida pela administração intraplantar de carragenina. Uma vez que a injeção de carragenina na pata traseira de ratos é um modelo de dor inflamatória que melhor representa a experiência clínica de dor vivenciada pelos humanos, ela é a droga classicamente usada para o controle e tratamento da dor. Esse dado sugere que uma dieta rica em AGPIs n-3 apresenta um potencial terapêutico enorme no controle da dor inflamatória.

2- A suplementação alimentar com óleo de peixe não afetou a hiperalgesia induzida pela prostaglandina E2 e aumentou aquela induzida pela administração de norepinefrina. Uma vez que a prostaglandina E2 e a norepinefrina são os mediadores finais, responsáveis em última instância, pela sensibilização do nociceptor primário em resposta a carragenina, esses dados sugerem que o efeito anti-hiperalgésico dos AGPIs n-3 é mediado pela diminuição da síntese enzimática de prostaglandina E2.

Referências

- AIRES, MM. Fisiologia da Glândula Adrenal. In: **Fisiologia**. 3ª ed. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 1015–29, 2008.
- BRUNBORG, LA; MADLAND, TM; LIND, RA; 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.
- BOUSQUET, M; CALON, F; CICCETTI, F. Impact of omega-3 fatty acids in Parkinson's disease. **Ageing Research Reviews**. v.10, p. 453–63, 2011.
- BURIAN, M; GEISLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 107 (2), p. 139–54, 2005.
- CALDER, PC. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v. 77, p. 327–35, 2007.
- CHANDRASEKHARAN, NV; SIMMONS, DL. The cyclooxygenases. **Genome Biology**, v.5(9), p.230–41, 2004.
- CHAPKIN, RS; KIM, W; LUPTON, JR; McMURRAY, DN. Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: Emerging mediators of inflammation. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 81 (1), p. 1–96, 2009.
- CHÊNE,G; DUBOURDEAU, M; BALARD, P; et al. n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids induce the expression of COX-2 via PPAR γ activation in human keratinocyte HaCaT cells. **Molecular and Cell Biology of Lipids**, v.1771 (5), p. 576–89, 2007.
- CLARKE, J; HERZBERGE, G; PEELING, J, et al. Dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids worsens forelimb motor function after intracerebral hemorrhage in rats. **Experimental Neurology**. v. 191, p. 119–27, 2005.
- CORDELLINI, MF; PIAZZETTA, G; PINTO KC; et al. Effect of different doses of estrogen on the nigrostriatal dopaminergic system in two 6-hydroxydopamine-induced lesion models of Parkinson's disease. **Neurochem. Res**. v. 6(6), p. 955–61, 2011.
- COUTAUX, A; ADAM, F; WILLER, JC; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**. v. 72(5), p. 359–71, 2005.
- CUNHA, TM; TALBOT, J; PINTO, LG; et al. Caspase-1 is involved in the genesis of inflammatory hypernociception by contributing to peripheral IL-1 β maturation.

Molecular Pain. v. 6(63), p. 1–10, 2010.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br J Anaesth.** v. 75 (2), p. 125–31, 1995.

ESPERSON, GT; GRUNNET, N; LERVANG, HH; 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.

FERRAZ, AC; KISS, A; ARAÚJO, RLF; et al. The antidepressant role of dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids in two phases in the developing brain. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.** v. 78, p. 183–8, 2008.

FERREIRA, SH; LORENZETTI, BB; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology.** v. 110(3), p.1227–31, 1993.

FERREIRA, SH; CUNHA, TM. <http://www.dol.inf.br>. **DOL–Dor Online.** n° 139, Edição de fevereiro de 2012.

GARRETT, RH; GRISHAM, CM. **Biochemistry.** 2.ed. USA: Saunders College Publishing. 1999.

GAGLIARDI, ACM; FILHO, JM; SANTOS, RD. Perfil Nutricional de Alimentos com Alegação de Zero Gordura Trans. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 55(1), p. 50–3, 2009.

