

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

DANIELA DALPUBEL CAMPANARI

**Efeito da suplementação dietética com ácido graxo ômega-3 na resposta imunológica,
hepática e muscular de camundongos *knockout IL-10***

RIBEIRÃO PRETO

2024

DANIELA DALPUBEL CAMPANARI

**Efeito da suplementação dietética com ácido graxo ômega-3 na resposta imunológica,
hepática e muscular de camundongos *knockout IL-10***

Versão original

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Investigação Biomédica.

Orientação: Prof. Dr. Eduardo Ferrioli

RIBEIRÃO PRETO

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Campanari, Daniela Dalpubel

Efeito da suplementação dietética com ácido graxo ômega-3 na resposta imunológica, hepática e muscular de camundongos *knockout* IL-10.

Ribeirão Preto, 2024. 114 p.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Ferriolli, Eduardo.

1. Inflamação. 2. *IL-10*. 3. KO. 4. Estresse oxidativo. 5. Ômega 3. 6. n-3 PUFA.

CAMPANARI, DANIELA DALPUBEL. Efeito da suplementação dietética com ácido graxo ômega-3 na resposta imunológica, hepática e muscular de camundongos *knockout IL-10*. 2023. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Nome: CAMPANARI, Daniela Dalpubel

Título: Efeito da suplementação dietética com ácido graxo ômega-3 na resposta imunológica, hepática e muscular de camundongos *knockout IL-10*. 2023.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica para obtenção do título de Doutora em Investigação Biomédica.

Data da aprovação: _____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedico essa tese a todos que contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho, em especial ao meu marido Rafael, meu irmão Bruno e aos meus pais, Danillo e Maria Terezinha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais Danillo e Maria Terezinha, que sempre fizeram dos meus sonhos os deles também, por acreditar em mim até mesmo quando eu não acreditava e me apoiar incondicionalmente. Agradeço de todo o meu coração.

Agradeço ao meu irmão Bruno pela amizade, conforto e carinho. Sem você minha caminhada não seria tão incrível, cheia de vida e risadas.

Agradeço ao meu marido Rafael, pelos momentos incríveis, por algumas vezes renunciar aos seus objetivos para seguir os meus e pelos momentos de instabilidade que me ofereceu um porto seguro, me apoiando e me incentivando, fazendo com que essa caminhada fosse possível.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Eduardo Ferriolli, pela orientação, conhecimento transmitido, oportunidade e suporte para que esse trabalho fosse possível.

Agradeço aos meus colegas de pós-graduação, Roberta Taveira, Meire Gallo, Olga Almeida, Thiago Neves, Karina Pfrimer e Natalia Maíra, por todo o aprendizado, amizade e companheirismo.

Agradeço a Prof. Dra. Vania Bonato por abrir as portas do seu laboratório, pela parceria, paciência e por tantos ensinamentos, sem essa oportunidade não conseguiria desenvolver o meu projeto e agradeço a todos do laboratório, em especial ao Giseli Correa, Ana Flávia, Michael Boko e Sabrina Martins

Agradeço imensamente aos meus amigos Ualter Cipriano e Thaís Fraga, por tanto conhecimento, amizade e paciência. Nunca mediram esforços para me ajudar e me ensinar nesses anos de doutorado.

Agradeço aos meus amigos Paulo Giusti Rossi, Érica Nestor, Gabriela Gesualdo e Nathália Oliveira, pelas amizades tão valiosas que fizeram toda diferença em momentos difíceis.

Agradeço ao laboratório do prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior pelo conhecimento compartilhado e pela parceria que fizeram diferença nos resultados desse trabalho.

Agradeço ao laboratório do prof. Dr. Dennys Esper Correa Cintra, por me auxiliar e me ensinar no preparo das rações.

Agradeço ao laboratório do prof. Dr. Luiz Carlos Navegante pelo conhecimento.

Agradeço ao apoio técnico e a amizade da Ms. Paula Pavão Ovidio, pela vivência e apoio durante alguns experimentos.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica e a Universidade de São Paulo pela oportunidade.

