

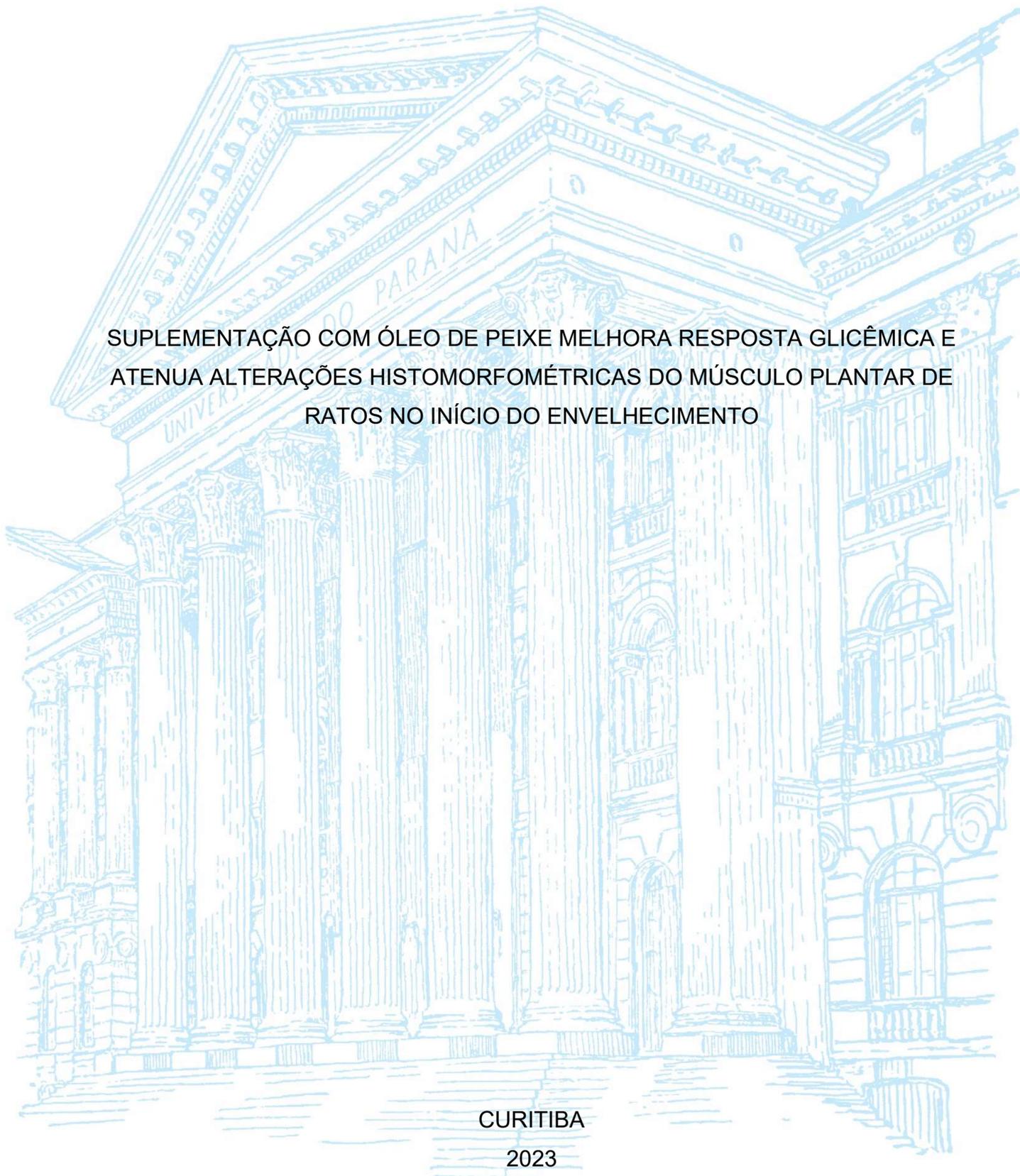
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELIELTON HORLEM DA LUZ

SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE MELHORA RESPOSTA GLICÊMICA E
ATENUA ALTERAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICAS DO MÚSCULO PLANTAR DE
RATOS NO INÍCIO DO ENVELHECIMENTO

CURITIBA

2023



ELIELTON HORLEM DA LUZ

SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE MELHORA RESPOSTA GLICÊMICA E
ATENUA ALTERAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICAS DO MÚSCULO PLANTAR DE
RATOS NO INÍCIO DO ENVELHECIMENTO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Biomedicina, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial à obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes

Co-orientadora: B. Sc. Letícia Dalla Vechia
Henschel

CURITIBA

2023

TERMO DE APROVAÇÃO

ELIELTON HORLEM DA LUZ

SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE MELHORA RESPOSTA GLICÊMICA E ATENUA ALTERAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICAS DO MÚSCULO PLANTAR DE RATOS NO INÍCIO DO ENVELHECIMENTO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes
Orientador, Departamento de Fisiologia, UFPR

B. Sc. Letícia Dalla Vechia Henschel
Co-orientadora, Departamento de Fisiologia, UFPR

Profa. Dra. Fabíola Iagher
Departamento de Fisiologia, UFPR

Dr. Sandro Bonatto
Departamento de Fisiologia, UFPR

Curitiba, 04 de dezembro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Aos meus colegas de curso, especialmente a Carolina Sarmento, Heloisa Amancio e Ana Carla Costa e Silva.

Aos meus mentores no laboratório, Diego Francis Saraiva, Matheus Zazula e Letícia Dalla Vechia Henschel.

Aos meus orientadores, Katya Naliwaiko e Luiz Claudio Fernandes, pela oportunidade ímpar que tanto me proporcionaram.

“(...) to move things is all that humankind can do, and for such the sole executant is muscle, whether in whispering a syllable or in felling a forest.”

Sherrington, Charles

RESUMO

O envelhecimento é caracterizado pela perda progressiva da funcionalidade celular e tecidual de um indivíduo. Entre os tecidos que passam por essa disfunção, destaca-se o músculo estriado esquelético por sua importância na sustentação e metabolismo do organismo. Uma vez que essas mudanças são acompanhadas por desregulação na sensibilidade a nutrientes, destacam-se intervenções nutricionais que atenuem o declínio tecidual com a idade, como a suplementação com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPI-n3). Assim, este estudo buscou avaliar os efeitos da suplementação com doses de 1 g/kg de óleo de peixe (grupo OP), ricos em AGPI-n3, no início da intolerância periférica à glicose em ratos *Wistar*. A diminuição da captação de glicose foi identificada pelo Teste de Tolerância à Glicose (GTT) aos 12 meses de idade dos animais. A partir desse momento foi iniciada a suplementação, por 60 dias, com óleo de peixe. Em seguida, foi realizado um novo GTT, onde se observou melhora da captação da glicose no grupo OP ($p < 0,5$). Os animais foram então eutanasiados para a coleta do músculo plantar de ambos membros pélvicos. Posterior análise histomorfométrica revelou aumento da densidade de fibras ($p < 0,01$) e da presença de núcleos centrais nas fibras ($p < 0,01$) dos animais do grupo OP quando comparada à do grupo controle, ambos indicativos de melhora na regeneração tecidual. Contudo, não foi observada hipertrofia ou aumento da capilarização tecidual. Em conjunto, esses dados sugerem um importante papel do óleo de peixe na modulação da captação de glicose e da morfologia muscular esquelética no início do processo de envelhecimento.

Palavras-chave: Envelhecimento; Músculo Estriado Esquelético; Resistência Periférica à Insulina; Ácidos Graxos Poli-insaturados Ômega-3; Óleo de Peixe.

ABSTRACT

Aging is marked by a progressive loss of cell and tissue function within an individual. Among the tissues affected by this dysfunction, skeletal muscle stands out for its importance in the metabolism and sustentation of the body. Once the deregulation of nutrient-sensing correlates with these changes, there is a focus on nutritional interventions that attenuate the tissue decline during aging, like the supplementation of poly-unsaturated fatty acids omega-3 (PUFA-n3). Therefore, this study aimed to evaluate the effects of a daily intake of 1g/kg of fish oil, rich in PUFA-n3, after the beginning of a peripheral glucose intolerance in rats *Wistar*. The reduction in glucose uptake was identified through a Glucose Tolerance Test (GTT) at 12 months of age in the animals. Following this moment, we initiated a 60-day supplementation with fish oil. Then, a new GTT was performed, where an improvement in glucose uptake was observed in the OP group ($p < 0.5$). The animals were euthanized for the dissection of the plantar muscle of both pelvic members. Subsequent histomorphometric analysis revealed an increase in fiber density ($p < 0.01$) and the presence of central nuclei in fibers ($p < 0.01$) in the OP group when compared to the control group, both indicative of improvement in tissue regeneration. Nonetheless, we didn't find hypertrophy or more tissue capillarization with the supplementation. Together, these data suggest the important role of fish oil in modulating glucose uptake and morphology of skeletal muscle in the early stages of the aging process.

Key-words: Aging; Skeletal Muscle; Peripheral Insulin Resistance; Poli-unsaturated Fatty Acids Omega-3; Fish Oil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Características do envelhecimento.	13
Figura 2: Características do envelhecimento do músculo estriado esquelético.	14
Figura 3: Mecanismos de sinalização intracelular influenciados por ácidos graxos poli-insaturados ômega-3.	17
Figura 4: Metabólitos e proteínas influenciados direta e indiretamente pela suplementação com ômega-3 associados com regeneração muscular.	20
Figura 5: Teste de Tolerância à Glicose intraperitoneal em ratos Wistar aos 9, 12 e 15 meses de idade.	25
Figura 6: Teste de Tolerância à Glicose em ratos Wistar controle (C) e suplementados com óleo de peixe rico em ômega-3 (OP) na dose de 1 g/kg	26
Figura 7: Morfometria do músculo plantar de ratos Wistar aos 15 meses de idade.	27
Figura 8: Histomorfometria do músculo plantar de ratos Wistar aos 15 meses de idade.	28
Figura 9: Fotomicrografia em H&E do músculo plantar de ratos Wistar aos 15 meses de idade.	29
Figura 10: Área e proporção de fibras do músculo plantar de ratos Wistar aos 15 meses.	30
Figura 11: Fotomicrografia em NADH-TR do músculo plantar de ratos Wistar aos 15 meses de idade.	31

LISTA DE ABREVIATURAS

DHA – ácido docosohexaenoico

EPA – ácido eicosapentaenoico

AGPI-n3 – ácidos graxos poli-insaturados ômega-3

C – grupo controle

OP – óleo de peixe / grupo suplementado com óleo de peixe

NADH-TR – nicotinamida dinucleotídeo desidrogenase - tetrazólio redutase

H&E – hematoxilina e eosina

COX – ciclooxigenase

LOX – lipoxigenase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 ENVELHECIMENTO MUSCULAR	13
2.2 MODULAÇÃO DO METABOLISMO E DA INFLAMAÇÃO POR AGPI-N3	16
2.3 AGPI-N3 E REGENERAÇÃO TECIDUAL	18
2.4 OBJETIVOS	20
3 METODOLOGIA	21
3.1 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS	21
3.2 TESTE DE TOLERÂNCIA INTRAPERITONEAL À GLICOSE	21
3.3 EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS	22
3.4 COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA-EOSINA	22
3.5 REAÇÃO DE NADH-TR	23
3.6 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	23
3.7 ESTATÍSTICA	24
4 RESULTADOS	24
4.1 INTOLERÂNCIA À GLICOSE SE APRESENTA EM RATOS <i>Wistar</i> A PARTIR DOS 12 MESES DE IDADE	24
4.2 HISTOMORFOMETRIA DO MÚSCULO PLANTAR	26
4.3 TIPOS DE FIBRAS	29
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO	33
7 REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

Até 2050, estima-se que o mundo terá aproximadamente 2 bilhões de pessoas com 60 anos ou mais (WHO, 2022). Isso evidencia a necessidade de se estudar o complexo processo de envelhecimento, bem como intervenções que propiciem melhor qualidade de vida. Parte da complexidade deste processo se deve a grande heterogeneidade de mudanças celulares e teciduais que ocorrem com a idade (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013). Entre essas mudanças, destacam-se as alterações no sistema musculoesquelético, cuja disfuncionalidade progressiva no envelhecimento resulta na diminuição da mobilidade e qualidade de vida (KIRK et al., 2019).

