

MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO POR ÔMEGA-3/6

Déborah Kristina Braga¹

Flávia Márcia Oliveira²

Aline Castro Silva³

Gleciene da Silva³

Ricardo Ferreira Muradas³

Leandro José Gusmão⁴

Trycia Martins⁵

¹ Graduanda em
Nutrição Unileste/
MG e Bolsista
do Programa de
Iniciação Científica
do Unileste/MG e
FGPA

² Doutora em
Bioquímica e
Imunologia e
Professora do
Unileste/MG
(Orientadora)

³ Estagiários de
Aperfeiçoamento
em Ciências
Biológicas do
Unileste/MG

⁴ Graduando
em Enfermagem
Unileste/MG
e Bolsista do
Programa de
iniciação científica
do Unileste/MG e
FGPA

⁵ Mestre em
Patologia e
Professora do
Unileste/MG
(Colaboradora)

Recebido em: 13/02/2006

Aceito em: 27/01/2007

BRAGA, Déborah Kristina, et al. Modulação de inflamação por ômega-3/6. *Salusvita*, Bauru, v. 27, n. 3, p. 275-282 2007.

RESUMO

Vários estudos vêm demonstrando os efeitos benéficos dos ácidos graxos poliinsaturados, especialmente do tipo ômega-3, no processo inflamatório. Esses lipídios, por meio de interferências na regulação gênica e no metabolismo celular, desempenham um papel modulador das reações inflamatórias agudas ou crônicas. Neste trabalho, utilizou-se o modelo inflamatório induzido por implantes subcutâneos de parafina a fim de avaliar os efeitos da administração dos ácidos graxos poliinsaturados por via oral e subcutânea. Foram utilizados camundongos *Swiss*, fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade. Posteriormente, os animais receberam um implante subcutâneo de tabletes de parafina a fim de induzir um processo inflamatório crônico. Vinte e um dias após a indução da inflamação, os animais receberam 100µl/camundongo de óleo de peixe contendo 180mg de ácido eicosapentaenóico e 120mg de ácido docosahexaenóico via oral. Pela via subcutânea, foram inoculados 20µl/camundongo de óleo de peixe contendo 3,6mg de ácido eicosapentaenóico e 2,4mg de ácido docosahexaenóico. Os camundongos receberam 8 (1 vez/semana) ou 24 (3 vezes/semana) inoculações, dependendo do experimento. O grupo controle (n = 5) recebeu tratamento com salina. O desenvolvimento da cápsula conjuntiva nos animais tratados com ômega-3 via oral foi igual ao dos animais não tratados

($p = 0,07$). Por outro lado, a administração subcutânea de ômega-3 modificou aspectos macroscópicos como aumento da vascularização e promoveu um aumento da área do granuloma ($p = 0,01$). Entretanto, a existência de alterações das populações celulares devido ao tratamento com ômega-3 está sendo avaliada mediante análises histológicas.

Palavras-chave: inflamação, ácidos graxos não saturados, granuloma, parafina.

ABSTRACT

Several studies show that omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress the immune response and inflammation. Some of the effects of omega-3 are brought about by modulation of the amount and types of eicosanoids made, and other effects are elicited by eicosanoid-independent mechanisms, including actions upon intracellular signaling pathways, transcription factor activity and gene expression. The aim of this study was to evaluate the effect of oral or subcutaneous omega-3 administration in chronic pathological conditions advancing. To determine whether chronic inflammation induced by paraffin implants is altered by w-3 supplementation, six to eight-week-old male Swiss ($n = 5$) paraffin implanted were randomly assigned to one of the three groups: (1) no supplemented control group (saline); (2) oral oil fish supplemented group 21 days after paraffin implant (18 mg of eicosapentaenoic acid and 12mg of docosahexaenoic acid in 100 ml/mice); (3) subcutaneous oil fish supplemented group (3.6mg of eicosapentaenoic acid and 2.4mg of docosahexaenoic acid in 20ml/mice) 21 days after paraffin implant. Mice were assigned to supplement for 1 or 3 days per week for total of 8 weeks. At the end of the trial, the size of granuloma and the inflammatory infiltrate were examined. Macroscopic aspect and size granuloma in oral supplemented group did not differ from that of not supplement ($p = 0.07$). On the other hand, subcutaneous oil fish administration enhanced the size of granuloma ($p = 0.01$) and induced vascularization. The profile of inflammatory infiltrate is currently in study.

