

Efeito anti-inflamatório da suplementação dietética com ácidos graxos ômega-3, em ratos*

Anti-inflammatory effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids in rats

Tamirys Ribeiro Mesquita¹, Adriana Aparecida de Souza², Elton Constantino³, Naira Correa Cusma Pelógia⁴, Irimar de Paula Posso⁵, Oscar César Pires⁶

* Recebido do Instituto Básico de Biociências da Universidade de Taubaté. Taubaté, SP.

RESUMO

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: Diversos estudos têm demonstrado os efeitos benéficos dos ácidos graxos ômega-3 à saúde: no metabolismo lipídico, promovendo redução nos níveis plasmáticos dos triacilgliceróis, aumento de HDL colesterol e, ação anti-inflamatória ao reduzir a síntese de derivados do ácido araquidônico: prostaglandina E2 (PGE2), tromboxano A2 (TXA2), prostaciclina (PGI2) e leucotrieno B4. Portanto, há de se supor que a suplementação com ácidos graxos EPA e DHA (ω -3), pode atenuar os efeitos do processo inflamatório a partir da diminuição da síntese dos eicosanoides, assim como a utilização indiscriminada dos anti-inflamatórios. O presente estudo teve como objetivo comparar o efeito analgésico e anti-inflamatório, entre a suplementação dietética com ácido graxo ômega-3 (ω -3) e tenoxicam em ratos.

MÉTODO: Participaram do estudo 18 ratos Wistar machos, pesando entre 220 e 300 g, distribuídos em três

grupos (n = 6): Grupo controle (GC), Grupo tenoxicam (GT) e o Grupo ômega-3 (GO) para receberem respectivamente 0,2 mL de solução fisiológica, 1 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ de tenoxicam e 200 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ de ácido graxo ômega-3 diariamente, por gavagem. Após duas semanas de tratamento, foi realizado o teste da formalina e observação da resposta nociceptiva, já que à segunda fase do teste se atribui liberação de mediadores endógenos locais, que geram resposta inflamatória local, responsável pela sensibilização de aferentes primários e de neurônios medulares subsequente a ativação de nociceptores. A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada utilizando o programa JMP do SAS, adotando o nível de significância de 5%.

RESULTADOS: Os grupos tenoxicam e ômega-3 não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados entre si nas fases do teste da formalina modificado. Não obstante, apresentaram menor resposta algica, com significância estatística, na segunda fase do teste da formalina quando comparados com o GC.

CONCLUSÃO: Os resultados demonstraram efeito anti-inflamatório comparável entre o emprego de tenoxicam e a suplementação dietética com ácido graxo ômega-3, sugerindo que o uso da suplementação dietética com ácido graxo ômega-3 poderá ser de grande valia, principalmente nos processos crônicos, onde o emprego de anti-inflamatórios não esteroides se relaciona a maior morbidade principalmente no sistema digestivo e renal.

Descritores: Dor, Inflamação, Ômega-3, Ratos.

1. Nutricionista Graduada pela Universidade de Taubaté. Taubaté, SP, Brasil.
2. Graduanda em Biologia da Universidade de Taubaté. Taubaté, SP, Brasil.
3. Médico Anestesiologista, Professor Assistente de Anestesiologia da Universidade de Taubaté. Taubaté, SP, Brasil.
4. Farmacêutica, Professora Doutora de Fisiologia da Universidade de Taubaté. Taubaté, SP, Brasil.
5. Médico Anestesiologista, Professor Associado da Disciplina de Anestesiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; Professor Titular de Farmacologia da Universidade de Taubaté. Taubaté, SP, Brasil.
6. Médico Anestesiologista, Professor Doutor de Farmacologia da Universidade de Taubaté. Taubaté, SP, Brasil.

Endereço para correspondência:

Dr. Oscar César Pires

Avenida Itália, n° 1551 – R4 – Rua 13, n° 821

Jardim das Nações

12030-212 Taubaté, SP.

E-mail: ocpires@uol.com.br

SUMMARY

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Several studies have shown the beneficial effects of Omega-3 fatty acids on health: on the lipid metabolism promoting plasma triglycerol levels decrease, increase in HDL cholesterol and anti-inflammatory action by decreasing

arachidonic acid derivatives synthesis: prostaglandin E2 (PGE3), tromboxane A2 (TXA2), prostacyclin (PGI2) and leukotriene B4. So, it is supposed that supplementation with EPA and DHA (ω -3) fatty acids may attenuate inflammatory process effects by decreasing eicosanoids synthesis as well as the indiscriminate use of anti-inflammatory drugs. This study aimed at comparing the analgesic / anti-inflammatory effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acid (ω -3) and tenoxicam in rats.