O envelhecimento é marcado pelo surgimento da resistência periférica à insulina, menor substituição de células danificadas por novas e diminuição de massa e funcionalidade muscular (VOLPI; NAZEMI; FUJITA, 2004). Contudo, ainda não está claro na literatura se o surgimento das alterações morfohistológicas presentes em músculos é concomitante ao início da resistência periférica à insulina (marcada principalmente por uma diminuição da captação de glicose) em indivíduos no processo de envelhecimento.

Dentre as possíveis intervenções para minimizar o envelhecimento do músculo, destaca-se a ação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPI-n3), cujos benefícios anti-inflamatórios, antioxidantes e na captação de glicose já foram associados com melhora do quadro de saúde em idosos (MICKLEBOROUGH, 2013). Isso tem sido explicado pela produção de resolvinas e prostaglandinas anti-inflamatórias, assim como pelo aumento da atividade antioxidante de enzimas intracelulares (MCGLORY; CALDER; NUNES, 2019; SMITH, 2018; THERDYOTHIN; PHIPHOPHATHSANE; ISANEJAD, 2023).

Até o momento, não é sabido a duração dos efeitos da suplementação com OP no envelhecimento, se atenua as mudanças já estabelecidas com a idade avançada e nem se a suplementação com OP retarda o surgimento destas mudanças logo no início do processo de envelhecimento (SMITH, 2018). Dessa forma, a investigação do papel dos AGPI-n3 sobre os parâmetros histomorfométricos do músculo desde o início do processo de envelhecimento e de decaimento da atividade metabólica lançará luz sobre os eventos que ocorrem no envelhecimento sobre esse tecido.

Uma vez que um dos principais impeditivos no estudo do envelhecimento humano é o longo tempo deste processo, necessita-se de modelos animais para mimetizá-lo em um menor período de tempo. Já é bem estabelecido o comparativo da

idade e metabolismo entre ratos *Wistar* e humanos (SENGUPTA, 2013). Portanto, este estudo buscará compreender a associação do início das mudanças metabólicas musculares com as alterações histomorfométricas no começo do processo de envelhecimento em ratos *Wistar*.

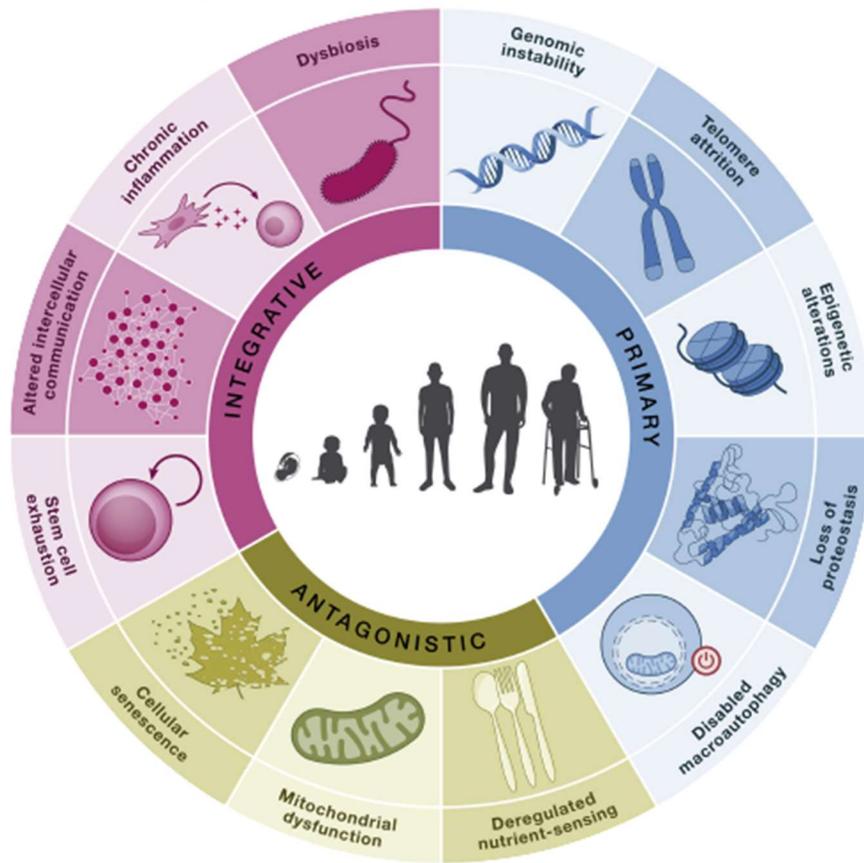
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A crescente expectativa de vida das populações humanas resultou em aumento da população idosa e expôs a necessidade de se buscar intervenções para prolongar a qualidade de vida (WHO, 2022). O envelhecimento é caracterizado por perda progressiva da funcionalidade celular e tecidual do organismo, acompanhado, em alguns casos por diabetes mellitus tipo II, osteoporose e sarcopenia (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013).

Entre as alterações que ocorrem com o envelhecimento, destacam-se os danos primários, antagonistas e integrativos. Os danos primários são cumulativos e causadores bem-estabelecidos do envelhecimento. Em resposta a estes danos, surgem adaptações antagonistas, que podem acelerar o processo de envelhecimento. Por fim, os danos integrativos surgem quando os danos primários e antagonistas já não podem ser compensados (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013) (Figura 1).

Essas características do envelhecimento também afetam o aparelho locomotor, promovendo diminuição da funcionalidade dos sistemas ósseo, articular e muscular e resultando no decréscimo da mobilidade do indivíduo (KIRK et al., 2019).

Figura 1: Características do envelhecimento.



Fonte: López-Otín *et al.* (2023). As principais características do envelhecimento incluem a instabilidade genômica, atrito telomérico, alterações epigenéticas, perda de proteostasia, macroautofagia desativada (danos primários), sensibilidade a nutrientes desregulada, disfunção mitocondrial, senescência celular (danos antagonistas), exatidão de células-tronco, comunicação intercelular alterada, inflamação crônica e disbiose (danos integrativos). Essas características podem ser classificadas em primárias (danos cumulativos e contribuidores inambíguos do envelhecimento), antagonistas (danos em resposta aos problemas primários do envelhecimento) ou integrativos (quando os danos primários e antagonistas não podem ser compensados).

2.1 ENVELHECIMENTO MUSCULAR

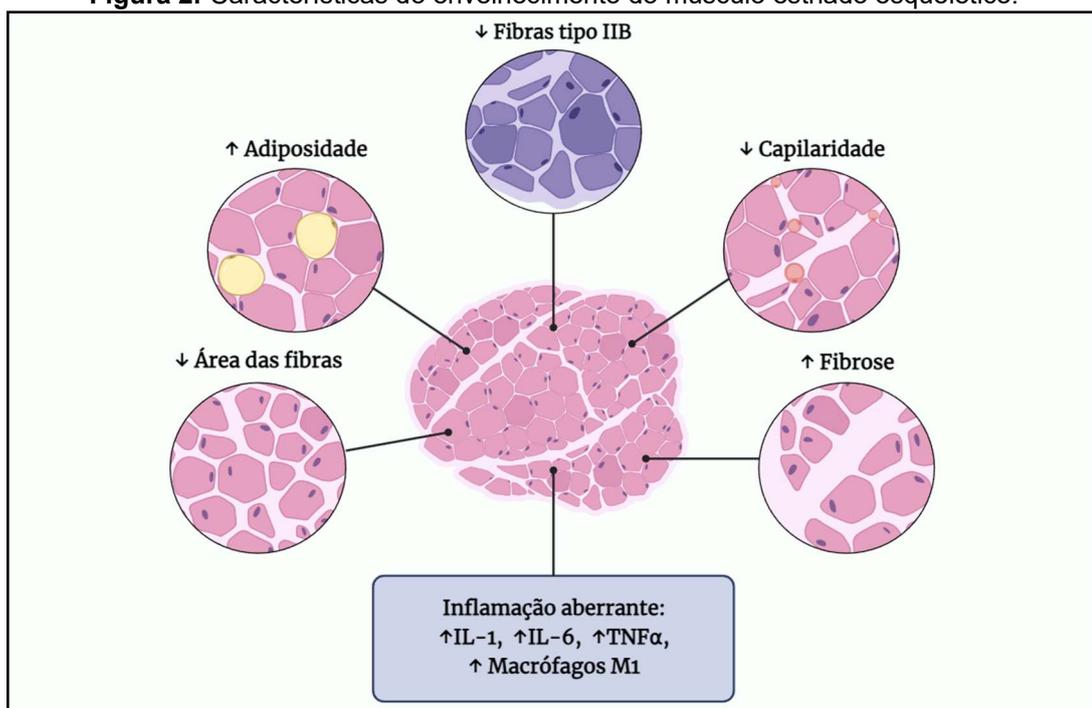
O avanço da idade leva à redução da regeneração muscular e, como consequência, à perda progressiva da funcionalidade e força do músculo estriado esquelético (CRUZ-JENTOFT *et al.*, 2019). Essas alterações podem ser classificadas em histológicas e bioquímicas. As alterações bioquímicas são as primeiras a surgir e resultam em alteração no metabolismo celular, sendo em último caso correlacionadas com as alterações histológicas pela perda de densidade e atividade oxidativa das fibras do Tipo I (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011). Assim, não é surpreendente que o início do envelhecimento tecidual muscular possa ocorrer concomitantemente à

instalação da disfunção progressiva na captação e metabolização da glicose, resultando, em última instância, em resistência periférica à insulina.

Esse desbalanço energético da fibra muscular resulta progressivamente em distresse oxidativo, inflamação aberrante e anabolismo reduzido (PAN et al., 2023; ROBINSON et al., 2018). Como resultado, as populações de fibras musculares tendem a sofrer uma série de mudanças que culminam na diminuição da população de fibras glicolíticas (tipo IIB) e aumento da população de fibras glicolíticas-oxidativas (tipo IIA) e oxidativas (tipo I) (SCHIAFFINO, 2011). Uma vez que as fibras glicolíticas são importantes em atividades que demandam força muscular, a perda destas fibras com a idade pode ser relacionada com a diminuição progressiva da funcionalidade tecidual (Figura 2).

Outras alterações estruturais do tecido muscular com a idade incluem ainda a redução da autofagia, resultando em aumento da disfunção mitocondrial pelo acúmulo de mitocôndrias danificadas (RUSS, 2015; DAO, 2020). Em última instância, o efeito cascata ocasiona prejuízos na mitofagia, culminando na perda da homeostasia muscular e aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), enquanto reduz a disponibilidade de ATP e a funcionalidade de proteínas intracelulares (GOUSPILLOU, 2014; VOLPI; NAZEMI; FUJITA, 2004).

Figura 2: Características do envelhecimento do músculo estriado esquelético.



Fonte: O Autor (2023). O envelhecimento muscular é marcado por alterações na inflamação (aumento de interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6), Fator-alfa de Necrose Tumoral (TNF α) e macrófagos pró-inflamatórios (M1)) e na morfologia tecidual. Entre as alterações histomorfométricas, cita-se a atrofia das fibras musculares, aumento da adiposidade intramuscular, diminuição da capilaridade, aumento da fibrose e diminuição da população de fibras glicolíticas (tipo IIB).

