

## Efecto del aceite de pescado sobre la respuesta a dolor en ratas macho

Effect of fish oil on the response to pain in male rats

\* Leopoldo Eduardo Flores Mancilla, Pedro Martínez Arteaga,  
Lorena Ávila Carrasco, Dora Elena Benavides Haro\*

Unidad Académica de Medicina Humana /UAZ

Correo electrónico: mansieduas@hotmail.com

### Resumen

El dolor es una sensación desagradable, los fármacos se utilizan como terapia pero es frecuente la fármaco-resistencia. El consumo de grasas polinsaturadas omega-3 ( $\omega$ -3) como el ácido docosahexanoico (DHA) y el eicosapentaenoico (EPA) se ha asociado a efectos benéficos, poco se conoce respecto al efecto del consumo de aceite de pescado (con alto contenido de DHA y EPA) durante la etapa fetal sobre la respuesta a dolor en la vida extrauterina. El objetivo del estudio fue evaluar en un grupo suplementado con aceite pescado durante la etapa fetal (a través de la madre) la respuesta a un estímulo doloroso en la vida adulta. Los resultados se compararon con otro grupo suplementado con aceite de palma y un grupo control. El grupo que recibió aceite de pescado registro menor número de respuestas que los otros dos grupos ( $p < 0.05$ ). Conclusión.- El consumo de aceite de pescado modifica la respuesta a dolor.

**Palabras clave:** omega-3, dolor, grasas, aceite de pescado, roedores, gestación.

### Overview

Pain is an unpleasant sensation, medicine is used as therapy but drug resistance is frequent. The consumption of omega-3 polyunsaturated fats ( $\omega$ -3) and docosahexaenoic (DHA) and eicosapentaenoic (EPA) acid has been associated with beneficial effects, little is known about the effect of the consumption of fish oil (high in DHA and EPA) during fetal life on the response to pain in postnatal life. The aim of the study was to evaluate in a group supplemented with fish oil during the fetal stage (through the mother) the response to a painful stimulus in adult life. The results were compared with another group supplemented with palm oil and a control group. The group receiving fish oil recorded fewer responses than the other two groups ( $p < 0.05$ ). Conclusion.- The consumption of fish oil modifies the response to pain.

**Key words:** omega-3, pain, fat, fish oil, rodents, gestation.

## Introducción

En los mamíferos, los requerimientos de  $\omega$ -3 son vitales, especialmente durante el desarrollo del feto y durante los primeros meses de vida (Valenzuela A y Nieto MS, 2001). Diversos estudios en las áreas de inmunología (Calder PC, 2001), neuroquímica (Chalon S *et al.*, 2001), histología (Lauritzen I *et al.*, 2000), neurofisiología (Xiao Y y Li X, 1999) y de la conducta (Valenzuela A *et al.*, 2004) entre otros, han mostrado que el consumo de  $\omega$ -3 se asocia a un efecto benéfico en órganos y funciones, sin embargo, es poco lo que se conoce respecto al efecto de los  $\omega$ -3 sobre los mecanismos de dolor -una experiencia sensorial y emocional no placentera asociada a un daño potencial en los tejidos- (Menksey H y Bogduk N, 1964). Se ha propuesto que los  $\omega$ -3 pueden tener propiedades analgésicas, diversos estudios han mostrado que el incremento en el consumo de ácidos grasos  $\omega$ -3 se asoció a reducción de dolor en Artritis Reumatoide (Lau CS, 2006), Dismenorrea (Harel Z *et al.*, 1996) y a dolor en patologías de la columna vertebral (Maroon JC y Bost JW, 2006). En modelos animales se ha observado elevación del umbral ante un estímulo térmico doloroso (Yehuda S y Carasso RL 1993), aunque los mecanismos que subyacen a estos hallazgos aún no se conocen completamente, los efectos se han atribuido por un lado, a la propiedad que tienen los  $\omega$ -3 para reducir la producción de mediadores antiinflamatorios asociados a dolor, especialmente por el bloqueo de la lipooxigenasa y ciclooxigenasa (Bazan NG, 2005; Calder PC, 2001).