METHOD: Participated in this study 18 male Wistar rats, weighing between 220 and 300 g, distributed in 3 groups (n = 6): Control group (CG), tenoxicam group (TG) and Omega group (OG), to receive, respectively 0.2 mL saline, 1 mg.kg¹.day⁻¹ tenoxicam and 200 mg.kg¹.day⁻¹ omega-3 fatty acid per day by gavage. Formalin test was performed after two weeks of treatment and nociceptive response was observed, since release of local endogenous mediators is attributed to the second phase, which generates local inflammatory response, responsible for the sensitization of primary afferents and of medullar neurons subsequent to the activation of nociceptors. Statistical analysis of results was performed with the SAS JMP program, adopting significance level of 5%.

RESULTS: Tenoxicam and omega-3 groups were not statistically different when compared in the modified formalin test phase. However, they showed less painful response, with statistical significance, in the second formalin test phase as compared to CG.

CONCLUSION: Results have shown comparable anti-inflammatory effect between tenoxicam and dietary supplementation with omega-3 fatty acid, suggesting that dietary supplementation with omega-3 fatty acid may be very useful, especially for chronic processes where the use of non-steroid anti-inflammatory drugs is associated to higher morbidity especially of the digestive and renal systems.

Keywords: Inflammation, Omega-3, Pain, Rats.

INTRODUÇÃO

A utilização de anti-inflamatórios de maneira indiscriminada pela população é uma realidade, principalmente em países de baixa renda onde a população não tem acesso facilitado aos serviços de saúde¹. Muitos destes fármacos apresentam efeitos adversos como gastropatias e nefropatias, além de apresentarem ação imunossupressora e, portanto, a sua utilização por tempo prolongado e/ou em doses elevadas, pode provocar diminuição das respostas imunológicas e suas consequências à saúde².

Os ácidos graxos poli-insaturados são classificados, de acordo com a localização da primeira dupla ligação, a partir do grupo metil terminal da molécula, em ômega-3 (ω -3), ômega-6 (ω -6), ômega-7 (ω -7) e ômega-9 (ω -9). Os ácidos graxos poli-insaturados; ácido linoleico (ω -6) e ácido α -linolênico (ω -3), quando metabolizados formam outros poli-insaturados como ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico (EPA), e ácido docosahexaenóico (DHA; ω -3) respectivamente. Os mamíferos são capazes de sintetizar os ácidos graxos saturados das séries ω -7 e ω -9, mas não podem sintetizar os AGPI linoleico (ω -6) e α -linolênico (ω -3), com isso são considerados ácidos graxos essenciais, devendo assim ser provenientes da dieta³. As principais fontes alimentares do ácido linoleico são: os óleos de soja, girassol e milho, e do ácido α -linolênico são: os óleos de linhaça, canola e peixes^{3,4}.

Diversos estudos têm demonstrado os efeitos benéficos do ω -3 à saúde: no metabolismo lipídico, causando redução nos níveis plasmáticos dos triglicerídeos, colesterol total e LDL, ação vasodilatadora e possível ação na prevenção e/ou tratamento do câncer (mama, próstata e cólon), depressão e mal de Alzheimer, além de redução da incidência de aterosclerose, atividade anti-inflamatória, anticoagulante e antiagregante. Os ácidos graxos ômega-3 são também indispensáveis para os recém-nascidos, por representarem um terço da estrutura de lipídeos no cérebro, onde a carências destas substâncias podem ocasionar redução da produção de enzimas relacionadas às funções do aprendizado^{5,6}. Além disso, estudos desenvolvidos tanto em humanos quanto em animais têm revelado uma associação negativa entre a ingestão de AGMI e AGPI e a incidência de doenças cardiovasculares^{7,8}. Por outro lado, estudos revelam que o consumo excessivo de óleos ricos em ácido linoleico (ω -6) ou ácidos graxos saturados não é recomendável, por apresentarem efeitos pró-inflamatórios, pró-trombóticos e pró-aterogênicos^{9,10}. Não obstante, os ácidos graxos ω -3 possuem também ação anti-inflamatória, ao reduzir a síntese de derivados do ácido araquidônico: prostaglandina E2 (PGE2), tromboxano A2 (TXA2), prostaciclina (PGI2) e leucotrieno B4 (LTB4)¹¹.