Em adição, o envelhecimento do músculo estriado esquelético é caracterizado ainda pelo aumento da adiposidade muscular, com acúmulo de gordura inter- e intracelular (KIRK, 2019) (Figura 2). Essas alterações resultam em maior suscetibilidade das células-tronco locais em serem comprometidas para linhagens fibrogênicas e adipogênicas (MCCORMICK, 2018). Tais mudanças nas linhagens miogênicas, juntamente com alterações na matriz extracelular, como o acúmulo de colágeno, desbalanceiam o processo de regeneração e remodelação muscular com a idade (MCCORMICK, 2018). Esse desbalanço pode ser explicado pelo aumento da sinalização *Wnt*, cuja influência no destino miogênico de mioblastos já foi observada no músculo em envelhecimento (BRICK, 2007).

Outro fator importante indicativo da perda regenerativa e remodelativa pode estar associado com a inflamação crônica aberrante presente no músculo com a idade (MCCORMICK, 2018). Essa inflamação reflete diretamente em alteração na presença dos macrófagos M1 e M2 (com aumento do fenótipo pró-inflamatório M1), além de uma elevação contínua da expressão de NF-kB e de citocinas inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF α (ANTUÑA, 2022). Como resultado, a regeneração muscular é prejudicada ao mesmo tempo em que ocorre a indução de danos e atrofia em nível celular e tecidual (ANTUÑA, 2022; HADDAD, 2005; TIDBALL, 2021).

Além disso, em estágios mais avançados do envelhecimento muscular, é observado também redução da capilaridade, diminuindo o aporte nutricional às fibras, e fibrose, marcado por alterações na remodelação da matriz extracelular (KIRK, 2019). Assim, uma das principais intervenções coadjuvantes no processo de envelhecimento do músculo estriado esquelético envolve a presença de produtos com características anti-inflamatórias, como os AGPI-n3 presentes no óleo de peixe (ANTUÑA, 2022).

2.2 MODULAÇÃO DO METABOLISMO E DA INFLAMAÇÃO POR AGPI-N3

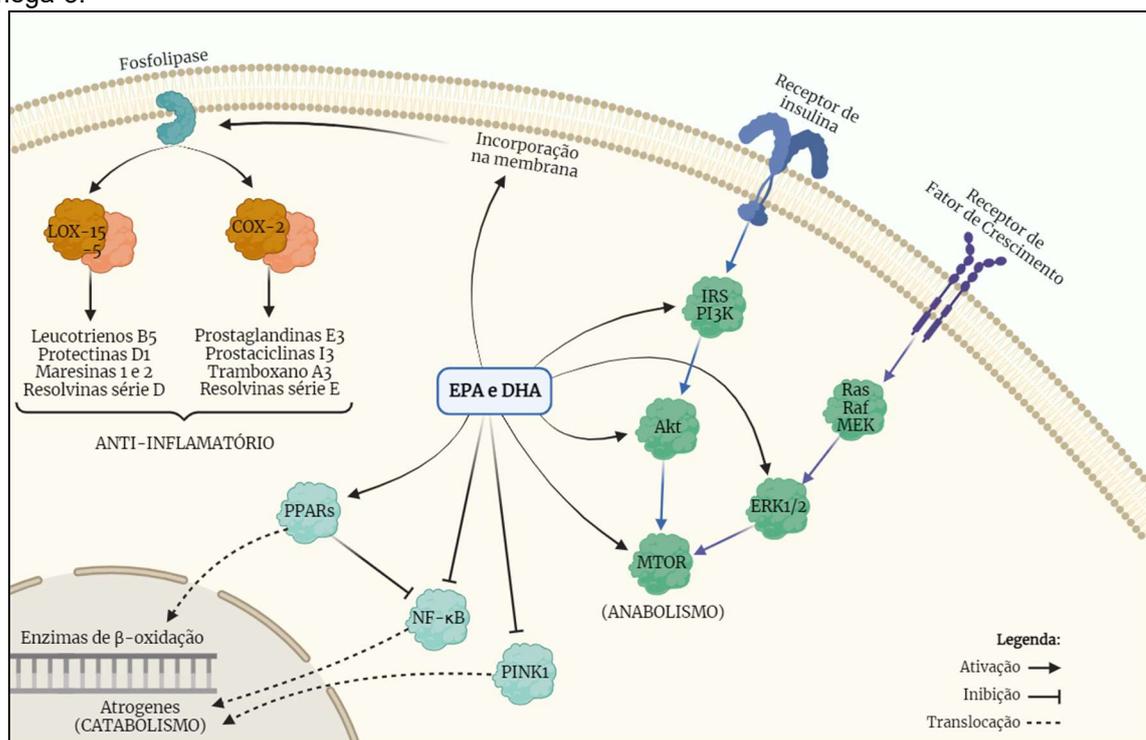
Entre as possíveis intervenções para retardar as disfunções metabólicas e estruturais do músculo estriado esquelético, destaca-se o uso de suplementos contendo AGPI-n3 (LALIA et al., 2017; PAN et al., 2023; ROBINSON et al., 2018; SMITH, 2018). Atualmente, já está bem definido na literatura que a suplementação com óleo de peixe (OP), rico em AGPI-n3 resulta em melhorias nas alterações histomorfométricas associadas com o envelhecimento, diminuindo os danos oxidativos, a inflamação e melhorando a captação de glicose (DUPONT et al., 2019; MCGLORY et al., 2019; ZHANG et al., 2022). No caso da inflamação, destaca-se a ação de mediadores lipídicos como resolvinas da série E e D, protectinas e maresinas, cuja ação pode ajudar a combater a inflamação crônica, característica do envelhecimento.

As resolvinas da série E são produtos da metabolização do ácido eicosapentaenoico (EPA) (18:3 n-3), presente na membrana plasmática, pela ciclooxigenase 2 (COX2), formando os ácidos 18-hidroperoxi-eicosapentenoico e 18-hidroxi-eicosapentaenoico. Esses ácidos serão substratos para a formação de resolvina E1 e E2 pela Lipoxigenase (LOX) 5 e resolvina E3 pela LOX15 (SERHAN, 2018). Por sua vez, as resolvinas da série D e as protectinas são produtos da metabolização do ácido docosahexaenoico (DHA) (22:6 n-3), também incorporado na membrana plasmática, pela enzima LOX15, formando o ácido 17-hidroperoxidocosahexaenoico, que é posteriormente epoxidado e hidrolisado para formar as resolvinas D1, D2, D3 e D4 (SERHAN, 2018). Outra possível via de metabolização do DHA resulta na formação de maresinas como produtos finais, após ser metabolizado pela LOX12 e gerar o intermediário ácido 14-hidroperoxidocosahexaenoico.

A ação dessas maresinas, protectinas e resolvinas na inflamação ocorre pela imunorregulação de células leucocitárias, resultando em aumento da atividade fagocitária, diminuição da infiltração local por células polimorfonucleadas e *switch* de macrófagos tipo M1 em M2 (GUTIÉRREZ, 2019). Apesar de serem importantes imunorreguladores, esses mediadores atuam ainda em diversas vias intracelulares associadas com a sinalização da insulina. As maresinas 1, por exemplo, já foram associadas com fosforilação da via da proteína quinase B (Akt), resultando em aumento da sensibilidade à insulina e da captação de glicose nos tecidos adiposo e muscular (FERNÁNDEZ, 2021).

Nesse sentido, os AGPI-n3 e seus metabólitos estão associados com alteração do balanço entre síntese e degradação proteica celular (DUPONT et al., 2019; MICKLEBOROUGH, 2013). As vias proteolíticas inibidas por EPA e DHA incluem a Quinase Induzida por PTEN 1 (PINK1) e o Fator Nuclear Kappa B (NF-κB), associados com a expressão de atrogenes. Os atrogenes (*atrophy-regulated genes*) são genes cujo aumento ou diminuição da expressão ocorre na atrofia muscular, como ubiquitinases, atrogin-1 e FOXO3 (TAILLANDIER & POLGE, 2019). Por outro lado, há indução de outras vias metabólicas, como dos Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma (PPARs), que são associados com a β-oxidação, e o complexo TOR-1, fundamental para a síntese proteica (DUPONT et al., 2019; SMITH, 2018; THERDYOTHIN et al., 2023) (Figura 3).

Figura 3: Mecanismos de sinalização intracelular influenciados por ácidos graxos poli-insaturados ômega-3.



Fonte: O Autor (2023). Legenda: Incorporação dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosohexaenóico (DHA) na membrana plasmática os mobiliza para a via da COX2, LOX5 e LOX15 – todos associados com a produção de metabólitos anti-inflamatórios. Na sinalização intracelular, esses ácidos atuam ativando o substrato do receptor da insulina (IRS), a proteína quinase B (Akt), a proteína alvo da rapamicina (mTOR) e a proteína quinase ativada por mitógeno (ERK1/2), associadas com a sinalização da insulina e com anabolismo. No núcleo, EPA e DHA agem indiretamente ao influenciar importantes fatores de transcrição, como PPARs, NF-κB e PINK1.

Apesar de todo conhecimento sobre o papel anti-inflamatório e metabólico dos AGPI-n3, diversos mecanismos de ação dos mesmos, especialmente no envelhecimento, ainda não são totalmente conhecidos. Além disso, os estudos atuais usam a suplementação com OP como intervenção em indivíduos idosos, não esclarecendo se esses efeitos benéficos também ocorreriam ante o surgimento de alterações histomorfométricas, logo no início do envelhecimento (DUPONT et al., 2019; MESSA et al., 2019; SMITH, 2016; THERDYOTHIN et al., 2023). Mesmo em modelos animais, que possibilitam o estudo do envelhecimento em curtos prazos de tempo, ainda é comum o uso da suplementação com OP em animais de idade avançada, quando os danos aos organismos já estão bem estabelecidos esses são dificilmente revertidos (LALIA et al., 2017; MESSA et al., 2019; REINDERS et al., 2015; SMITH, 2016).

Em suma, como o envelhecimento é estado inflamatório de baixo grau, a suplementação com OP, rico em produtos com ação anti-inflamatória, podem atenuar a inflamação crônica que acompanha o avanço da idade, emergindo assim como importante terapia coadjuvante para a manutenção da qualidade de vida dessa população.

2.3 AGPI-N3 E REGENERAÇÃO TECIDUAL

A ação anti-inflamatória dos AGPI-n3 é associada também com aceleração do processo regenerativo em diversos tecido. O papel das resolvinas da série E e D na regeneração tecidual começou a ser elucidado nos últimos anos, com a compreensão da importância da resolução inflamatória no início e na aceleração da regeneração (JANNAS-VELA, 2023). Assim, a atividade de resolvinas já foi relacionada com a modulação da atividade de células-tronco periodontais, ativação de células tronco mieloides e musculares, redução da razão de macrófagos M1/M2 e redução da infiltração por neutrófilos (ALBUQUERQUE-SOUZA, 2020; MARKWORTH, 2020; VASCONCELOS, 2015; CHEN, 2021, GIANAKKIS, 2021) (Figura 4).