Agradeço ao secretário da Pós-Graduação do Departamento de Clínica Médica, Emerson Quirino de Oliveira pela dedicação e paciência.

Agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento desta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Otimista por natureza, sempre achei que
problemas, os mais difíceis, terminam por serem
resolvidos.”*
(Zélia Gattai)

*“O sonho é que leva a gente para a frente. Se a
gente for seguir a razão, fica aquietado,
acomodado.”*
(Ariano Suassuna)

*“O que a literatura faz é o mesmo que acender
um fósforo no campo no meio da noite. Um
fósforo não ilumina quase nada, mas nos permite
ver quanta escuridão existe ao redor.”*
(William Faulkner)

RESUMO

CAMPANARI, D. D. **Efeito da suplementação dietética com ácido graxo ômega-3 na resposta imunológica, hepática e muscular de camundongos *knockout IL-10***. 2023. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O envelhecimento acarreta diversas mudanças dinâmicas e complexas que estão associadas com o acúmulo de danos, principalmente moleculares, levando a declínios progressivos das reservas fisiológicas. A inflamação crônica de baixo grau é considerada uma causa importante nessas mudanças. Ela está interligada a diversas doenças relacionadas à idade avançada, atuando diretamente no sistema músculo esquelético e é considerada como base no processo fisiopatológico de outras enfermidades. Há evidências de que ácidos graxos ômega-3 podem ser um potencial agente terapêutico para a prevenção e tratamento de doenças inflamatórias, além de reduzir o risco de doenças cardiovasculares e auxiliar no ganho de massa muscular, características presentes no envelhecimento. Portanto, encontrar caminhos comuns para esses temas é de grande importância para novas intervenções com resultados mais precisos. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar a eficácia da suplementação com óleo de peixe ômega-3 na melhora da resposta imunológica, hepática e muscular em camundongos *knockouts* para interleucina *IL-10* (*KOIL-10*), que mimetizam a inflamação crônica de baixo grau, característica presente no envelhecimento. Materiais e métodos: camundongos fêmeas C57BL/6 tipo selvagem (WT) e knockout para interleucina IL-10 ($IL-10^{-/-}$) foram divididos em grupos controle, que receberam dieta normolipídica, e grupos ômega 3, que receberam dieta com adição de 10% de ácido graxo poliinsaturado ômega 3, ambas as condições submetidas a 90 dias. Tecido muscular, hepático, intestinal e linfonodos mesentérico foram coletados para análise. Ao final do experimento, o grupo $IL-10^{-/-}+O3$ demonstrou maior ganho de peso em comparação aos grupos WT ($p=0,036$) e WT+O3 ($p=0,001$). Na avaliação de células T reguladoras para FOXP3, houve maior expressão nos grupos $IL-10^{-/-}+O3$ quando comparado ao grupo $IL-10^{-/-}$ ($p=0,001$). Verificou-se que os animais do grupo $IL-10^{-/-}+O3$ apresentaram menores níveis de esteatose quando comparados ao grupo $IL-10^{-/-}$ ($p=0,017$). Houve maior atividade de vitamina E no grupo WT comparado ao grupo $IL-10^{-/-}+O3$ ($p=0,001$) e WT+O3 comparado ao $IL-10^{-/-}+O3$ ($p=0,002$) e quando analisado marcador de estresse oxidativo MDA, foi encontrado aumento na peroxidação lipídica no grupo $IL-10^{-/-}+O3$ quando comparado ao grupo $IL-10^{-/-}$ ($p=0,03$). A histologia do tecido muscular mostrou diminuição das fibras

musculares nos grupos IL-10^{-/-}+O3, IL-10^{-/-} e WT+O3. Em conclusão, os resultados indicam uma diminuição da inflamação e menores níveis de esteatose hepática em animais KOIL-10^{-/-} após suplementação. Entretanto, foram observados aumento simultâneos dos marcadores de estresse oxidativo e diminuição dos marcadores antioxidantes no tecido hepático, esses dados sugerem que o uso da suplementação com ômega 3 possui ação positiva no processo inflamatório ao mesmo tempo que leva a um provável desequilíbrio entre a geração de composto oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidantes.