Por otro lado, también se ha propuesto que los  $\omega$ -3 pueden disminuir el dolor modulando las propiedades de las membranas neuronales, se cree que la composición neuronal en términos de  $\omega$ -3 pudiera dar cuenta de la respuesta ante un estímulo doloroso (Shapiro H, 2003), sin embargo se conoce poco de la acción terapéutica de moléculas como DHA y EPA, debido entre otros factores a que su aplicación en forma pura requiere de un manejo cuidadoso,

ya que estas moléculas sufren un proceso de oxidación en forma inmediata y su costo es más elevado en comparación con moléculas de  $\omega$ -3 contenidas en productos naturales como el aceite de pescado (AP), un nutrimento natural cuyo consumo se ha asociado a una baja incidencia de enfermedades cardíacas, inmunológicas e inflamatorias en la población esquimal (Bang HO *et al.*, 1971), asimismo poco se conoce en relación al efecto del AP, sobre la percepción de dolor, particularmente del efecto de la suplementación crónica durante el embarazo y su repercusión posterior ante un estímulo doloroso en la vida extrauterina.

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la suplementación de aceite de pescado administrado únicamente durante la etapa fetal (a través de la madre) a ratas que posteriormente en la vida adulta se les expuso a un estímulo doloroso.

## Material y Métodos

**Enfoque experimental, prospectivo y factorial.-** Se utilizaron tres grupos de ratas (n=10 c/grupo), el grupo control, el grupo con aceite de palma y el grupo con aceite de pescado. En el estudio la variable independiente fue el tratamiento, la variable dependiente fue la respuesta al estímulo doloroso bajo la prueba de la formalina, los resultados se evaluaron mediante un análisis de varianza de un factor y se consideró una P<0.05.

**Obtención de los sujetos experimentales.-** Inicialmente se formaron 3 grupos de madres progenitoras de los sujetos experimentales. El grupo PESCADO constituido por 6 hembras, fueron alimentadas ad libitum con una dieta comercial (HarlanTekland Co., USA), y adicionalmente se les administró diariamente un suplemento de aceite de pescado (Lab. Diet-Labs@USA) a una dosis de 300 mg/kg de peso. El grupo PALMA constituido por 6 hembras, que fueron alimentadas ad libitum con una dieta comercial (HarlanTekland Co., USA), y adi-

cionalmente se les administró diariamente aceite de palma (SpectrumChem. MFG Corp,® USA ) a una dosis de 300 mg/kg de peso. El grupo CONTROL constituido por 6 hembras, que fueron alimentadas ad libitum con una dieta comercial (HarlanTekland Co, USA), y adicionalmente se les administró diariamente 300 µl de agua bidestilada, las hembras de los tres grupos recibieron sus respectivos tratamientos por vía intragástrica a partir de los 45 días de edad, durante el apareamiento, gestación, y hasta el fin de la lactancia.

Cuando las hembras de los tres grupos alcanzaron los 135 días de edad, se colocaron en apareamiento, al final del periodo de gestación, en el primer día de nacimiento de las crías, cada camada se ajustó a un número de 10 sujetos conservando el mayor número de machos posible. Las crías macho sobrantes de las distintas camadas de cada uno de los grupos fueron sacrificadas para la determinación de lípidos en el cerebro. Al destete las ratas experimentales se colocaron en número de dos dentro de cada jaula (24X46X20 cm) hasta cumplir los 115 días de edad cuando fueron expuestas a la prueba de la formalina.