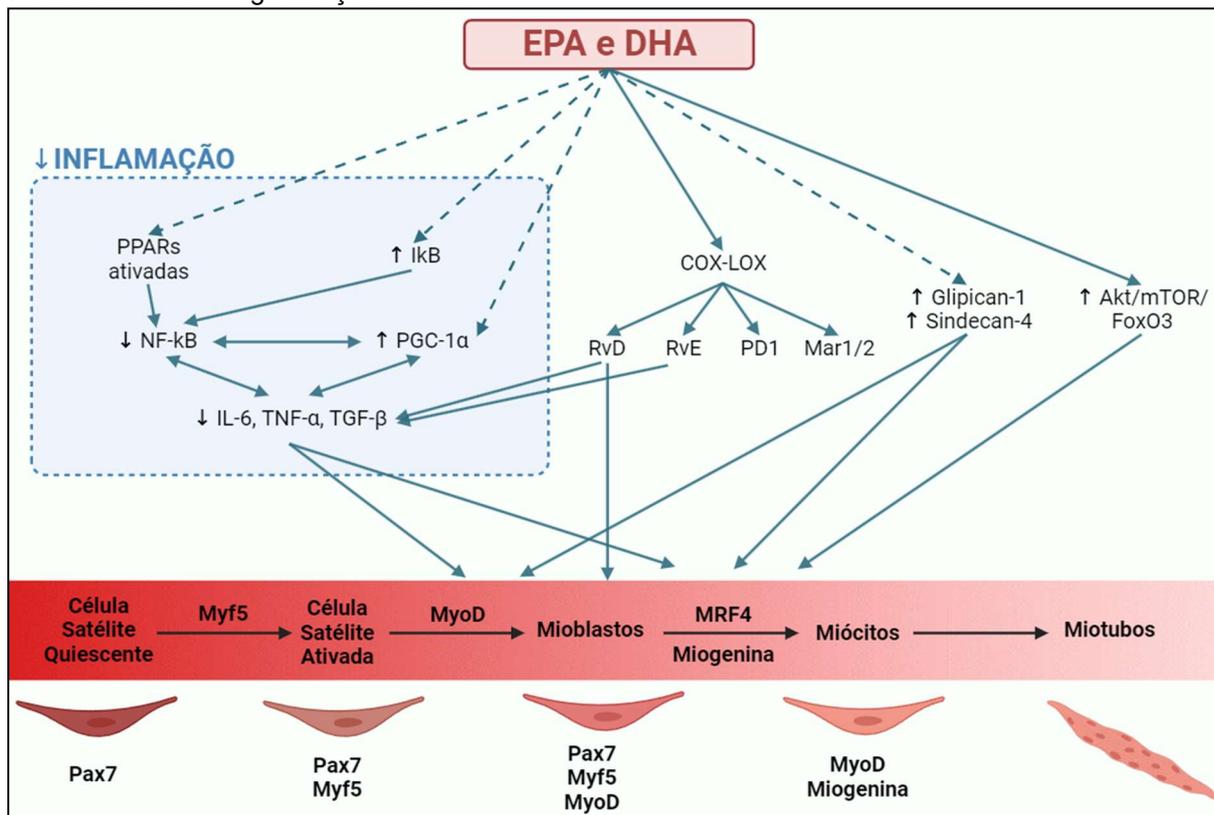
De modo semelhante, estudos já mostraram que protectinas e maresinas são importantes mediadores dos processos resolutivo da inflamação e regenerativo. A protectina D1 é capaz de atuar na regeneração epimórfica (ou seja, de apêndices teciduais inteiros) de *zebra fish*, enquanto a Protectina Conjugada na Regeneração Tecidual 1 (PCTR1) também já demonstrou importante papel na manutenção da

homeostasia tecidual, restaurando a atividade de células endoteliais do pulmão, pela regulação de vias do NF-kB (WANG, 2020; NGUYEN-CHI, 2020). Outros mediadores originados da metabolização de EPA e DHA, também conjugados com sulfídios, já foram relacionados ainda com aceleração do processo regenerativo em modelos invertebrados (ISHIHARA, 2019; SERHAN, 2012).

Por fim, EPA e DHA já foram associados também com aumento da presença dos proteoglicanos Glipican-1 e Sindecan-4 (Bhullar, 2019). Esses dois proteoglicanos de heparan sulfato são relacionadas com a proliferação e adesão celular, tendo um importante papel na expressão de outros fatores de diferenciação e comprometimento miogênico (Bhullar, 2019). O Sindecan-4 é necessário na ativação e proliferação das células-satélites, alterando também a expressão dos fatores de diferenciação miogênico 1 (MyoD) e regulatório miogênico 4 (MRF4), permitindo a diferenciação das células satélites em mioblastos e dos mioblastos em miócitos (Bhullar, 2019) (Figura 4). Por outro lado, o *knockdown* de glipican-1 inibe a diferenciação celular, sendo associado com menor expressão de miogenina – um importante marcador presente em miócitos (Gutiérrez, 2009).

Assim, não é surpreendente que a suplementação com OP tenha sido relacionada com casos de melhora regenerativa em diversos tecidos: hepático (FIRRAT, 2017; YANG, 2019; IBRAHIM, 2016); ósseo (ROUT, 2018; JIANG, 2022; HUANG, 2020); nervoso (HE, 2010; SILVA, 2017); e muscular (SAINI, 2017; DORT, 2021). Contudo, apesar de já ser bem estabelecida a melhora regenerativa no tecido hepático e nervoso, ainda é discutível a extensão desses efeitos em outros tecidos do aparelho locomotor (SMITH, 2018; MCGLORY, 2019). No contexto dos músculos, a ambiguidade surge devido à considerável variação na dosagem e na proporção de EPA e DHA administradas em diferentes estudos, afetando a expressão de miocinas cruciais para a regeneração (MCGLORY, 2019) (Figura 4).

Figura 4: Metabólitos e proteínas influenciados direta e indiretamente pela suplementação com ômega-3 associados com regeneração muscular.



Fonte: O Autor (2023). Legenda: A atividade regenerativa dos ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) sobre o músculo estriado esquelético é observado pela modulação de vias de quinases, como a via da Proteína Quinase B (Akt) / Proteína Alvo da Rapamicina (mTOR) / Fator de Transcrição *Forkhead O3* (FOXO3), aumentando a presença do Fator Regulatório Muscular 4 (MRF4) e miogenina – ambos importantes reguladores da formação de miócitos a partir de mioblastos. A ação das proteínas Glipican-1 e Sindecin-4 é similar, além de influenciarem também o fator de diferenciação miogênica 1 (MyoD), fundamental para a diferenciação de células satélites ativadas em mioblastos. Outro importante fator para a regulação dessas proteínas miogênicas é a diminuição da inflamação, tanto pela produção de resolvinas E e D via COX quanto pela ativação de PPARs e Quinases Inibitórias de Kappa B (IκB), diminuindo em última instância a presença de IL-6, TNFα e TGF-β. Ainda não se sabe se há efeitos do EPA e DHA sobre outros marcadores e fatores da diferenciação miogênica, como a proteína Pax7 e o fator miogênico 5 (Myf5).

2.4 OBJETIVOS

Objetivo Geral: Analisar os efeitos da suplementação, crônica, com óleo de peixe, rico em AGPI-n3, na morfologia do músculo esquelético no processo de regeneração durante o envelhecimento.

Objetivos Específicos:

- Identificar em ratos *Wistar* aos 9, 12 e 15 meses de idade, a resposta ao teste de tolerância à glicose intraperitoneal.
- Avaliar a resposta ao teste de tolerância à glicose intraperitoneal após a suplementação crônica com óleo de peixe.
- Mensurar as mudanças histomorfométricas do músculo plantar de ratos *Wistar*, após a suplementação crônica com óleo de peixe.

3 METODOLOGIA

3.1 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Para este estudo foram utilizados 24 ratos da linhagem *Wistar*, obtidos e mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em ambiente controlado, com fotoperíodo de 12h em ciclo claro/escuro invertido, temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e água e ração Nuvilab® *ad libitum*. Todos os procedimentos adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal do Paraná (CEUA-BIO/UFPR), (certificado número 1497) e seguiram os padrões éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 TESTE DE TOLERÂNCIA INTRAPERITONEAL À GLICOSE

O Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal (ipGTT) foi realizado aos 9, 12 e 15 meses de idade. Essas idades em ratos têm sido descritas como àquelas entre 30 e 40 anos de humanos e há evidências de surgimento da intolerância à glicose em estudos anteriores (GÓMEZ-PÉREZ, 2011; NARIMIYA et al., 1984). Neste teste, os animais foram aclimatados antes da mensuração da glicemia basal pela veia caudal, momento em que a ração foi retirada de suas caixas. Após a observação da glicemia basal, foi administrado 1 mL/kg de uma solução de 2 g/mL de glicose via intraperitoneal nos animais. Após a injeção, a glicemia dos animais foi mensurada novamente aos 5, 15, 30 e 60 minutos.

Após a identificação da alteração da tolerância à glicose, observado aos 12 meses de idade, os animais foram randomizados em dois grupos experimentais: Grupo controle (C), constituído por animais alimentados somente com ração padrão

de biotério (n = 12) e grupo suplementado (OP), constituído por animais alimentados com ração padrão e suplementados diariamente (por 60 dias) com 1,0 g/kg de óleo de peixe (Fitoprime), contendo 180 mg de EPA e 120 mg de DHA. A administração do volume de óleo de peixe correspondente ao peso de cada animal ocorreu via oral com o auxílio de micropipeta de volume regulável.

Após a suplementação dos animais entre os 12 meses e 2 semanas de idade até os 14 meses e 2 semanas, estes foram submetidos a um novo ipGTT para observar os efeitos da suplementação sobre a captação de glicose.

3.3 EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS

Após a suplementação e realização do ipGTT aos 15 meses de idade, metade dos animais de cada grupo foram eutanasiados. Foi dissecado o músculo plantar de ambos os membros pélvicos dos animais, uma vez que este músculo apresenta um perfil misto de população de fibras que permite avaliar os efeitos da suplementação tanto em fibras glicolíticas quanto oxidativas (ARMSTRONG, PHELPS, 1984).

Após a dissecação do músculo plantar, foi realizada a morfometria para obtenção do comprimento, largura, massa e volume. Em seguida, as amostras do músculo plantar foram crioprotégidas com talco neutro e congeladas instantaneamente com nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até o momento da obtenção de cortes histológicos em micrótomo por congelamento.

3.4 COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA-EOSINA

Cortes histológicos transversais de 10 µm do músculo plantar foram obtidos em criostato Leica ® 1850 e mantidos a -20°C até o momento das colorações. Para a coloração utilizando Hematoxila e Eosina (HE), as lâminas foram retiradas do freezer e deixadas em temperatura ambiente por meia hora. Após esse período, o material foi fixado por 5 minutos em solução de cloreto de sódio 2%, acetato de cálcio 1% e formaldeído 4%. A seguir procedeu-se a coloração das lâminas em Hematoxilina de Harrys e Eosina (H&E). Após estarem corados, os cortes foram desidratados em gradiente crescente de álcool etílico (70% à 100% v/v), diafanizados em xilol e para a confecção da lâmina permanente usou-se Entellan ®.

3.5 REAÇÃO DE NADH-TR

Para a realização deste ensaio, as lâminas foram retiradas do freezer -20°C e deixadas em temperatura ambiente por meia hora, quando então os cortes histológicos foram incubados em tampão Tris 0,2M contendo NADH (5 mg/5 mL, Sigma ®) e NBT (4 mg/5 mL, Sigma ®). Os cortes foram incubados a 37°C por 35 minutos e, em seguida, lavados em água destilada e fixados por 5 minutos (solução de cloreto de sódio 2%, acetato de cálcio 1% e formaldeído 4%). Por fim, os cortes foram desidratados em um gradiente crescente de álcool etílico (70% à 100% v/v), e diafanizados em xilol para a confecção da lâmina permanente.

A reação histo-enzimológica de NADH-TR permitiu diferenciar fibras dos tipos oxidativa (tipo I), glicolítica-oxidativa (tipo IIA) ou glicolítica (tipo IIB) através da redução de sais solúveis de tetrazólio em sais insolúveis de trifetil-formazana devido à atividade mitocondrial (ROBIN & SULLIVAN, 2019).

3.6 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio de luz (*Zeiss Primo Star*) e analisadas no *Image Pro Plus 6.0*. Nas lâminas coradas em HE, foram avaliadas a área de secção transversal, a densidade celular, capilar por fibra, núcleo por fibra e núcleo central por fibra de dez campos do músculo em aumento de 400x. Com as lâminas obtidas pela técnica NADH-TR, calculou-se a proporção dos tipos de fibras e foi medida a área de secção transversal de cada fibra.