Key words: inflammation, fatty acids, unsaturated, granuloma, paraffin.

BRAGA, Déborah Kristina, et al. Modulação de inflamação por ômega-3/6. *Salusvita*, Bauru, v. 27, n. 3, p. 275-282, 2007.

BRAGA, Déborah
Kristina, et al.
Modulação
de inflamação
por ômega-3/6.
Salusvita, Bauru,
v. 27, n. 3,
p. 275-282, 2007.

INTRODUÇÃO

O processo inflamatório é, freqüentemente, uma resposta protetora cuja finalidade consiste na eliminação de corpos estranhos – microrganismos, toxinas, partículas e alérgenos – por meio da migração e da ação de células leucocitárias. De modo geral, o tecido danificado inicia uma série de eventos bioquímicos, imunológicos e celulares que ocorrem em etapas aparentemente bem reguladas e podem culminar com a recuperação do tecido e da função. Entretanto, a ativação intensa dessa resposta leva à morte celular massiva causando danos teciduais que podem comprometer o funcionamento dos sistemas (GIL, 2002). A progressão da reação inflamatória resulta em um processo crônico que caracteriza diversas patologias como aterosclerose, hepatite, doença inflamatória intestinal (IBD), cirrose hepática, psoríase e artrite reumatóide.

Vários estudos vêm demonstrando os efeitos benéficos dos ácidos graxos (AGs) poliinsaturados, especialmente do tipo n-3 (ômega-3), no processo inflamatório (CALDER; GRIMBLE, 2002; SIMOPOULOUS, 2002; WEISS et al., 2002; MORI; BEILIN, 2004). Os ácidos graxos poliinsaturados como os ácidos eicosapentanóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) são encontrados nos óleos de peixes e possuem um potencial para alterar a produção de citocinas pró e antiinflamatórias. Dessa maneira, mediante interferências na regulação gênica e no metabolismo, esses lipídios podem desempenhar um papel modulador das reações inflamatórias sejam elas agudas ou crônicas.

A fim de avaliar os efeitos da administração dos AGs poliinsaturados em camundongos por vias distintas – oral e subcutânea –, utilizou-se o modelo experimental de implantes subcutâneos de parafina. A parafina é uma partícula imunologicamente inerte capaz de induzir uma inflamação crônica, por vezes granulomatosa, sustentando um influxo de células mononucleares para o local da inflamação.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss*, fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade, sem variação de peso significativa. Todos os animais receberam água e dieta *ad libitum*. Os procedimentos utilizados para experimentação animal foram realizados de acordo com as normas definidas pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Os grupos experimentais foram divididos em

grupos específicos (G1 = Grupo controle, G2 = Tratados por via oral com ômega-3/6, G3 = Tratados por via subcutânea com ômega-3/6) e possuíam em média 5 animais em cada um.

A parafina foi colocada para dissolver em estufa de 60°C e, em seguida, lançada sobre uma placa de vidro lisa, previamente lubrificada com vaselina líquida. Depois de solidificada, a parafina foi cortada em tabletes homogêneos, de superfície lisa e do mesmo tamanho e espessura – peso médio = 220mg; tamanho = 1cm de comprimento por 0,5cm de largura por 0,2cm de espessura (TAFURI et al., 2000). Depois da anestesia geral, por meio da inoculação de tiopental por via intraperitoneal, seguiu-se a raspagem dos pelos da região dorso caudal dos camundongos em uma extensão aproximada de 4cm². Após lavagem e assepsia do local, fez-se uma incisão de mais ou menos 1,5cm da pele da região sacral, acerca de 1,5cm da implantação da cauda. Com uma tesoura, de ponta romba, fez-se uma pequena cavidade sob a pele em um dos lados da coluna vertebral e, com o auxílio de uma pinça, fixou-se um tablete. Finalmente, realizou-se a sutura da incisão com fio do tipo *Cat Gut* número 4. Os animais ficaram 21 dias sem receber qualquer tipo de tratamento para ocorrer o processo inflamatório ao redor da parafina implantada, formando uma cápsula granulomatosa.