Portanto, há de se supor que a suplementação com ácidos graxos EPA e DHA (ω -3), pode atenuar os efeitos do processo inflamatório, a partir da diminuição da síntese dos eicosanoides, assim como a utilização indiscriminada dos anti-inflamatórios.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi identificar e comparar o efeito analgésico-anti-inflamatório da suplementação dietética com ácidos graxos ômega-3

(EPA/DHA) e tenoxicam em ratos Wistar machos, adultos jovens utilizando o teste da formalina modificado.

MÉTODO

Após aprovação pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Instituição (Processo nº 014/2009), realizou-se este estudo com 18 ratos Wistar machos, pesando entre 220 e 300 g, mantidos em número de três animais por compartimento, onde permaneceram, por pelo menos 20 dias antes do início do experimento, para adequada adaptação, tratados com ração balanceada comercial e água "ad libitum", ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura ambiente variando de $22 \pm 3^\circ \text{C}$ (19 a 25°C).

Os animais foram distribuídos em três grupos ($n = 6$), sendo o primeiro o grupo controle (GC), o segundo grupo tenoxicam (GT) e o terceiro grupo ômega-3 (GO). Os animais do GC receberam 0,2 mL de solução fisiológica diariamente, por gavagem. Os animais do GT receberam $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ de tenoxicam, diluído em solução fisiológica administrado por gavagem com seringa de insulina em volume equivalente a 0,2 mL. Os animais do GO receberam suplementação de $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) ω -3 (EPA: 180,0 mg/g e DHA: 120,0 mg/g), administrado por gavagem com seringa de insulina em volume equivalente a 0,2 mL. Os tratamentos foram realizados uma única vez ao dia, durante 20 dias^{12,13}. Antes da realização do teste da formalina, os animais foram individualmente colocados, por 15 minutos, em uma câmara de vidro de 25 x 25 x 25 cm, para ambientalização ao local de estudo. Atrás da câmara foi colocado um espelho, para facilitar a visualização das elevações de patas, em todas as direções¹⁴. A indução da dor foi realizada com administração de 50 μL de solução de formalina a 2%, na região dorsal da pata posterior direita¹⁵. Para análise da resposta algica à injeção de formalina foram consideradas todas as elevações da pata, não relacionadas à marcha. A contagem foi realizada continuamente durante 60 minutos, anotando o número parcial de elevações a cada 5 minutos. A resposta nociceptiva à formalina ocorre de maneira bifásica: há um curto período inicial (fase I, com duração de 5 a 10 minutos); posteriormente, após um curto período de remissão de comportamentos, inicia-se a fase II, que consiste em um período mais longo (20 a 60 minutos) de atividade sustentada. Em geral, a resposta inicial é atribuída à ativação direta de nociceptores, enquanto a fase II está associada à liberação de mediadores endógenos locais, que geram resposta inflamatória local, responsável pela sensibilização de aferentes primários e

de neurônios medulares, subsequente à ativação de nociceptores^{14,16}.

Para análise estatística dos resultados utilizou-se o software SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 17.0, adotando nível de significância estatística menor que 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Para comparação das variáveis peso e número de elevações da pata durante as fases I, intermediária e II entre os três grupos, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis e ao encontrar diferenças ($p = 0,025$), foi aplicado o teste de Mann-Whitney, para identificar quais grupos se diferenciaram entre si. Não houve diferença entre os grupos quando se comparou o peso inicial, fase I e fase intermediária do teste da formalina ($p > 0,05$). Porém houve diferença significativa entre os grupos quando se comparou o peso dos animais ao final do estudo (Tabela 1 e Gráfico 1) e a fase II do teste da formalina ($p < 0,05$).

Tabela 1 – Média dos pesos ao início e ao término do experimento

Grupos	Peso inicial	DP	Peso final	DP
GC	384,0	41,54	423,01	32,16
GT	389,8	11,97	461,83*	26,09
GO	411,0	22,10	435,16	13,64
Valor de p	0,2463		0,0484	

GC = grupo controle; GT = grupo tenoxicam; GO = grupo ômega-3

* Diferença estatisticamente significativa.