Esses dados do NADH-TR, juntamente com os dados do H&E, foram utilizados para o cálculo do domínio mionuclear:

$$\text{domínio mionuclear} = \frac{NF}{CSA} \quad (1)$$

onde NF representa os núcleos por fibra e CSA representa a área média ponderada das fibras. Em seguida, será calculado também a razão núcleo/fibra:

$$\text{razão} = \text{domínio mionuclear} * CSAn \quad (2)$$

onde CSAn é a área nuclear média.

3.7 ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o *RStudio* versão 4.3.1 para Windows. Os dados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo Teste de Shapiro-Wilk e homocedasticidade pelo Teste de Bartlett. Após a confirmação da hipótese nula destes testes, prosseguiu-se com a análise estatística com o Teste t de *Student* ou pelo Teste de *Wilcoxon* quando não confirmada a normalidade.

A análise da curva do Teste de Tolerância intraperitoneal à Glicose foi por Anova de Medidas Repetidas, com teste *post-hoc* de Tukey. A análise da Área sob a Curva (AUC) foi teste Anova ao comparar os grupos não suplementados de 9, 12 e 15 meses e teste t de *Student* ao comparar o grupo C e OP aos 15 meses.

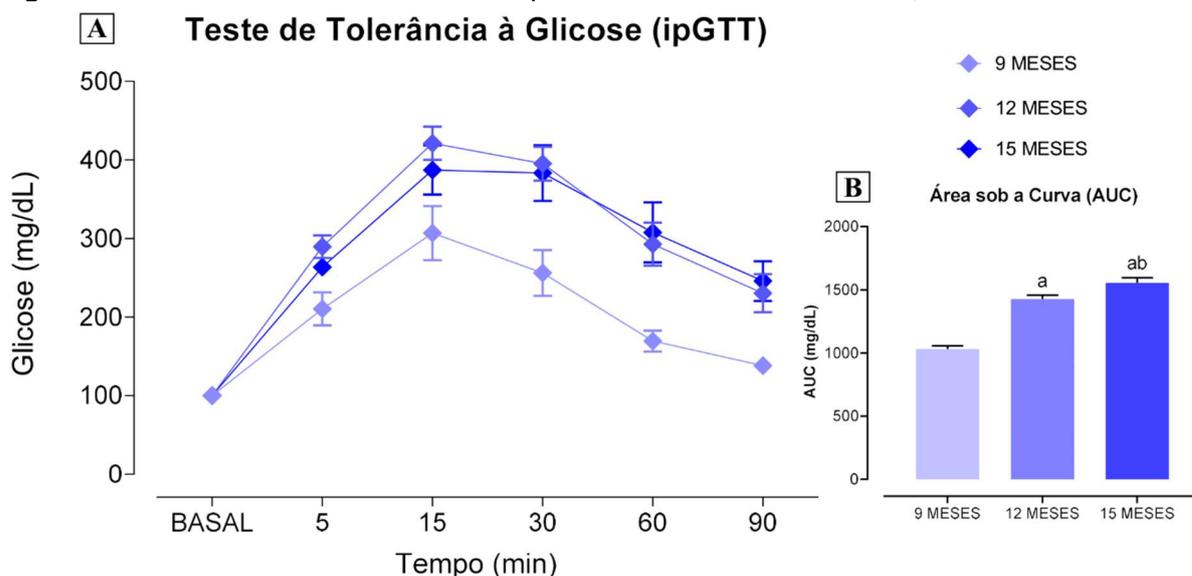
4 RESULTADOS

4.1 INTOLERÂNCIA À GLICOSE SE APRESENTA EM RATOS *WISTAR* A PARTIR DOS 12 MESES DE IDADE

A Figura 5 mostra os resultados do ipGTT com ratos de 9, 12 e 15 meses de idade. A concentração de glicose nos animais de 9 meses apresentou um pico de aproximadamente 300 mg/dL após 15 minutos da injeção intraperitoneal de glicose. Já nos animais com 12 meses, houve um pico 33% maior de glicemia, atingindo aproximadamente 400 mg/dL e levando mais tempo para diminuir, demonstrando redução na captação de glicose nos tecidos periféricos nesta idade. Essa redução da captação de glicose é visível também aos 15 meses quando comparado aos animais de 9 meses (Figura 5A).

A visualização da diferença entre os três grupos é corroborada pela análise da Área sob a Curva (AUC) do ipGTT dos animais, com uma diferença ($p < 0,05$) entre a área dos animais de 12 e 15 meses quando comparado aos animais de 9 meses e entre a área dos animais de 15 meses quando comparado aos animais de 12 meses (Figura 5B).

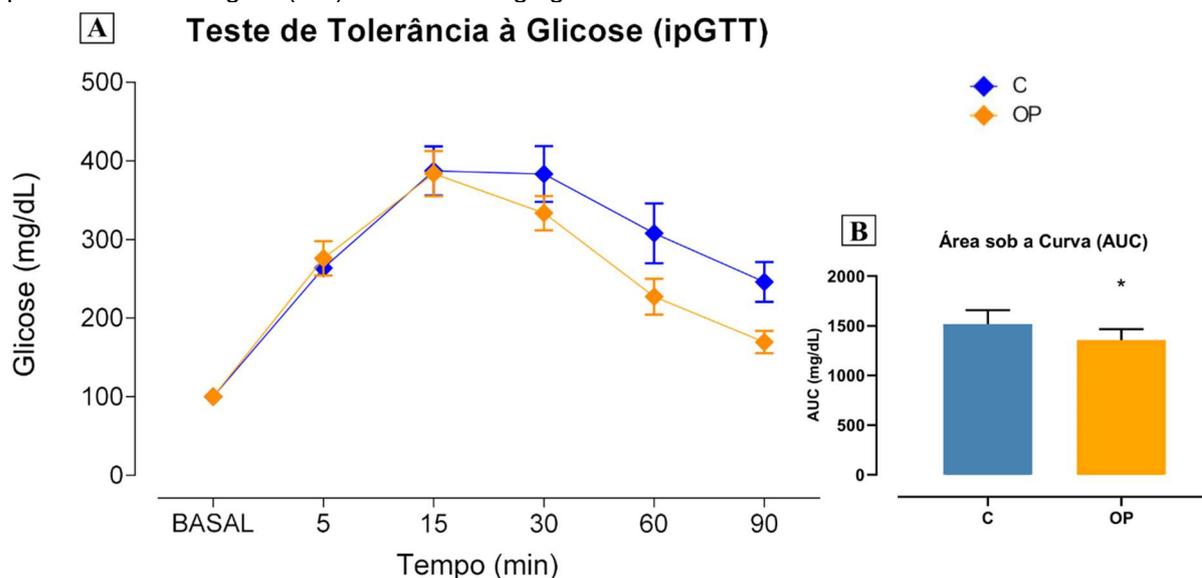
Figura 5: Teste de Tolerância à Glicose intraperitoneal em ratos Wistar aos 9, 12 e 15 meses de idade.



Legenda: (A) Gráfico de linhas do Teste de Tolerância à Glicose (ipGTT) de ratos *Wistar* aos 9, 12 e 15 meses de idade após a administração intraperitoneal de 1 mL/kg de uma solução hipersaturada de glicose (2 g/mL) obtidos dos animais do grupo controle (C) e óleo de peixe (OP). (B) Área sob a curva (AUC) do GTT dos ratos *Wistar* aos 9, 12 e 15 meses de idade. (A) nova de Medidas Repetidas com teste *post-hoc* de Tukey; (B) ANOVA de uma via com teste *post-hoc* de Tukey. (a) $p < 0,05$ vs. 9 meses; (b) $p < 0,05$ vs. 12 meses.

Na figura 6A está apresentado o resultado do ipGTT nos animais de 15 meses, suplementados ou não com óleo de peixe. A suplementação com OP foi iniciada logo após o início da detecção dessa alteração metabólica, e perdurou por 60 dias. Os resultados mostram que animais suplementados com óleo de peixe (OP) a partir dos 30 minutos tem melhor resposta glicêmica quando comparados aos não suplementados ($p < 0,05$ vs. C). A área sob a curva (Figura 6B) reflete isso com mais precisão ($p < 0,05$).

Figura 6: Teste de Tolerância à Glicose em ratos Wistar controle (C) e suplementados com óleo de peixe rico em ômega-3 (OP) na dose de 1 g/kg

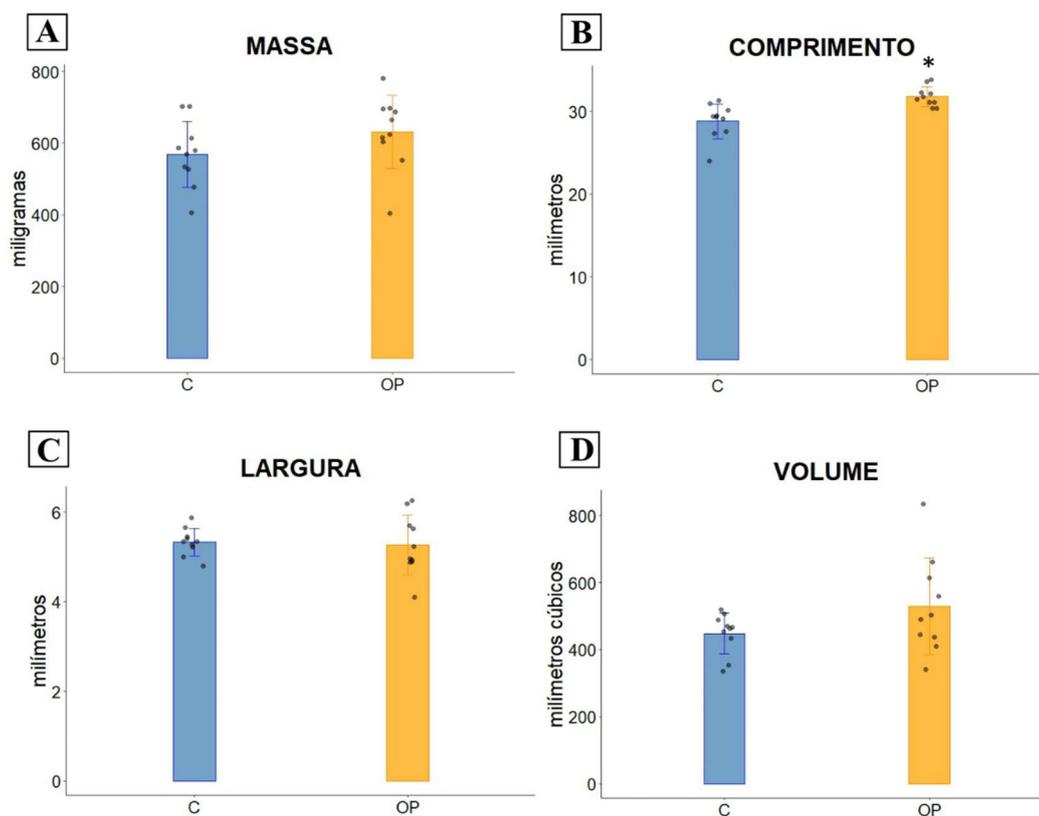


Legenda: (A) Gráfico de linhas do Teste de Tolerância à Glicose (ipGTT) de ratos *Wistar* dos grupos controle (C) e óleo de peixe (OP), aos 15 meses de idade após a administração intraperitoneal de 1 mL/kg de uma solução hipersaturada de glicose (2 g/mL). Anova de Medidas Repetidas com teste *post-hoc* de Tukey. (B) Área sob a curva (AUC) do ipGTT dos ratos *Wistar* dos grupos controle (C) e óleo de peixe (OP). Teste “t” de *Student*, (*) $p < 0,05$.