HARUNA, H; SHIMIZU, T; OHTSUKA, Y; et al. Expression of COX-1, COX-2, and PPAR in the gastric mucosa of children with Helicobacter pylori infection. **Pediatrics International,** v. 50, p.1–6, 2008.

HYNES, RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell.** v. 110, p. 673–87, 2002.

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

HULBERT, AJ; TURNER, N; STORLIEN, LH; ELSE, PL. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. **Biology Reviews.** v.80, p. 155–69, 2005.

ITAPHUAK, S; KHONSUNG, P; PANTHONG, A. Anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of virgin coconut oil. **Pharm. Biol.** v. 48(2), p. 151–7, 2010.

KHASAR, SG; McCARTER, G; LEVINE, JD. Epinephrine produces a β -adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. **Neurophysiol.** v.81, p. 1104–12, 1999.

KIM, H-W; RAO, JS; RAPOPORT, SI; IGARASHI, M. Regulation of rat brain polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolism during graded dietary n-3 PUFA deprivation. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v. 85, p.361–8, 2011.

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

LEHNINGER, AL.; NELSON, DL.; COX, MM. Lipídeos. In: **Princípios de Bioquímica**. Sarvier: São Paulo, p.179–99, 1998.

Mac LEOD, DC; HEAGERTY, AM; BUND, SJ; et al. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on contraction and relaxation of rat femoral resistance arteries. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** v. 23(1), p. 92-8, 1994.

MAROON, JC; BOST, JW. 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.

McNAMARA, RK.; CARLSON, SE. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 75, p. 329–49, 2006.

MORRIS, CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods Mol Biol.** v. 225, p. 115–21, 2003.

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.

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

OZIAS, MK; CARLSON, SE; LEVANT, B. Maternal parity and diet (n-3) polyunsaturated fatty acid concentration influence accretion of brain phospholipid docosahexaenoic acid in developing rats. **J. Nutr.** v. 137, p. 125–29, 2007.

PALMANTIER, R; GEORGE, M.D; AKIYAMA, SK; et al. *Cis*-polyunsaturated fatty acids stimulate β 1 integrin-mediated adhesion of human breast carcinoma cells to type IV collagen by activating protein kinases C- ϵ and - μ . **Cancer Research**. v. 61, p. 2445–52, 2001.

PINTO Jr, JA; FOLADOR, A; BONATO, SJ; 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.

RAO, VN; REDDY, ES. Elk-1 proteins interact with MAP kinases. **Oncogene**. v. 9 (7), p. 1855–60, 1994.

RANG, HP; BEVAN, S; DRAY, A. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties. In: Wall PD, Melzack R. **Textbook of Pain**. 3^a ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, p. 57–78, 1994.

SALEM Jr, 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.

SIVARAMAKRISHNAN, V; DEVARAJ, SN. Morin regulates the expression of NF-kBp65, COX-2 and matrix metalloproteinases in diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. **Chemico-Biological Interactions** v.180, p. 353–9, 2009.

TAKEUCHI, H; MATSUO, T; TOKUYAMA, K; et al. Diet-induced thermogenesis is lower in rats fed a lard diet than in those fed a high oleic acid safflower oil diet, a safflower oil diet or a linseed oil diet. **J. Nutr.** v. 125, p. 920–5, 1995.

VEIGAS, JM; WILLIAMS, PJ; HALADE, G; et. al. Fish oil concentrate delays sensitivity to thermal nociception in mice. **Pharmacological Research**. v. 63, p. 377–82, 2011.

VINES, A; DELLATRE, AM; LIMA, MM; et al. The role of 5-HT_{1A} 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.

WANNMACHER, CMD; DIAS, RD. **Bioquímica fundamental**. 6 ed. Porto Alegre: URGs, 1988.

YOSHIMURA, T; ITO, M; MATSUI, K; FUJISAKI, S. Effects of highly purified eicosapentaenoic acid on vascular reactivity to angiotensin II and norepinephrine in the rabbit. **Prostaglandins**. v. 32(2), p. 179-88, 1986.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**. v. 16(2), p. 109–10, 1983.