Palavras-chaves: Inflamação. *IL-10* KO. Estresse oxidativo. Ômega 3. n-3 PUFA.

ABSTRACT

DALPUBEL, D. D. **Effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acid on the immune and muscle response of *IL-10* knockout mice. 2023.** Thesis. (Departamento de Pós-graduação em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

The aging process brings several dynamic and complex changes that are associated with the accumulation of damage, mainly molecular, leading to progressive declines in physiological reserves. Chronic low-grade inflammation is considered an important cause of these changes, is linked to several diseases related to advanced age, causes damage to different systems, acts directly on the musculoskeletal system, and is considered the basis for the pathophysiological process of other diseases. There is evidence that omega-3 fatty acids can be a potential therapeutic agent for the prevention and treatment of inflammatory diseases, in addition to reducing the risk of cardiovascular disease and helping to gain muscle mass, characteristics present in aging. Therefore, finding common paths for these themes is of great importance for new interventions with more precise results. The aim of the present study was to investigate the efficacy of supplementation with omega-3 fish oil in improving the immune, hepatic and muscular response in knockout mice for interleukin *IL-10* (*KOIL-10*), which mimic chronic low-grade inflammation, characteristic present in aging. Materials and methods: female C57BL/6 wild-type (WT) and interleukin *IL-10* knockouts (*IL-10^{-/-}*) mice were divided into control groups, which received a normolipidic diet, and omega 3 groups, which received a diet with 10% more lipids coming from omega 3 polyunsaturated fatty acid, both conditions subjected to 90 days. Muscle, liver, intestinal and mesenteric lymph node tissue were collected for analysis. At the end of the experiment, the *IL-10^{-/-}+O3* group demonstrated greater weight gain compared to the WT ($p=0.036$) and WT+O3 ($p=0.001$) groups. In the evaluation of regulatory T cells for FOXP3, there was higher expression in the *IL-10^{-/-}+O3* groups when compared to the *IL-10^{-/-}* group ($p=0.001$). It was found that animals in the *IL-10^{-/-}+O3* group had lower levels of steatosis when compared to the *IL-10^{-/-}* group ($p=0.017$). There was even greater vitamin E activity in the WT group compared to the *IL-10^{-/-}+O3* group ($p=0.001$) and WT+O3 compared to *IL-10^{-/-}+O3* ($p=0.002$) and when analyzed the marker of oxidative stress MDA, an increase in lipid peroxidation was found in the *IL-10^{-/-}+O3* group when compared to the *IL-10^{-/-}* group ($p=0.03$). Muscle tissue histology showed decreased muscle fibers in the *IL-10^{-/-}+O3*, *IL-10^{-/-}* and WT+O3 groups. In conclusion, the results indicate a decrease in

inflammation and lower levels of hepatic steatosis in KOIL-10^{-/-} animals after supplementation. However, a simultaneous increase in oxidative stress markers and a decrease in antioxidant markers in liver tissue were observed. These data suggest that the use of omega 3 supplementation has a positive effect on the inflammatory process while it leads to a probable imbalance between the generation of oxidizing compounds and the action of antioxidant defense systems.