4.2 HISTOMORFOMETRIA DO MÚSCULO PLANTAR

Na figura 7 estão os resultados dos parâmetros morfométricos do músculo plantar. Em relação a massa do músculo plantar, não foi observada diferença significativa entre as médias das massas dos animais do grupo C (569 ± 230 mg) e OP (631 ± 128 mg) ($p=0,17$). Também não houve diferenças nas médias das larguras ($p=0,68$) dos grupos C ($5,33 \pm 0,3$ mm) e OP ($5,27 \pm 0,7$ mm) ou no volume ($p=0,28$) dos grupos C (448 ± 61 mm³) e OP (529 ± 144 mm³). Contudo, houve diferença significativa ($p < 0,01$) no comprimento do músculo plantar dos animais do grupo OP (32 ± 1 mm) quando comparado com o dos animais do grupo C (29 ± 2 mm) (Figura 7).

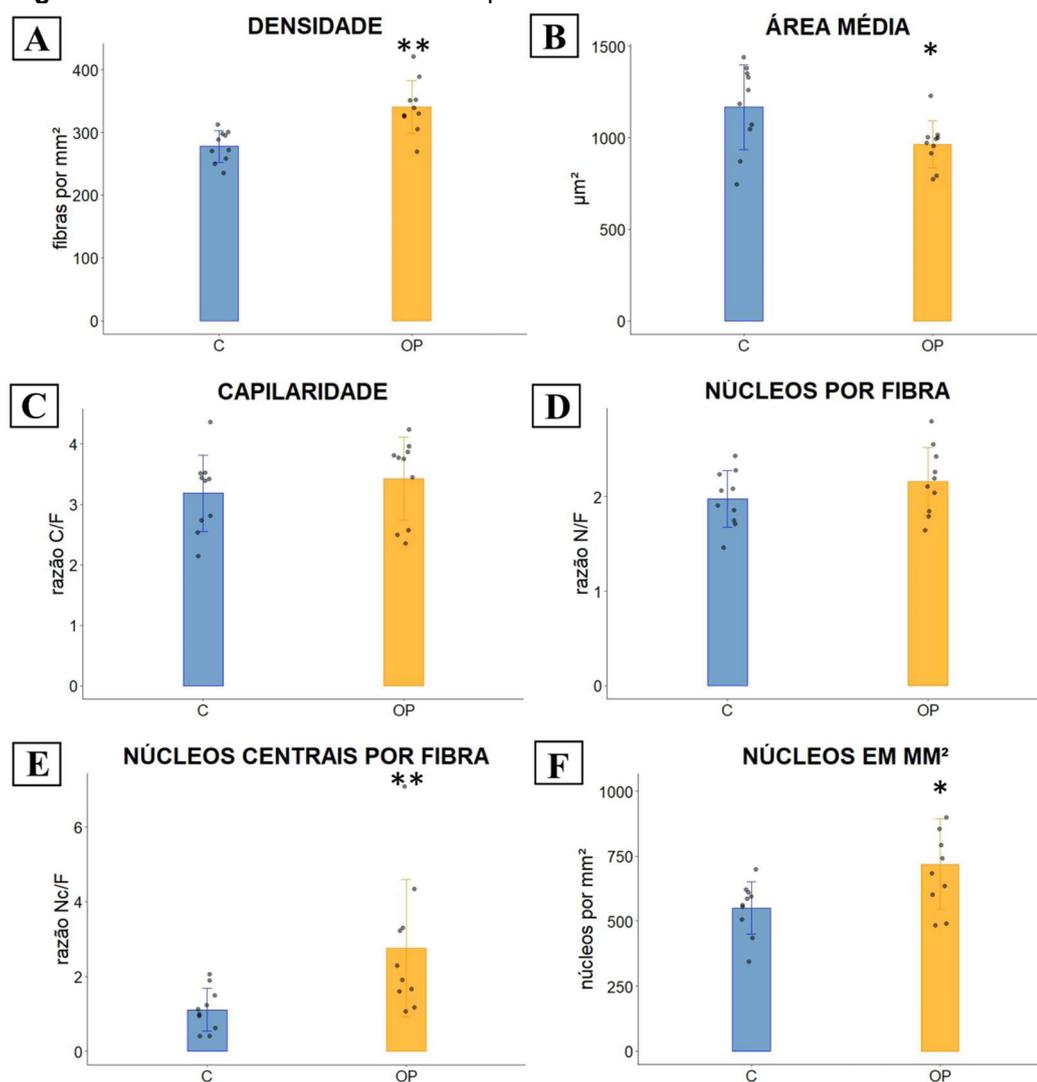
Figura 7: Morfometria do músculo plantar de ratos Wistar aos 15 meses de idade.



Legenda: Gráficos *boxplot* de: (A) massa do músculo plantar em miligramas; (B) comprimento do músculo plantar em milímetros; (C) largura do músculo plantar em milímetros; (D) volume do músculo plantar em milímetros cúbicos obtidos dos ratos do grupo controle (C) e óleo de peixe (OP). (*) $p < 0,05$.

Na histomorfometria, a análise da densidade de fibras apresentou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,01$) (Figura 8). Os animais suplementados com OP apresentaram densidade média de 340 ± 25 fibras por mm^2 quando comparados com 278 ± 42 fibras por mm^2 dos animais controle, o que representa aumento de 22% na densidade de fibras do grupo OP. Esses resultados são corroborados pela redução da área de secção transversa média ($p < 0,05$) das fibras do grupo OP ($964 \pm 128 \mu\text{m}^2$) quando comparada com a do grupo C ($1167 \pm 231 \mu\text{m}^2$).

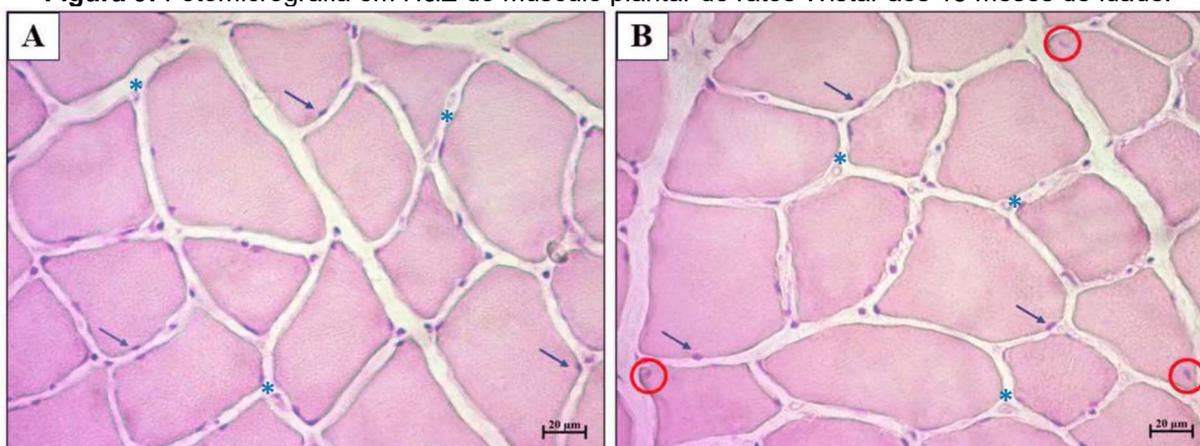
Figura 8: Histomorfometria do músculo plantar de ratos Wistar aos 15 meses de idade.



Legenda: (A) Gráfico *boxplot* da densidade de fibras em mm². (B) Gráfico *boxplot* de capilar por fibra. (C) Gráfico *boxplot* de núcleo por fibra. (D) Gráfico *boxplot* de núcleos por fibra. (E) Gráfico *boxplot* de núcleos centrais por fibra. (F) Gráfico *boxplot* de núcleos em mm². Legenda: C para ratos controle, OP para ratos suplementados com óleo de peixe rico em ômega-3 na dose de 1,0 g/kg. (*) p < 0,05; (**) p < 0,01.

Com relação ao número de capilares e núcleos por fibra, não foi observada diferença entre os grupos C e OP. Entretanto foi observado aumento de 146% no número de núcleos centrais (p<0,01) no grupo OP (2,76±1,84) quando comparado ao grupo C (1,12±0,57) (Figura 8 e Figura 9). Ainda, foi observada diferença significativa (p<0,05) no total de núcleos por mm² do músculo plantar nos animais do grupo OP (719±175) quando comparado ao grupo C (550±101).

Figura 9: Fotomicrografia em H&E do músculo plantar de ratos Wistar aos 15 meses de idade.



Legenda: Alterações histomorfométricas do grupo controle (A) e do grupo suplementado (B) com óleo de peixe. Aumento de 400 vezes. Legenda: capilares sanguíneos (asteriscos), núcleos periféricos (setas) e núcleos centrais em etapa de dispersão (círculos) para a periferia da fibra.

4.3 TIPOS DE FIBRAS

A Tabela 1 e a figura 10 mostram as proporções e as áreas dos diferentes tipos de fibra do músculo plantar, analisadas pela reação de NADH-TR (Figura 11). Houve diferença significativa entre os grupos na mensuração da área de secção transversa das fibras do tipo I ($p < 0,05$), tipo IIA ($p < 0,01$) e IIB ($p < 0,01$) do músculo plantar, com redução de 17% para fibras do tipo I ($1231 \pm 305 \mu\text{m}^2$), de 20% para fibras do tipo IIA ($2241 \pm 347 \mu\text{m}^2$) e 19% para fibras do tipo IIB ($3719 \pm 457 \mu\text{m}^2$) quando comparado com as fibras do tipo I ($1483 \pm 204 \mu\text{m}^2$), IIA ($2810 \pm 474 \mu\text{m}^2$) e IIB ($4597 \pm 722 \mu\text{m}^2$) do grupo C.

Com relação à proporção dos diferentes tipos de fibras, identificamos que não houve alteração na proporção das fibras tipo I e IIA, entretanto nas fibras IIB houve aumento de 6% no grupo OP ($48 \pm 3\%$) em relação ao grupo C ($51 \pm 2\%$) (Tabela 1). O percentual de diferença das proporções e áreas de cada população de fibra entre os grupos C e OP pode ser observada ainda no gráfico de radar (Figura 10C), onde os valores do grupo C foram normalizados como 100% para permitir a visualização do aumento ou diminuição dos valores de cada parâmetro pela suplementação.

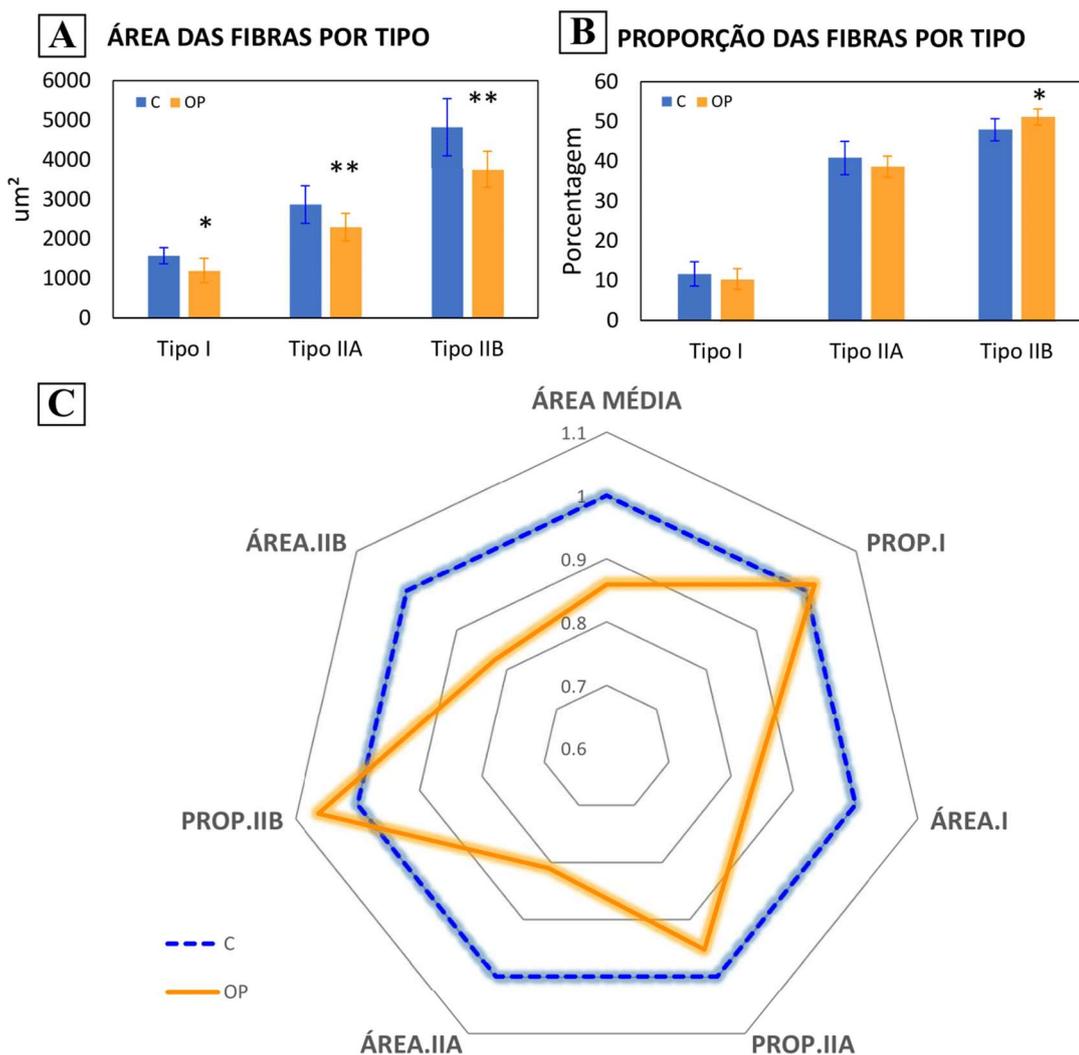
Tabela 1. Área e proporção de fibras do tipo I, IIA e IIB no músculo plantar de ratos *Wistar* aos 15 meses.