A suplementação dos animais foi realizada por meio de cápsulas de óleo de peixe (1000ml) contendo 180mg de EPA (ácido eicosapentaenóico) e 120mg de DHA (ácido docosahexaenóico). No 22.º dia depois do implante da parafina, iniciou-se a suplementação por via oral ou subcutânea. Após a anestesia dos camundongos com éter, introduziu-se uma sonda uretral número 4, calibrada até o estômago, e administrou-se o óleo de peixe (100µl/camundongo). Pela via subcutânea, no local do implante de parafina, inoculou-se o óleo de peixe (20µl/camundongo). O animais receberam 8 (1 vez/semana) ou 24 (3 vezes/semana) doses, dependendo do experimento.

Para realizar a coleta do material, os animais foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical. Coletaram-se a pele e a cápsula (granuloma) ao redor da parafina. Esse material foi fixado em solução de formol 10% (pH = 7) e, posteriormente, foi feita a determinação da área do granuloma por meio do Programa Image-Lab 2000.

A análise dos dados foi realizada com o teste *t student* estabelecendo-se um nível de significância de 5%.

BRAGA, Déborah Kristina, et al. Modulação de inflamação por ômega-3/6. *Salusvita*, Bauru, v. 27, n. 3, p. 275-282, 2007.

RESULTADOS

A administração de óleo de peixe por via oral – 8 ou 24 doses – não modificou o aspecto macroscópico do granuloma induzido por implantes de parafina quando comparado com o dos animais do grupo controle (Figura 1). Além disso, não houve diferença significativa na área granuloma (Figura 2).

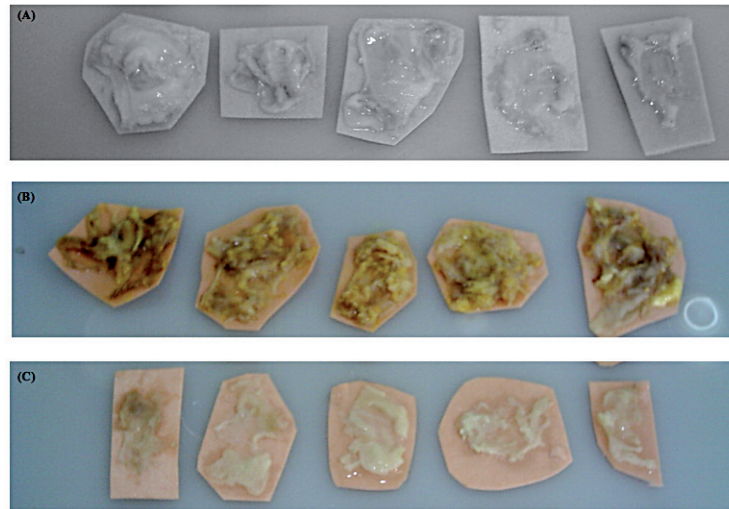


Figura 1 – Avaliação do aspecto macroscópico do granuloma induzido por implantes subcutâneos de parafina. Camundongos (n = 5) receberam implantes subcutâneos de parafina. Após 21 dias, os animais receberam: (A) salina por via oral; (B) ômega-3/6 por via subcutânea; (C) ômega-3 por via oral (observação: foram realizadas 3 repetições)

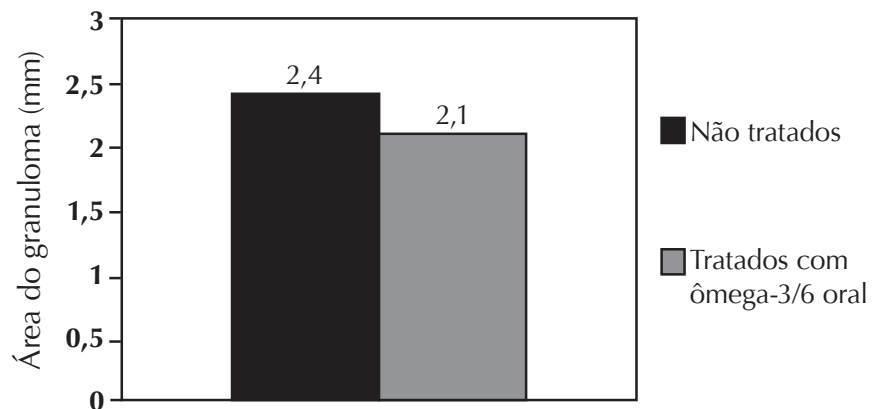


Figura 2 – Determinação da área do granuloma induzido por implantes subcutâneos de parafina. Camundongos (n = 5) receberam implantes subcutâneos de parafina. Após 21 dias, os animais foram tratados com salina por via oral ou ômega-3/6 por via oral (observação: foram realizadas 3 repetições/ p = 0,68)