**Prueba de la formalina.**- Un día previo al experimento, cada uno de los sujetos fueron trasladados hacia un cuarto con temperatura ambiente de 20°C, y previo registro del peso corporal, cada sujeto fue colocado en una cámara cilíndrica de acrílico transparente (20X30X30cm) durante 30 min, con objeto de que se habituara, al término del periodo se regresó a su jaula, al día siguiente (día de prueba) se procedió a colocar a cada sujeto dentro de la cámara durante 30 min, luego, el sujeto fue sacado de la cámara y se le aplicó (mediante una jeringa de 1cc/ml(25Gx16mm)) en la parte dorsal del miembro posterior derecho 0.05 ml de una solución de formalina al 0.05%, e inmediatamente el sujeto se introdujo nuevamente a la cámara y se procedió a registrar durante periodos de 5 min el número de respuestas de sacudida (RS) del miembro afectado,

la secuencia se repitió hasta completar 60 min que duró la prueba. Las respuestas en cada sesión fueron registradas, videograbadas y posteriormente cuantificadas por un observador neutral que no conocía los tratamientos administrados. Al final de la evaluación se indujo el proceso de eutanasia por decapitación en cada uno de los sujetos, con el objeto de posteriormente determinar la composición de lípidos en sangre y cerebro.

**Perfil de lípidos.**- Inmediatamente después del nacimiento, las crías macho excedentes de cada grupo, se decapitaron para extraer el cerebro, el cual se depositó en hielo y posteriormente se realizó con él un homogenado que se depositó en tubos Falcon para posteriormente centrifugar la muestra a 2000 rpm, el sobrenadante obtenido se almacenó a -20°C para la posterior determinación del perfil lipídico. La extracción de los lípidos del homogenado se realizó por cromatografía de gases (Carbajal K et al., 2005) mediante un cromatógrafo Carlo Erba modelo 2300.

El cuidado de los animales así como todos los procedimientos en los que participaron, fueron sometidos a la aprobación por el Comité Local de Ética del Área de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Zacatecas, institución que sigue los lineamientos descritos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Science, National Research Council, 1996) de los Estados Unidos de Norteamérica.

Para el análisis de los datos utilizó el programa IBM SPSS Statistics 22.0 mediante el cual se realizó un análisis de varianza de un factor, y en el caso de diferencias significativas se realizaron pruebas a posteriori mediante la prueba de Tukey (5%), se consideró un intervalo de confianza de  $P < 0.05$ .

## Resultados

No se encontraron diferencias significativas en cuanto al peso corporal y consumo de alimento. La aplicación del estímulo doloroso (solución de formalina al 0.5%) sobre la parte dorsal de la mano, incrementó durante los primeros 5 min de la prueba la respuesta de sacudida (RS) del miembro afectado en todos los animales, el análisis mostró que el grupo PESCADO registró significativamente un menor número de respuestas al compararse con los grupos PALMA y CONTROL ( $F(2,27)=5.38$ ,  $p < 0.05$ ), posteriormente en todos los grupos se registró un marcado decremento de respuestas (min 5-10) que se continuó en forma paulatina hasta el minuto 15, a partir de este periodo, nuevamente se registró un incremento de respuestas y los valores más altos se alcanzaron entre los 30 y 40 min sin encontrar diferencias hasta el periodo 55-60 min, en el cual el grupo PALMA registró una tendencia a un mayor número de RS, sin significancia estadística (ver figura 1).

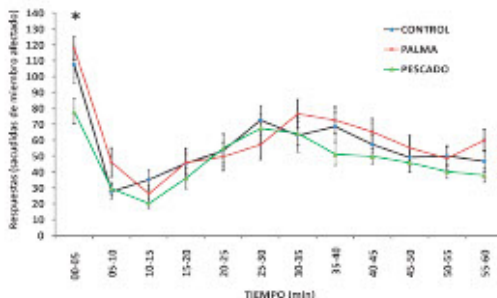


Fig. 1. Media  $\pm$  E.S. Del número de respuestas ante el estímulo doloroso de los sujetos adultos pertenecientes a los tres grupos experimentales durante la Prueba de la Formalina. \*  $p < 0.05$  PESCADO vs PALMA y CONTROL. (N=10)

Al analizar los resultados en las dos fases observadas durante la Prueba de la Formalina y tomando en cuenta el área bajo la curva, se encontró que en la 1ª fase el grupo Pescado mostró un menor número de respuestas en comparación con los grupos Control y Palma ( $F(2,27)=5.39$ ,  $p < 0.05$ ), por lo que respecta a la 2ª fase no se encontraron diferencias entre los

tres grupos (ver figura 2).