Fibras	Proporção (%)		Área (μm^2)	
	C	OP	C	OP
Tipo I	12 \pm 3	11 \pm 3	1483 \pm 204	1232 \pm 305*
Tipo IIA	40 \pm 4	38 \pm 3	2810 \pm 474	2241 \pm 347**
Tipo IIB	48 \pm 3	51 \pm 2*	4597 \pm 722	3719 \pm 457**

Legenda: C para ratos controle, OP para ratos suplementados com óleo de peixe.
 Teste t de *Student*. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

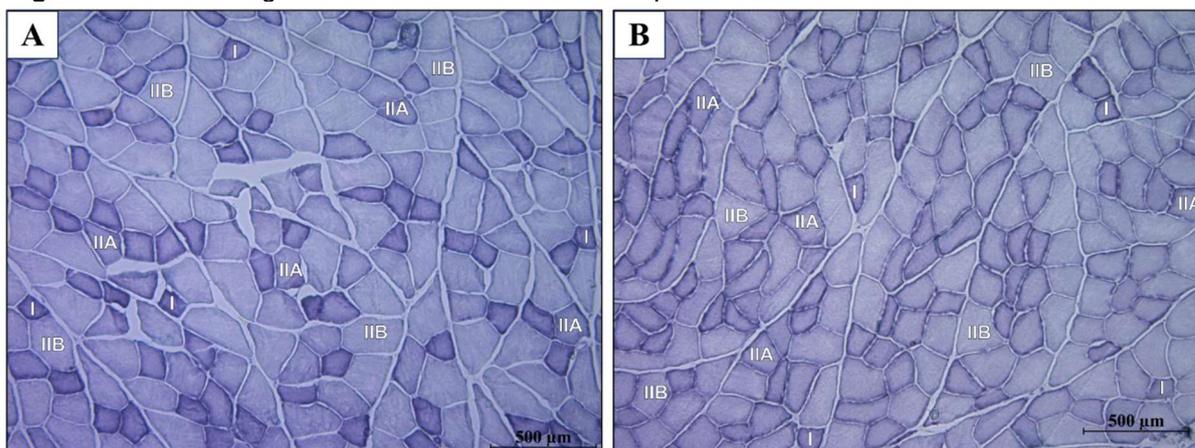
Na análise do domínio mionuclear, foi possível identificar que no grupo OP houve redução de 32% no domínio mionuclear ($456\pm 97 \mu\text{m}^2$) quando comparado ao grupo C ($601\pm 153 \mu\text{m}^2$) ($p\leq 0,05$). Já para a razão de área nuclear por área de fibra, no entanto, não foi identificada diferença entre os grupos (C= 0.019, OP = 0.022 e $p=0.18$).

Figura 10: Área e proporção de fibras do músculo plantar de ratos *Wistar* aos 15 meses.



Legenda: (A) Área das fibras em μm^2 por tipo de fibra. (B) Proporção das fibras em porcentagem por tipo de fibra. (C) Gráfico em radar para facilitar a visualização do percentual de variação dos parâmetros de área de fibras do tipo oxidativa (ÁREA.I), glicolítica-oxidativa (ÁREA.IIA) e glicolítica (ÁREA.IIB) e proporção de fibras do tipo oxidativa (PROP.I), glicolítica-oxidativa (PROP.IIA) e glicolítica (PROP.IIB) do grupo OP comparado ao grupo C. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

Figura 11: Fotomicrografia em NADH-TR do músculo plantar de ratos Wistar aos 15 meses de idade



Legenda: Populações de fibras oxidativas (I), fibras glicolítica-oxidativas (IIA) e fibras glicolíticas (IIB) do grupo controle (A) e do grupo suplementado (B) com óleo de peixe. Aumento de 100 vezes.

5 DISCUSSÃO

Estudos recentes demonstram que intervenções associadas com melhora no quadro de resistência à insulina estão correlacionadas com atenuação de diversos problemas do envelhecimento, como a inflamação e a falta de regeneração tecidual (LIU et al., 2022). De modo semelhante, nossos resultados com a suplementação com óleo de peixe, rico em AGPI n-3, demonstraram maior tolerância à glicose acompanhado de diversas alterações morfológicas, incluindo parâmetros associados com regeneração celular, quando comparado aos animais controle.

Nesse sentido, destaca-se o aumento expressivo na presença de núcleos centrais nas fibras dos animais OP quando comparado ao grupo C (Figura 9). A maior atividade nuclear pode ser causada tanto pela translocação de núcleos já periféricos para regiões danificadas da fibra a fim de remodelar miofibrilas e outras estruturas celulares, quanto pela integração de novos núcleos provenientes de células satélites à fibra muscular durante a regeneração tecidual (ROMAN; GOMES, 2018).

A possibilidade desses núcleos centrais se originarem principalmente da ativação e diferenciação de células satélites pode ser fortalecida ainda pelo aumento

de 24% no número total de núcleos por mm² de tecido no grupo OP quando comparado ao grupo C (Figura 8). Uma vez que as células musculares são pós-mitóticas, o aumento de núcleos pode ter uma possível explicação pela melhora da regeneração muscular, marcada pela ativação e incorporação de mais núcleos de células satélites à fibra, associada com a suplementação com AGPI-n3 (SCHMALBRUCH, 1976).

Esses resultados dos núcleos com a remodelação e regeneração celular é fortalecida ainda por outros dados histomorfométricos, como a densidade celular (Figura 8). A diminuição do tamanho das fibras, observado pela redução da área de secção transversa, é acompanhado de aumento do número de fibras por mm², mas sem alterações na massa muscular, indicando que o aumento de densidade não é resultante de atrofia muscular, mas sim de proliferação (SCHMALBRUCH, 1976).

Além disso, esses dados demonstram que a suplementação com OP não chegou a apresentar efeitos hipertróficos no músculo, condizendo com alguns estudos que observaram ganho de massa muscular apenas sob a sinergia da suplementação com OP e exercícios físicos (DAMANTI et al., 2019; SMITH, 2018). A ausência da hipertrofia com a suplementação com OP é corroborada também pela diminuição do domínio mionuclear. O domínio mionuclear representa a área da fibra sob influência direta de um mionúcleo, de modo que redução do domínio mionuclear está associado com maior quantidade de núcleos na fibra e é importante indicador de hipertrofia quando aumentado (ALLEN; ROY; REGGIE EDGERTON, 1999).

Apesar do aparente efeito proliferativo da suplementação com OP sobre o tecido muscular esquelético, observado pela maior densidade, não foi observado alterações no número de capilares. Esse resultado é condizente com estudos prévios que associaram a suplementação com OP e a redução de vias angiogênicas em tumores (MA et al., 2022; SZYMCZAK; MURRAY; PETROVIC, 2008). Entre os mecanismos já associados com essa redução da angiogênese tumoral, cita-se a supressão de angiopoietina-2 e a indução de prostaglandinas 3 (MA et al., 2022; SZYMCZAK; MURRAY; PETROVIC, 2008). Similarmente, AGPI-n3 também já foram associados com redução da neovascularização da retinopatia proliferativa, demonstrando que a ausência de resultados no número de capilares não se restringe apenas a casos de câncer (STAHL et al., 2010), e o mesmo foi visto nos resultados de capilarização do músculo plantar.

Finalmente, um dos fatores associado com o aumento da funcionalidade do músculo estriado esquelético pela suplementação com OP pode residir nas modificações no perfil da população de fibras. O envelhecimento muscular é marcado pela redução das fibras glicolíticas e aumento das fibras oxidativas, resultando em diminuição da força muscular com a idade (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011). Assim, ao avaliarmos a proporção de cada tipo de fibra, identificamos preservação da população glicolítica nos animais suplementados, potencialmente retardando a perda de força muscular associado com o envelhecimento (AKASAKI et al., 2014).

O aumento dessa população de fibras pode ser relacionado, possivelmente, com a melhora na captação de glicose pela suplementação com OP, uma vez que os AGPI-n3 atuam diretamente na modulação tanto da exposição de GLUT4 na superfície da membrana celular quanto em proteínas associadas com a sinalização da insulina (ZHANG et al., 2022). Esse resultado é compatível com estudos prévios, onde fibras glicolíticas foram as mais afetadas pela resistência periférica à insulina, já que apresentam menor capacidade de contrabalancear tais alterações metabólicas intracelulares (AKASAKI et al., 2014; WARREN et al., 2014).

Sucintamente, nossos resultados indicam melhora do quadro regenerativo no tecido muscular esquelético do grupo suplementado com OP desde o início do processo de envelhecimento aqui mensurado, refletido principalmente pela presença de núcleos centrais e pelo aumento da densidade de fibras sem perda de massa muscular. A suplementação com OP ajudou também na atenuação da resistência periférica à glicose dos animais, facilitando a manutenção da população de fibras glicolíticas. Sinalizamos nesse trabalho a busca para maior entendimento sobre os mecanismos e sinalizações moleculares envolvidos no efeito do OP sobre o músculo estriado esquelético.

6 CONCLUSÃO

Em suma, nossos dados apontam que a suplementação com OP pode ter importante papel retardando as mudanças que ocorrem no músculo estriado esquelético no início do processo de envelhecimento. Contudo, cabe ainda investigar a permanência desses efeitos da suplementação com óleo de peixe observadas em modelos animais e se o mesmo ocorre em humanos.