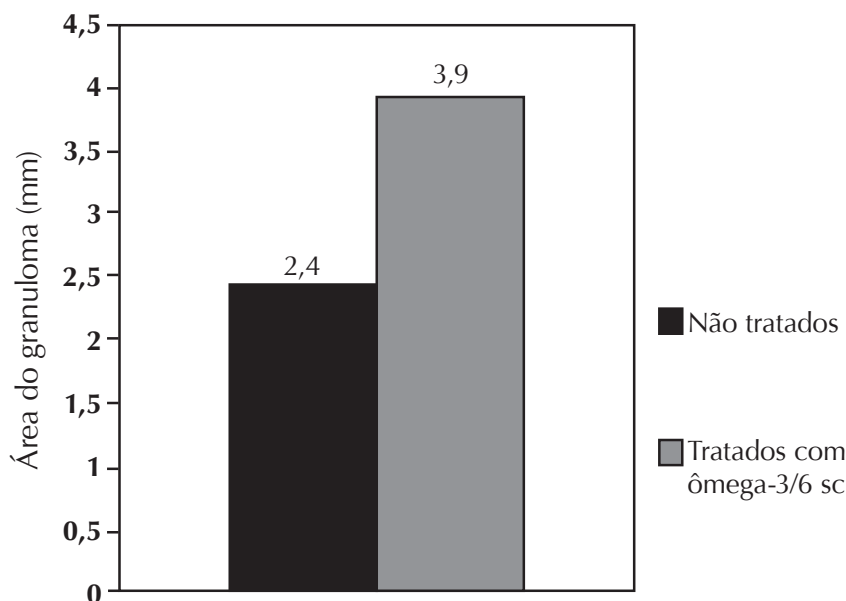


Figura 3 – Determinação da área do granuloma induzido por implantes subcutâneos de parafina. Camundongos (n = 5) receberam implantes subcutâneos de parafina. Após 21 dias, os animais foram tratados com salina por via subcutânea ou ômega-3/6 por via subcutânea. (observação: foram realizadas 3 repetições/ p = 0,01)

Por outro lado, a administração subcutânea de ômega-3/6 resultou em alterações macroscópicas, incluindo aumento da vascularização, retenção do óleo de peixe na cápsula (Figura 1) e aumento da área do granuloma (Figura 3). A inoculação de ômega-3/6 por via subcutânea, mesmo em animais que não receberam os implantes de parafina, induziu os efeitos descritos anteriormente, ou seja, o ômega-3/6 por via subcutânea foi capaz de sustentar um influxo de células inflamatórias por meio da ativação de uma reação granulomatosa (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados mostram que, de maneira geral, a suplementação de ômega-3/6 por via oral não altera a progressão do processo inflamatório crônico quando se avalia o desenvolvimento da cápsula conjuntiva ao redor do implante de parafina. Apesar dos estudos epidemiológicos demonstrarem que o consumo de peixe está diretamente relacionado com a função pulmonar e a prevalência de asma, um processo inflamatório crônico, os ensaios clínicos não conseguiram provar o efeito da suplementação com ômega-3 na

BRAGA, Déborah Kristina, et al. Modulação de inflamação por ômega-3/6. *Salusvita*, Bauru, v. 27, n. 3, p. 275-282, 2007.

BRAGA, Déborah
Kristina, et al.
Modulação
de inflamação
por ômega-3/6.
Salusvita, Bauru,
v. 27, n. 3,
p. 275-282, 2007.

redução da severidade dos sintomas, na melhoria da função pulmonar ou na redução de medicamentos pelos pacientes (MIHRSHAH et al., 2004; WONG, 2005). Essa diversidade de resultados deve-se a variações no número de doses, na frequência, nas espécies e nos modelos experimentais utilizados para o tratamento.