Keywords: Inflammation. *IL-10*^{-/-} mice. Oxidative stress. n-3 PUFA.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação das dietas AIN-93M.	56
Tabela 2. Porcentagem de nutrientes por dieta.	56
Tabela 3. Peso dos animais. Distribuição do peso inicial, final e delta peso entre os grupos IL-10 ^{-/-} +O3; IL-10 ^{-/-} ; WT+O3 e WT.....	63
Tabela 4. Histologia do intestino delgado medial de camundongos.....	64
Tabela 5. Escore de esteatose do tecido hepático entre os grupos IL-10 ^{-/-} +O3; IL-10 ^{-/-} ; WT+O3 e WT.....	70
Tabela 6. Peso, função antioxidante e estresse oxidativo do tecido hepático. Glutathione peroxidase, glutathione reduzida, vitamina E e malondialdeído nos grupos IL-10 ^{-/-} +O3; IL-10 ^{-/-} ; WT+O3 e WT.	72
Tabela 7. Peso dos músculos entre os grupos IL-10 ^{-/-} +O3; IL-10 ^{-/-} ; WT+O3 e WT.....	74
Tabela 8. Escore do músculo tibial anterior dos grupos IL-10 ^{-/-} +O3;IL-10 ^{-/-} ; WT+O3 e WT.	76
Tabela 9. Função antioxidante do músculo gastrocnêmio entre os grupos IL-10 ^{-/-} +O3; IL- 10 ^{-/-} ; WT+O3 e WT.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alterações relacionadas à idade na imunidade inata e adaptativa e sua contribuição para a inflammaging.	28
Figura 2. Representação esquemática da interação dinâmica do processo de inflammaging.	32
Figura 3. As principais espécies reativas de oxigênio.	33
Figura 4. Os principais antioxidantes.....	34
Figura 5. Mecanismo proposto pelo qual as EROs e o estresse oxidativo podem contribuir para o processo de envelhecimento.	37
Figura 6. Metabolismo do ácido graxo poliinsaturado ômega 3.....	42
Figura 7. Hipótese de melhora após o consumo do ômega-3 na dieta dos camundongos.	50
Figura 8. Delineamento do protocolo de dieta controle e dieta com suplementação. WT animais controle sem suplementação; WT O3 animais controle com suplementação; KOIL-10 animais KO sem suplementação; KOIL-10 O3 animais KO com suplementação.	55
Figura 9. Estratégia de análise para obtenção de células T reguladoras. Células provenientes do linfonodo de animais suplementados ou não com ômega-3.....	67
Figura 10. Análise histológica do lobo direito do tecido hepático entre os grupos.	69
Figura 11. Histologia do músculo tibial anterior dos grupos.....	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Dados e projeções probabilísticas de idosos de 60 anos e mais. Mundo 1950 - 2100.....	23
Gráfico 2. Expectativa de vida ao nascer.....	24
Gráfico 3. Avaliação da produção de IL-6 em sobrenadante de cultura de linfonodo mesentérico após 48 horas de cultura com adição de ConA.....	65
Gráfico 4. Expressão de FOXP3 em células T reguladoras. Células vindas de linfonodo mesentérico dos grupos IL-10 ^{-/-} +O3; IL-10 ^{-/-} ; WT+O3 e WT.	68
Gráfico 5. Função antioxidante.....	73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
COX	Ciclooxigenase
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DCs	Células dendríticas
DCNTs	Doenças crônicas não transmissíveis
D-gal	D-galactose
DHA	Ácido docosa-hexaenoico
EO	Estresse oxidativo
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutaotina reduzida
GSH-Px	Glutaotina peroxidase
GSH-Rd	Glutaotina redutase
IL-1	Interleucina 1
IL-1B	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
KO	Knockout
LOX	Lipoxigenase
MDA	Malondialdeído
NETs	armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF-KB	Fator Nuclear Kappa B
NK	Natural Killer
PCR	Proteína C reativa
PNAD	Pesquisa Nacional de Amostra por Domicílio
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados
RL	Radical livre
SOD	Superóxido-dismutase
TLRs	Receptores do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

Ω -3	Ômega 3
Ω -6	Ômega 6
Ω -7	Ômega 7
Ω -9	Ômega 9
WT	Wild-Type

LISTA DE SÍMBOLOS

<	Menor
>	Maior
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
+	Mais ou menos
%	Porcentagem
=	Igual
°	Grau
Ω	Ômega
TM	Marca registrada
g	Gramma
n	Número