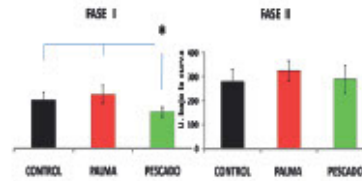


Fig. 2. Media  $\pm$  E.S. Del número de unidades bajo la curva de las respuestas en los distintos grupos durante los primeros 5 min. (Fase I) y 15-60 min. (Fase II) de la Prueba de la Formalina. \*  $p < 0.05$  PESCADO vs PALMA y CONTROL. (N=10).

El análisis de lípidos en homogenado de cerebro de las crías al nacimiento (que no participaron en la prueba) mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F(2,12)=3.11$ ,  $p < 0.05$ ) el grupo pescado registró promedios más altos en la proporción de los ácidos grasos polinsaturados particularmente DHA y EPA, (ver figura 3).

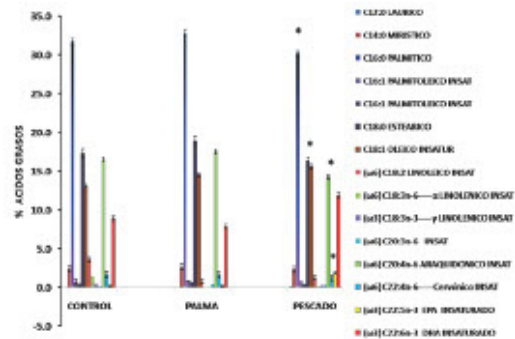


Fig. 3. Media  $\pm$  ESM del porcentaje de ácidos grasos en cerebro de ratas al nacimiento pertenecientes a cada uno de los grupos tratados. \*  $p < 0.01$  PESCADO vs PALMA y CONTROL. (N=6 X grupo).

## Discusión

El objetivo de este trabajo fue evaluar si el suministro de aceite de pescado dado como complemento alimenticio a ratas gestantes, modificaba la respuesta a un estímulo doloroso en sus descendientes, cuando éstos alcanzaban la edad adulta. Los resultados muestran que el tratamiento con aceite de pescado, se asoció a un menor número de respuestas ante el estímulo doloroso en la fase temprana, pero no en la tardía de la prueba de la formalina.

En el presente estudio se observó que los sujetos del grupo pescado registraron un menor número de respuestas pero únicamente durante la fase inicial de la Prueba de la Formalina. Esto pudiera deberse a que los distintos tratamientos se administraron solamente durante la etapa de gestación, en tal periodo se llevan a cabo cambios importantes en estructuras nerviosas, particularmente en las terminaciones periféricas (Valenzuela et al., 2004), podrían haberse dado cambios especialmente en los sujetos del grupo que recibió aceite de pescado, por lo que la sensibilidad de los nociceptores probablemente era diferente a la de los otros grupos, es decir, el aporte de DHA y EPA pudo propiciar una configuración en los nociceptores del grupo que recibió aceite de pescado, configuración distinta a la de los sujetos de los otros grupos. Se ha reportado que la presencia de los ácidos grasos polinsaturados como el DHA y EPA es crucial y determinante para el desarrollo ontogénico del sistema nervioso durante la etapa fetal y que se requieren para la conformación de receptores implicados en dolor (Hasegawa JH et al., 1987).