7 REFERÊNCIAS

- AKASAKI, Y. et al. Glycolytic fast-twitch muscle fiber restoration counters adverse age-related changes in body composition and metabolism. **Aging Cell**, v. 13, n. 1, p. 80–91, fev. 2014.
- ALBUQUERQUE-SOUZA, E. et al. Maresin-1 and Resolvin E1 Promote Regenerative Properties of Periodontal Ligament Stem Cells Under Inflammatory Conditions. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 25 set. 2020.
- ALLEN, D. L.; ROY, R. R.; REGGIE EDGERTON, V. Myonuclear Domains in Muscle Adaptation and Disease. **Muscle Nerve**, v. 22, p. 1350–1360, 1999.
- ANTUÑA, E. et al. Inflammaging: Implications in Sarcopenia. **International Journal of Molecular Sciences**. MDPI, , 1 dez. 2022.
- ARMSTRONG, R. B.; PHELPS, R. O. Muscle Fiber Type Composition of the Rat Hindlimb. **THE AMERICAN JOURNAL OF ANATOMY**, v. 171, p. 259–272, 1984.
- BHULLAR, A. S.; PUTMAN, C. T.; MAZURAK, V. C. Potential role of omega-3 fatty acids on the myogenic program of satellite cells. **Nutrition and Metabolic Insights**Libertas Academica Ltd., , 3 fev. 2016.
- CHEN, Y. et al. Reversible reprogramming of cardiomyocytes to a fetal state drives heart regeneration in mice. **Science**, v. 373, p. 1537–1540, 2021.
- CRUZ-JENTOFT, A. J.; SAYER, A. A. Sarcopenia. **The Lancet**Lancet Publishing Group, , 29 jun. 2019.
- DAMANTI, S. et al. Efficacy of nutritional interventions as stand-alone or synergistic treatments with exercise for the management of sarcopenia. **Nutrients**, v. 11, n. 9, 1 set. 2019.
- DAO, T. et al. Sarcopenia and muscle aging: A brief overview. **Endocrinology and Metabolism**Korean Endocrine Society, , 1 nov. 2020.
- DORT, J. et al. Resolvin-D2 targets myogenic cells and improves muscle regeneration in Duchenne muscular dystrophy. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2021.
- DUPONT, J. et al. The role of omega-3 in the prevention and treatment of sarcopenia. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 31, n. 6, p. 825–836, 1 jun. 2019.
- FIRAT, O. et al. Omega-3 fatty acids inhibit oxidative stress in a rat model of liver regeneration. **Annals of Surgical Treatment and Research**, v. 93, n. 1, p. 1–10, 1 jul. 2017.
- GIANNAKIS, N. et al. Dynamic changes to lipid mediators support transitions among macrophage subtypes during muscle regeneration. **Nature Immunology**, v. 20, n. 5, p. 626–636, 1 maio 2019.
- GÓMEZ-PÉREZ, Y. et al. Sex-Dependent Effects of High-Fat-Diet Feeding on Rat Pancreas Oxidative Stress. **Pancreas Journal**, v. 40, n. 5, p. 682–688, 2011.

GOUSPILLOU, G. et al. Increased sensitivity to mitochondrial permeability transition and myonuclear translocation of endonuclease G in atrophied muscle of physically active older humans. **FASEB Journal**, v. 28, n. 4, p. 1621–1633, 2014.

GUTIÉRREZ, J.; BRANDAN, E. A Novel Mechanism of Sequestering Fibroblast Growth Factor 2 by Glypican in Lipid Rafts, Allowing Skeletal Muscle Differentiation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 7, p. 1634–1649, 1 abr. 2010.

GUTIÉRREZ, S.; SVAHN, S. L.; JOHANSSON, M. E. Effects of omega-3 fatty acids on immune cells. **International Journal of Molecular Sciences**. MDPI AG, , 2 out. 2019.

HADDAD, F. et al. IL-6-induced skeletal muscle atrophy. **J Appl Physiol**, v. 98, p. 911–917, 2005.

HE, J.; BAZAN, H. E. P. Omega-3 fatty acids in dry eye and corneal nerve regeneration after refractive surgery. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 82, n. 4–6, p. 319–325, abr. 2010.

HUANG, R. et al. Maresin 1 resolves aged-associated macrophage inflammation to improve bone regeneration. **FASEB Journal**, v. 34, n. 10, p. 13521–13532, 1 out. 2020.

IBRAHIM, E. S. et al. Effect of omega-3 on hepatic regeneration in adult living donors undergoing hepatic resections for liver transplantation: A randomized controlled trial. **Journal of Critical Care**, v. 31, n. 1, p. 157–162, 1 fev. 2016.

ISHIHARA, T.; YOSHIDA, M.; ARITA, M. Omega-3 fatty acid-derived mediators that control inflammation and tissue homeostasis. **International Immunology** Oxford University Press, , 1 set. 2019.

JANNAS-VELA, S. et al. The Role of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Lipid Mediators on Skeletal Muscle Regeneration: A Narrative Review. **Nutrients** MDPI, , 1 fev. 2023.

JIANG, X. et al. The effect of resolvin D1 on bone regeneration in a rat calvarial defect model. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 16, n. 11, p. 987–997, 1 nov. 2022.

KIRK, B. et al. Aging muscle and sarcopenia. Em: **Encyclopedia of Biomedical Gerontology**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 120–131.

LALIA, A. Z. et al. Influence of omega-3 fatty acids on skeletal muscle protein metabolism and mitochondrial bioenergetics in older adults. **Aging US**, v. 9, n. 4, 2017.

LIU, B. et al. A stem cell aging framework, from mechanisms to interventions. **Cell Reports** Elsevier B.V., , 18 out. 2022.

LÓPEZ-OTÍN, C. et al. The hallmarks of aging. **Cell**, Elsevier B.V., , 6 jun. 2013.

MA, J. et al. ω -3 and ω -6 Polyunsaturated Fatty Acids Regulate the Proliferation, Invasion and Angiogenesis of Gastric Cancer Through COX/PGE Signaling Pathway. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 17 fev. 2022.

MARKWORTH, J. F. et al. Resolvin D1 supports skeletal myofiber regeneration via actions on myeloid and muscle stem cells. **JCI Insight**, v. 5, n. 18, 1 ago. 2020.

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, L. et al. Maresin 1 regulates insulin signaling in human adipocytes as well as in adipose tissue and muscle of lean and obese mice. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 167–173, 1 fev. 2021.

MCCORMICK, R.; VASILAKI, A. Age-related changes in skeletal muscle: changes to life-style as a therapy. **Biogerontology** Springer Science and Business Media B.V., , 1 dez. 2018.

MCGLORY, C.; CALDER, P. C.; NUNES, E. A. The Influence of Omega-3 Fatty Acids on Skeletal Muscle Protein Turnover in Health, Disuse, and Disease. **Frontiers in Nutrition** Frontiers Media S.A., , 6 set. 2019.

MESSA, G. A. M. et al. Morphological alterations of mouse skeletal muscles during early ageing are muscle specific. **Experimental Gerontology**, v. 125, 1 out. 2019.

MICKLEBOROUGH, T. D. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Physical Performance Optimization International. **Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.IJSNEM-Journal.com>.

NARIMIYA, M. et al. Insulin resistance in older rats. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v. 246, n. 5, p. 397–404, 1984.

NGUYEN-CHI, M. et al. Pro-resolving mediator protectin D1 promotes epimorphic regeneration by controlling immune cell function in vertebrates. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 17, p. 4055–4073, 1 set. 2020.

PAN, D. et al. Potential nutritional strategies to prevent and reverse sarcopenia in aging process: role of fish oil-derived ω -3 polyunsaturated fatty acids, wheat oligopeptide and their combined intervention. **Journal of Advanced Research**, abr. 2023.

REINDERS, I. et al. Plasma phospholipid PUFAs are associated with greater muscle and knee extension strength but not with changes in muscle parameters in older adults. **Journal of Nutrition**, v. 145, n. 1, p. 105–112, 2015.

J. ROBIN HIGHLEY ; SULLIVAN, Nicky. Neuropathology and muscle biopsy techniques. **Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques** (Eighth Edition), v. Eight, p. 306–336, 2019.

ROBINSON, S. M. et al. Does nutrition play a role in the prevention and management of sarcopenia? **Clinical Nutrition**, Churchill Livingstone, , 1 ago. 2018.

ROMAN, W.; GOMES, E. R. Nuclear positioning in skeletal muscle. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, Elsevier Ltd, , 1 out. 2018.

- RUSS, D. W. et al. Muscle-specificity of age-related changes in markers of autophagy and sphingolipid metabolism. **Biogerontology**, v. 16, n. 6, p. 747–759, 1 dez. 2015.
- SAINI, A. et al. Omega-3 fatty acid EPA improves regenerative capacity of mouse skeletal muscle cells exposed to saturated fat and inflammation. **Biogerontology**, v. 18, n. 1, p. 109–129, 1 fev. 2017.
- SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber Types In Mammalian Skeletal Muscles. **Physiol Rev**, v. 91, p. 1447–1531, 2011.
- SCHMALBRUCH, H. The Morphology of Regeneration of Skeletal Muscles in the Rat. **TISSUE & CELL**. [s.l.: s.n.].
- SENGUPTA, P. **The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's** **International Journal of Preventive Medicine**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.ijpm.ir>.
- SERHAN, C. N.; LEVY, B. D. Resolvins in inflammation: Emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. **Journal of Clinical Investigation** American Society for Clinical Investigation, , 2 jul. 2018.
- SILVA, R. V. et al. Long-chain omega-3 fatty acids supplementation accelerates nerve regeneration and prevents neuropathic pain behavior in mice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. OCT, 17 out. 2017.
- SMITH, G. I. **The Effects of Dietary Omega-3s on Muscle Composition and Quality in Older Adults**. **Current Nutrition Reports** Current Science Inc., , 1 jun. 2016.
- SMITH, G. I. Polyunsaturated omega-3 fatty acids and skeletal muscle. Em: **Nutrition and Skeletal Muscle**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 379–392.
- STAHL, A. et al. Short communication: PPAR γ mediates a direct antiangiogenic effect of ω 3-PUFAs in proliferative retinopathy. **Circulation Research**, v. 107, n. 4, p. 495–500, 20 ago. 2010.
- ROUT, S. K.; JIN, D. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on accelerating bone regeneration in mice. **Journal of Molecular Imaging**, v. 41, n. 3, p. 287–290, 2018.
- SZYMCZAK, M.; MURRAY, M.; PETROVIC, N. Modulation of angiogenesis by ω -3 polyunsaturated fatty acids is mediated by cyclooxygenases. **Blood**, v. 111, n. 7, p. 3514–3521, 1 abr. 2008.
- TAILLANDIER, D.; POLGE, C. Skeletal muscle atrogenes: From rodent models to human pathologies. **Biochimie** Elsevier B.V., , 1 nov. 2019.
- THERDYOTHIN, A.; PHIPHOPHATSANEE, N.; ISANEJAD, M. The Effect of Omega-3 Fatty Acids on Sarcopenia: Mechanism of Action and Potential Efficacy. **Marine drugs** NLM (Medline), , 1 jul. 2023.
- TIDBALL, J. G. et al. Aging of the immune system and impaired muscle regeneration: A failure of immunomodulation of adult myogenesis. **Experimental Gerontology**, v. 145, 1 mar. 2021.

VASCONCELOS, D. P. et al. Modulation of the inflammatory response to chitosan through M2 macrophage polarization using pro-resolution mediators. **Biomaterials**, v. 37, p. 116–123, 1 jan. 2015.

VOLPI, E.; NAZEMI, R.; FUJITA, S. Muscle tissue changes with aging. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 7, n. 4, p. 405–410, jul. 2004.

VON MALTZAHN, J. et al. Wnt signaling in myogenesis. **Trends in Cell Biology**, nov. 2012.

WANG, X. Y. et al. Protectin conjugates in tissue regeneration 1 restores lipopolysaccharide-induced pulmonary endothelial glycocalyx loss via ALX/SIRT1/NF-kappa B axis. **Respiratory Research**, v. 22, n. 1, 1 dez. 2021.

WARREN, B. E. et al. Early mitochondrial dysfunction in glycolytic muscle, but not oxidative muscle, of the fructose-fed insulin-resistant rat. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 306, p. 658–667, 2014.

WHO. **Ageing and health.**

YANG Y et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids prevent progression of liver fibrosis and promote liver regeneration after partial hepatectomy in cirrhotic rats. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 23, p. 10151–10160, 2019.

ZHANG, Y. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids promote SNAREs mediated GLUT4 vesicle docking and fusion. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 101, 1 mar. 2022.