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. <i>Envelhecimento Populacional.....</i>	22
1.2. <i>Envelhecimento do Sistema Imunológico e inflammaging</i>	25
1.3. <i>Estresse Oxidativo.....</i>	32
1.4. <i>Sistema Muscular.....</i>	38
1.5. <i>Ômega-3.....</i>	40
1.6. <i>Modelo Animal.....</i>	45
2. JUSTIFICATIVA.....	48
3. HIPÓTESE	50
4. OBJETIVOS.....	52
4.1. <i>Objetivos gerais</i>	52
4.2. <i>Objetivos específicos.....</i>	52
5. MATERIAIS E MÉTODOS	54
5.1. <i>Animais.....</i>	54
5.2. <i>Dieta dos animais.....</i>	54
5.3. <i>Grupos experimentais do estudo.....</i>	56
5.4. <i>Determinação dos parâmetros inflamatórios sistêmicos e cultura do sobrenadante de 48 horas.....</i>	57
5.5. <i>Determinação dos parâmetros antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo .</i>	57
5.6. <i>Determinação de proteína hepática.....</i>	57
5.6.1. <i>Determinação da glutathiona reduzida (GSH) hepática.....</i>	58
5.6.2. <i>Determinação de vitamina E hepática.....</i>	58
5.6.3. <i>Determinação de glutathiona peroxidase (GPx) hepática.....</i>	59
5.6.4. <i>Determinação de malondialdeído (MDA) hepático</i>	59
5.6.5. <i>Determinação do peso dos tecidos muscular e hepático</i>	59
5.7. <i>Análise histopatológica.....</i>	59
5.8. <i>Cultura e imunofenotipagem das células do linfonodo mesentérico</i>	60
5.9. <i>Análise estatística dos dados</i>	60
6. RESULTADOS.....	62
6.1. <i>Efeito da suplementação Ômega-3 no ganho de peso dos animais e ingestão de energia</i>	62

6.2. Avaliação do tecido intestinal e imunofenotipagem de células provenientes do linfonodo mesentérico.....	64
6.3. Tecidos hepático, função antioxidante e marcadores de estresse oxidativo	68
6.4. Tecidos musculares: avaliação do músculo tibial anterior, extensor digital longo, sóleo e gastrocnêmio.....	73
7. DISCUSSÃO.....	81
8. CONCLUSÕES	89
9. REFERÊNCIAS.....	91
10. ANEXOS.....	111
10.1. Anexo I. Autorização da instituição para a utilização de animais para fins de pesquisa.....	111
10.2. Anexo II. Comprovante de submissão do manuscrito à Revista Nutrients.	112