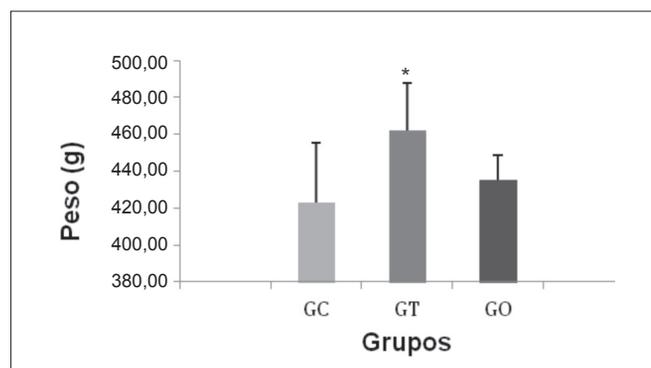


Gráfico 1 – Médias e desvio-padrão do peso dos animais, nos grupos, ao final de tratamento.

GC = grupo controle; GT = grupo tenoxicam; GO = grupo ômega-3

* Diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0004$).

Para verificar possíveis diferenças entre as três fases de observação, quando comparadas concomitantemente, foi aplicado o teste de Friedman. Como se encontrou diferenças estatisticamente significantes entre as três fases de observação ($p < 0,05$), foi aplicado o teste dos Postos

Sinalizados de Wilcoxon, obtendo como resultado que nos três grupos estudados, a fase intermediária se diferenciou das outras duas ($p < 0,05$), que se apresentaram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$).

Para a fase II, como foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, aplicou-se o teste de Mann-Whitney, para identificar quais grupos diferenciam-se entre si, quando comparados par a par, encontrando diferença significativa entre o GC ($p < 0,05$) quando comparado com o GO e o GT, sendo que estes não se mostraram diferentes (Gráfico 2).

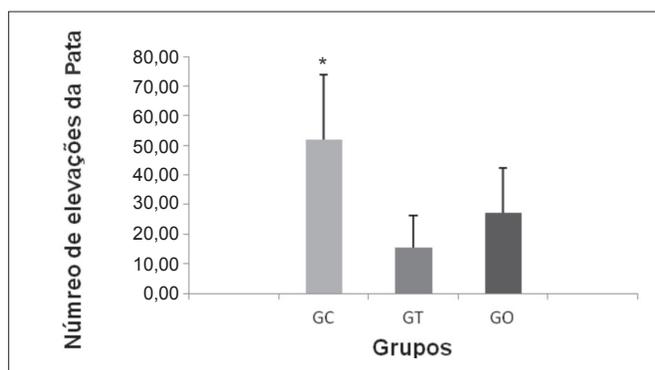


Gráfico 2 – Médias e desvio-padrão do número de elevações da pata, nos grupos, durante a fase II do teste da formalina.

GC = grupo controle; GT = grupo tenoxicam; GO = grupo ômega-3

* Diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0484$).

DISCUSSÃO

Ao analisar as médias dos pesos obtidos, pode-se observar que o GT apresentou maior aumento de peso com um ganho médio final de 72,03 g, uma diferença estatisticamente significativa quando comparado com os outros grupos, seguido pelo GC que obteve ganho de 39,01 g. Já o GO apresentou menor ganho de peso com uma média de 24,16 g.

Uma possível explicação para esta diferença é que o tenoxicam, um anti-inflamatório não esteroide (AINE), pode acarretar retenção de sódio e água, resultando em ganho de peso. Sabe-se que alguns dos efeitos colaterais do uso de AINES são nefropatias e alterações cardiovasculares, documentados em grandes estudos clínicos prospectivos e observacionais, os quais apontaram riscos cardiovasculares com elevação da pressão arterial e insuficiência cardíaca, devido a inibição na formação de PGs alterando as trocas de sódio e água ao nível tubular renal¹⁷.

A suplementação com ácidos graxos ômega-3 (Tabela 1) não provocou variações significativas de ganho de peso nos animais deste grupo, em concordância com os achados em outros autores^{12,18}.

Analisando a fase intermediária do teste da formalina observou-se diferença considerada estatisticamente significativa em comparação com as outras duas fases que foram estatisticamente semelhantes em todos os grupos, conforme esperado. Essa caracterização de comportamentos presentes nas fases fazendo com que se diferenciem entre si também são descritas por outros autores^{14,19,20}.

Não obstante, nota-se que o GO mostrou eficácia comparável ao GT em produzir analgesia durante a fase II, caracterizada pela sensibilização central e/ou inflamação aguda, pois apresentou menor média quanto ao número de elevações da pata, diferença esta, estatisticamente significativa em comparação ao GC.