Apesar da inexistência de alterações macroscópicas do granuloma desenvolvido em animais tratados com ômega-3/6 por via oral, podem ter ocorrido mudanças nas populações celulares, ou ainda, nas substâncias e proteínas de membranas produzidas na inflamação. Portanto, é necessário avaliar tais parâmetros para verificar a existência de alterações nos mecanismos inflamatórios induzidos pelo ômega-3/6, uma vez que a modulação da resposta inflamatória pelos ácidos graxos (AGs) poliinsaturados é variada. Por meio da modificação do processo de ativação das células inflamatórias, esses AGs são capazes de induzir a síntese de mediadores lipídicos como, por exemplo, a 15-lipoxigenase, que possui efeitos opostos aos metabólitos gerados pelo ácido aracdônico e é um mediador lipídico pró-inflamatório (EBERHARD et al., 2002). Os AGs poliinsaturados também promovem a alteração da expressão de moléculas de adesão *in vivo* e *in vitro* interferindo, dessa maneira, na recirculação leucocitária – evento crucial para o processo inflamatório (GRIMM et al., 2002; WANG et al., 2003). Além disso, estudos em animais e humanos vêm demonstrando que a inclusão de óleo de peixe na dieta resulta na supressão da síntese de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas de adesão (CALDER, 2002; CAVAGLIERI et al., 2002).

Por outro lado, a administração de ômega-3/6 por via subcutânea demonstrou ser uma ferramenta útil para o estudo de mecanismos de ações de substâncias antiinflamatórias, uma vez que é capaz de induzir uma inflamação crônica do tipo granulomatosa. Ao contrário dos estudos que utilizam a via oral para administração do ômega-3, a administração desse AGPI por via subcutânea pode estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de moléculas de adesão para sustentar o influxo de células. Entretanto, o microambiente celular presente no local do granuloma ainda está fase de avaliação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O potencial de utilização do ômega-3/6, por meio da suplementação dietética, como modulador do processo inflamatório, deve ser bem avaliado mediante vários modelos experimentais, uma vez que pode contribuir ou não para redução do mesmo.

REFERÊNCIAS

- CALDER, P.C. Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 61, n. 3, p. 345-358, 2002.
- CALDER, P. C.; GRIMBLE, R. F. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v. 56, p. S14-19, 2002.
- CAVAGLIERI, C. R. et al. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro-and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sci.*, v. 73, n. 13, p. 1683-1690, 2002.
- EBERHARD, J. et al. Local application of n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids in treatment of human experimental gingivitis. *J. Clin. Periodontol.*, v. 29, n. 4, p. 364-369, 2002.
- GIL, A. Polysaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomed Pharmacother.*, v. 56, n. 8, p. 388-396, 2002.
- GRIMM, H. et al. Regulatory potential of n-3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. *Br. J. Nutr.*, v. 87, p. S59 -S67, 2002.
- MIHRSHAHI, S. et al. Effect of omega-3 fatty acid concentrations in plasma on symptoms of asthma at 18 months of age. *Pediatr. Allergy Immunol.*, v. 15, n. 6, p. 517-522, 2004.
- MORI, T. A.; BEILIN, L. J. Omega-3 fatty acids and inflammation. *Curr. Atheroscler. Rep.*, v. 6, n. 6, p. 461-467, 2004.
- SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fat acids. *Biomed. Pharmacother.*, v. 56, n. 8, p. 365-379, 2002.
- TAFURI, W. L. et al. Kinetics of an experimental inflammatory reaction induced by *Leishmania major* during the implantation of paraffin tablets in mice. *Vir. Arch.*, v. 437, n. 4, p. 429-435, 2000.
- WANG, Y.; LIU, Q.; THORLACIUS, H. Docosahexaenoic acid inhibits cytokine-induced expression of selectin and neutrophil adhesion to endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.*; v. 459, n. 2-3, p. 269-273, 2003.
- WEISS, G. et al. Immunomodulation by perioperative administration of n-3 fatty acids. *Br. J. Nutr.*, v. 87, p. S89-94, 2002.
- WONG, K. W. Effect of omega-3 fatty acid concentrations in plasma on symptoms of asthma at 18 months of age. *J. Am. Diet. Assoc.*, v. 105, n. 1, p. 98-105, 2005.
- BRAGA, Déborah Kristina, et al. Modulação de inflamação por ômega-3/6. *Salusvita*, Bauru, v. 27, n. 3, p. 7-14, 2007.