1. INTRODUÇÃO

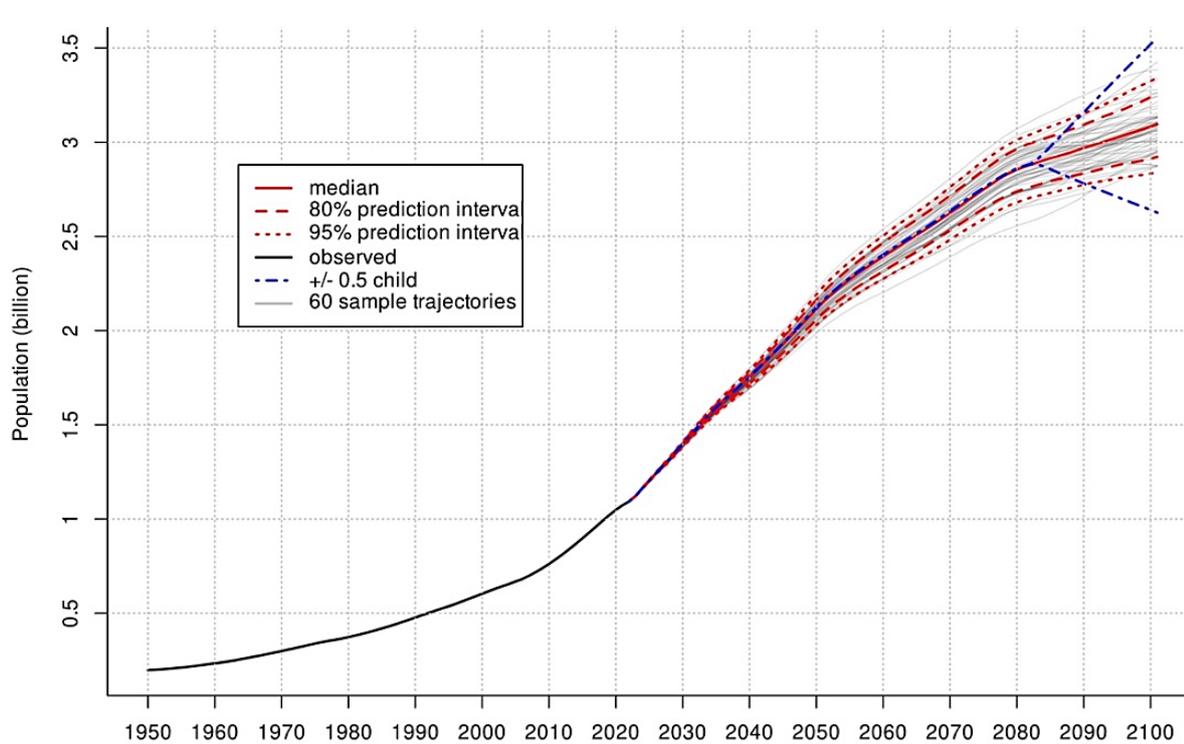
1.1. Envelhecimento Populacional

A partir da queda de fecundidade e de mortalidade e importantes avanços na saúde, o envelhecimento populacional é um proeminente fenômeno global e é amplamente reconhecido mundialmente (ALEXANDRE et al., 2016). Em 1950, pessoas com 60 anos ou mais compreendiam 8% da população mundial, em 2013 cresceu para 12% e as projeções para 2050 apontam que 21% da população será composta por idosos (UNITED NATION, 2023).

Na União Europeia a percentagem da população idosa, pessoas com 65 anos ou mais, em 2016 era de cerca de 19% da população total. As projeções demográficas indicam que entre os anos de 2018 a 2050 o número de pessoas com idades entre 75 e 84 anos deverá aumentar 60,5%, enquanto o número de pessoas entre 65 e 74 anos deverá aumentar 17,6% (UNITED NATION, 2023). Já na América Latina e no Caribe, essa transição demográfica ocorre de forma ainda mais acelerada, sendo que a proporção de idosos mais que dobrará nos próximos 30 anos, alcançando quase 18% da população total e estimativas indicam que no fim do século XXI, para essa região, 30% da população será de idosos (UNITED NATION, 2019).

De acordo com os dados da Pesquisa Nacional de Amostra por Domicílio (PNAD), em 2013 a proporção de idosos brasileiros era de 13% e estimativas apontam que, para o ano de 2050, terá cerca de 153 idosos para cada 100 pessoas menores de 15 anos, correspondendo a 29,7% da população com 60 anos ou mais. Isso eleva o Brasil ao sexto país do mundo com o maior número de idosos (WASMÁLIA et al., 2013).