Em concordância com outros estudos, ficou demonstrado que o teste de formalina é um método eficaz, válido e fidedigno quanto à observação bifásica no processo da dor, evidenciando ativação de nociceptores na fase I, modulação central na fase intermediária e resposta inflamatória na fase II¹⁹⁻²¹.

CONCLUSÃO

Ao se observar a eficácia anti-inflamatória do ácido graxo ômega-3, comparável com o GT é superior ao GC, com significância estatística, sugerindo que a suplementação com ácido graxo ômega-3 pode ser de valiosa utilidade principalmente na abordagem de doenças que exijam tratamento crônico com anti-inflamatórios.

REFERÊNCIAS

1. Piotto FRSB, Nogueira RM, Pires OC, et al. Prevalência da dor e do uso de analgésicos e anti-inflamatórios na automedicação de pacientes atendidos no Pronto-Socorro Municipal de Taubaté. *Rev Dor* 2009;10(4):313-7.
2. Lapointe BM, Frenette J, Côte CH. Lengthening contraction-induced inflammation is linked to secondary damage but devoid of neutrophil invasion. *J Appl Physiol* 2002;92(5):1995-2004.
3. Calder PC. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. *Braz J Med Biol Res* 2003;36(4):433-46.
4. James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* 2007;71(1 Suppl):343S-8S.
5. Nestel PJ. Fish oil and cardiovascular disease: lipids and arterial function. *Am J Clin Nutr* 2000;71(1 Suppl):228S-31S.
6. Moraes FP, Colla LM. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Rev*

Eletr Farm 2006;3(2):109-22.

7. Lima FEL, Menezes TN, Tavares MP, et al. Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. *Rev Nutr* 2000;13(2):73-80.

8. Martin CA, Almeida VV, Ruiz MR, et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev Nutr* 2006;19(6):761-70.

9. Covington MB. Omega-3 fatty acids. *Am Fam Physician* 2004;70(1):133-40.

10. Murakami KTT, Pinto M, Lima VMF. Ácidos graxos ômega-3 e imunologia de frangos de corte. *Rev Vet Zoo* 2008;15(2):112.

11. Kremer JM. ω -3 fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. *Am J Clin Nutr* 2007;71(1 Suppl):349S-51S.

12. Haidamus LLA. A suplementação com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 reduziu a concentração plasmática de eicosanóides pró-inflamatórios, da enzima lactato desidrogenase e de lesões musculares em ratos submetidos a sessões de natação. Campinas. Tese (Mestrado em Ciências da Alimentação). Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas; 2007.

13. Watanabe ALC, Watanabe LM. Efeitos do tenoxicam sobre a cicatrização da parede abdominal: estudo experimental em ratos. *Acta Cir Bras* 2005;20(2):140-3.

14. Souza AM, Franco PAB, Ashmawi HA, et al. Efeito analgésico local do tramadol em modelo de dor provocada por formalina em ratos. *Rev Bras Anesthesiol* 2008;58(4):371-9.

15. Pires OC, Ashmawi HA, Constantino E, et al. Antagonistas serotoninérgico e noradrenérgico por via subaracnoidea aumentam a resposta álgica em ratos. *Rev Bras Anesthesiol* 2011;61(2):202-10.

16. Ting E. Participação da histamina e do receptor histamínico H1 na nocicepção em ATM de ratos. Piracicaba. Tese (Mestrado em Odontologia). Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2003.

17. Cheng HF, Harris RC. Cyclooxygenases, the kidney, and hypertension. *Hypertension* 2004;43(3):525-30.

18. Song JH, Miyazawa T. Enhanced level of n-3 fatty acid in membrane phospholipids induces lipid peroxidation in rats fed dietary docosahexaenoic acid oil. *Atherosclerosis* 2001;155(1):9-18.

19. Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N. The role of cyclooxygenase-1 and -2 in the rat formalin test. *Anesth Analg* 2002;94(4):962-7.

20. Xie YF, Wang J, Huo FQ, et al. Validation of a simple automated movement detection system for formalin test in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26(1):39-45.

21. Pitcher GM, Henry JL. Second phase of formalin-induced excitation of spinal dorsal horn neurons in spinalized rats is reversed by sciatic nerve block. *Eur J Neurosci* 2002;15(9):1509-15.

Apresentado em 12 de agosto de 2011.

Aceito para publicação em 24 de novembro de 2011.