Asimismo, en el presente estudio, los sujetos compañeros de camada del grupo que recibió aceite de pescado, mostraron al nacimiento mayores concentraciones de DHA y EPA en comparación con los sujetos de los grupos PALMA y CONTROL, de tal manera que, la presencia de estas moléculas en mayor proporción, pudieron influenciar el desarrollo y la conformación de sus nociceptores a nivel periférico, modificando la sensibilidad hacia un estímulo doloroso, situación que también pudo darse en los sujetos experimentales, que eran de la misma camada, que llegaron a la vida adulta y que participaron en la prueba. Se ha reportado que los receptores de tipo  $\mu$  que procesan también dolor, requieren de lípidos en su configuración particularmente DHA y EPA (Hasegawa JH et al., 1987). Por otro lado, estas moléculas pueden modular los canales iónicos por cambios en la fluidez de membrana y en su elasticidad (Stillwell W et al., 2005). Reciente-

mente se ha mostrado que los  $\mu$ -3 interactúan de manera estructural con el receptor TPRV1 (Transient Potential Vanilloid subtype 1), TPRV1 es un canal iónico presente en la membrana de las neuronas nociceptivas periféricas, cuya activación está ligada al procesamiento de dolor (Matta et al., 2007).

En el presente estudio durante la 1ª fase de la Prueba de la Formalina pudo darse un bloqueo de los receptores TPRV1 en las ratas del grupo Pescado y esto se manifestó en un menor número de respuestas, sin embargo, en la 2ª fase (15-60min) que involucra un proceso inflamatorio, no se presentaron diferencias entre los grupos. Una posible explicación es que en el grupo pescado y en la edad adulta, ya no existían en circulación suficientes moléculas para contrarrestar además del dolor, también el daño provocado por la inflamación, alteración que no se observó inicialmente en los primeros 5 min de la prueba. Al respecto es probable que el efecto de la suplementación del aceite de pescado en la primera fase de la prueba se debiera al bloqueo de receptores TPRV1 y al bloqueo temporal de canales de sodio (involucrados en la despolarización de la célula nerviosa) e inactivación de fibras nociceptivas de tipo C que median dolor lento.

Por otro lado se observó que los sujetos hijos de madres suplementadas con aceite de palma mostraron significativamente mayor número de respuestas ante el estímulo doloroso en comparación con los sujetos hijos de madres suplementadas con aceite de pescado y con vehículo, tal resultado inesperado pudiera tener relación con el efecto de la suplementación de un tipo de aceite cuyo contenido es abundante en grasas saturadas y que tal composición influye sobre el desarrollo del cerebro, particularmente de las fibras nociceptivas en las ratas del grupo PALMA, en este sentido se ha reportado que la constitución bioquímica del aceite de palma tiene efectos adversos sobre la transmisión nerviosa, al respecto, se ha observado un incremento significativo de la hiperexcitabilidad

neuronal asociada a suplementación de aceite de palma (Flores-Mancilla, et al., 2014) lo cual estaría involucrando principalmente los nociceptores tipo C y no tipo A (Matson et al., 20015). Por lo tanto, es posible que en el presente estudio un alto consumo de grasas saturadas por el grupo PALMA pudiera haber inducido mayor sensibilidad a dolor en tejidos tegumentarios, es necesario estudios adicionales para determinar las causas que subyacen a mayor percepción de dolor bajo el consumo prolongado de grasas saturadas.

Para fundamentar lo anterior, se llevará a cabo la determinación del perfil de lípidos de los sujetos que participaron en la Prueba de la Formalina cuando estos alcanzaron la edad de 115 días, y cuyas muestras de sangre y cerebro están en proceso. Sin embargo, también es indispensable realizar otra investigación para determinar si la suplementación continua de aceite de pescado desde la etapa fetal, el nacimiento y hasta la vida adulta, influye también sobre la inflamación.

En conclusión los resultados de este estudio sugieren que la administración de aceite de pescado dado como complemento de la dieta a ratas madres durante la etapa de gestación puede asociarse en sus crías a una modificación de la respuesta ante un estímulo doloroso cuando éstas alcancen la edad adulta.