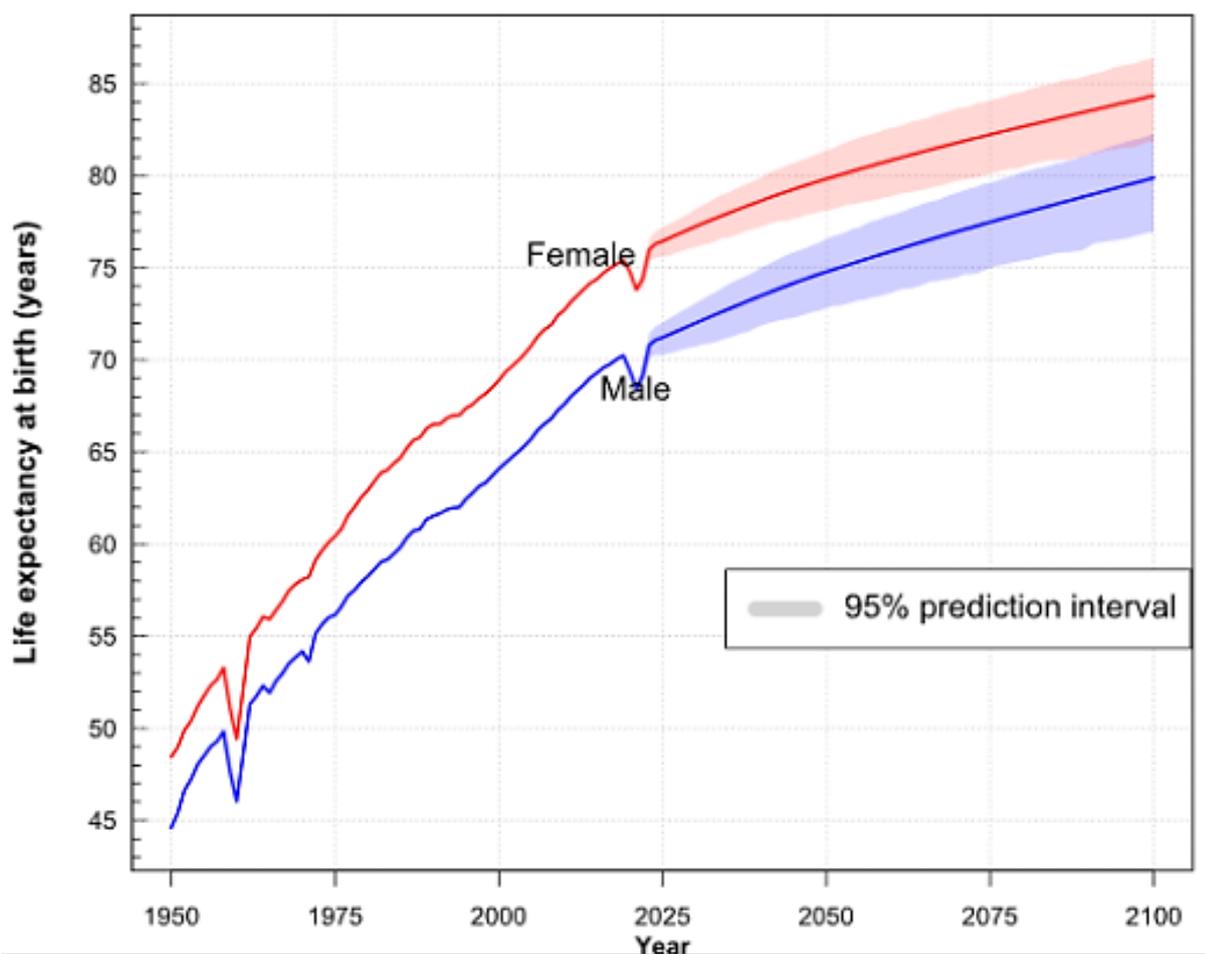
É possível observar no Gráfico 1 o aumento do número de pessoas com 60 anos ou mais e sua projeção até 2100.

Gráfico 1. Dados e projeções probabilísticas de idosos de 60 anos e mais. Mundo 1950 - 2100.

Fonte: United Nations, DESA, Population Division. World Population Prospects 2022.

No Gráfico 2, observa-se a expectativa de vida em 150 anos. Nota-se que o ritmo do envelhecimento na segunda metade do século XX se dava de forma lenta, já no século XXI, isso passa a ocorrer de modo acelerado com o passar dos anos.

Gráfico 2. Expectativa de vida ao nascer.



Fonte: United Nations, DESA, Population Division. World Population Prospects 2022. <http://population.un.org/wppw>

Portanto, os obstáculos que acompanham o envelhecimento são eventos conhecidos, além de causar aumento na necessidade de cuidados. Dessa maneira, houve a substituição do perfil das doenças, de infecto contagiosas transmissíveis para doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs). Desse modo, à medida que a população idosa aumenta, as DCNTs tornam-se mais frequentes (ALVES; DE OLIVEIRA; GREGORI, 2021).