#### Referencias bibliográficas

- Bang H.O., Dyerberg J., Nielsen A.B., (1971). Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. *Lancet*, 1(7710), 1143-1145.
- Bazan N.G., (2005). Lipid signaling in neural plasticity, brain repair, and neuroprotection. *Mol Neurobiol*, 32(1), 89-103.
- Calder P.C., (2001). Omega 3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *World Rev Nutr Diet*, 88, 109-116.
- Carbajal K., El Hafidi M., Marin H.A., Sanchez M.R., (2005). Structural and functional changes in heart mitochondria from sucrose-fed hypertriglyceridemic rats. *Biomedica and Biophysica Acta*, 1709, 231-239.
- Chalon S., Vancassel S., Zimmer L., Guilloteau D., Durand G., (2001). Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission. *Lipids*, 36(9), 937-944.
- Flores-Mancilla LE ,Hernández-González M, Guevara MA, Benavides-Haro DE, Martínez-Arteaga P. (2014) Long-term fish oil supplementation attenuates seizure activity in the amygdala induced by 3-mercaptopropionic acid in adult male rats; *Epilepsy and Behav*, 33:126-34.
- Harel Z., Biro F.M., Kottenhahn R.K., Rosenthal S.L., (1996). Supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids in the management of dysmenorrhea in adolescents. *Am J Obstet Gynecol*, 174(4), 1335-1338.
- Hasegawa J.H., Loh H.H., Lee M.N., (1987). Lipid Requirement for  $\mu$  Opioid Receptor Binding. *J. Neurochem*, 49(4), 174-182.
- Lau C.S., (2006). Collateral benefits of fish oil therapy for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 33(10), 1931-1933.
- Lauritzen I., Blondeau N., Heurteaux C., Widmann C., Romey G., Lazdunski M., et al., (2000). Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J*, 19(8), 1784-1793.
- Maroon J.C., Bost J.W., (2006). Omega-3 fatty acids (fish oil) as an anti-inflammatory: an alternative to nonsteroidal anti-inflammatory drugs for discogenic pain. *Surg Neurol*, 65(4), 326-331.
- Matson DJ, Hamamoto DT, Bregman H, Cooke M, DiMauro EF, Huang L, Johnson D, Li X, McDermott J, Morgan C, Wilenkin B, Malmerg

AB, McDonough SI, Simone DA. (2015) Inhibition of Inactive States of Tetrodotoxin-Sensitive Sodium Channels Reduces Spontaneous Firing of C-Fiber Nociceptors and Produces Analgesia in Formalin and Complete Freund's Adjuvant Models of Pain. *PLoS One*. 17; 10(9): 2-20.

Matta J.A., Miyares R.L., Ahern G.M., (2007). TRPV1 is a novel target for omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J.Physiol*, 15(578), 397-341.

Menksey H., Bogduk N., (1964). Classification of Chronic Pain. (Seattle: I ASP Press.) pp 5.

Shapiro H., (2003). Could n-3 polyunsaturated fatty acids reduce pathological pain by direct actions on the nervous system? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 68(3), 219-224.

Stillwell W., Shaikh R.S., Zerouga M., Siddiqui R., Wassall R.S., (2005). Docosahexanoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Rep.Nut.Dev*, 45, 559-579.

Valenzuela A., Nieto M.S., (2001). Docosahexanoic acid (DHA) in fetal development and in infant nutrition. *Rev Med Chil*, 129(10), 1203-1211.

Valenzuela A., Von Bernhardt R., Valenzuela V., Ramirez G., Alarcón R., et al., (2004). Supplementation of female rats with alpha-linolenic acid or docosahexanoic acid leads to the same omega-6/omega-3 LC-PUFA accretion in mother tissues and in fetal and newborn brains. *Ann Nutr Metab*, 48(1), 28-35.

Xiao Y., Li X., (1999). Polyunsaturated fatty acids modify mouse hippocampal neuronal excitability during excitotoxic or convulsant stimulation. *Brain Res*, 846(1), 112-121.

Yehuda S., Carasso R.L., (1993). Modulation of learning, pain thresholds, and thermoregulation in the rat by preparations of free purified alpha-linolenic and linoleic acids: determination of the optimal omega 3-to-omega 6 ratio.

*Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(21), 10345-10349.