O envelhecimento é influenciado por diversas mudanças dinâmicas e complexas, associadas com o acúmulo gradual de uma extensa variedade de danos, principalmente moleculares, que com o tempo leva a declínios progressivos das reservas fisiológicas, aumentando o risco para as numerosas doenças que resultam num declínio geral da capacidade do idoso (DIZ et al., 2017). Nesse cenário, um dos maiores desafios será cuidar de uma ampla população idosa que apresentará alterações relacionadas ao processo de envelhecimento e as

especificidades dessa faixa etária passará a ganhar maior expressão no conjunto da sociedade (MIRANDA; MENDES; SILVA, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020)

1.2. Envelhecimento do Sistema Imunológico e *inflammaging*

O processo de envelhecimento está associado a mudanças significativas no sistema imunológico que, coletivamente, são conhecidas como imunossenescência. Esse fenômeno multifatorial e dinâmico desempenha um papel crucial no aparecimento e desenvolvimento de várias doenças crônicas em idosos, que afetam tanto a imunidade inata, quanto a adaptativa, como descreveremos a seguir (CALDER et al., 2017; SANTORO et al., 2020)

Estudos demonstram que há profundas alterações nos componentes cruciais do sistema imunológico inato, que estão relacionadas a um aumento do risco de infecções e maior mortalidade relacionada a elas. Uma hipótese sugere que os constantes desafios imunológicos ao longo da vida resultam em um maior estado de ativação basal desse sistema (FULOP et al., 2018). Além dos antígenos exógenos, macromoléculas danificadas, organelas e restos celulares podem atuar como padrões moleculares associados a danos (DAMPs) que induzem a imunidade inata por meio da via NF-KB e a indução de inflamassomas (YOUM et al., 2013).

Os neutrófilos atuam como defesa primária na resposta imunológica inata, sendo recrutados para os locais de infecção para executar rapidamente atividades microbidas, como fagocitose, degranulação de proteínas antimicrobianas e liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). No entanto, alterações relacionadas à idade afetam a função dessas células, levando ao aumento da frequência de infecções em idosos, uma vez que a atividade microbida dos neutrófilos em indivíduos idosos é significativamente reduzida (ORTMANN; KOLACZKOWSKA, 2018; SIMELL et al., 2011; VOROBJEVA; CHERNYAK, 2020). Neutrófilos envelhecidos tendem a se acumular na pele e têm um efeito pró-inflamatório nos linfócitos T (RODRIGUEZ-ROSALES et al., 2021). Além disso, foi demonstrado que há uma redução nas contagens de linfócitos T Vδ2+ no sangue durante o envelhecimento, o que pode explicar a maior suscetibilidade de indivíduos idosos a casos graves de COVID-19 (CARISSIMO et al., 2020).

Em humanos, o tecido adiposo sofre importantes alterações imunometabólicas relacionadas ao aumento das vias pró-inflamatórias associadas à imunidade adquirida e inata. Foi demonstrado, no tecido adiposo branco visceral e no fígado, o acúmulo de macrófagos pró-inflamatórios semelhantes a M1. Ele está relacionado a idade e é caracterizado pelo aumento da expressão de CD38 (COVARRUBIAS et al., 2020). Como resultado do aumento da

inflamação causada pelo acúmulo de células senescentes ocorre essa polarização dos macrófagos. Não obstante, essas células, metabolicamente ativas, produzem fatores imunomoduladores que promovem a expressão de CD38 em macrófagos M1 residentes, regulando assim a migração das células imunes e as respostas imunes inatas (COVARRUBIAS et al., 2020). Por outro lado, Costantini e colaboradores sugerem que o envelhecimento saudável está associado a um aumento significativo na proporção de monócitos totais, sem alterações significativas na frequência dos três subconjuntos (COSTANTINI et al., 2018).

O envelhecimento é associado a alterações fenotípicas e funcionais das células Natural Killer (NK). Essas células podem ser observadas no comprometimento da citotoxicidade por outras células devido à diminuição da expressão de receptores ativados, embora a citotoxicidade total das células NK possa não ser afetada devido ao aumento das frequências de células NK maduras (HAZELDINE; LORD, 2013). Estudos têm evidenciado que as funções das células NK vão além do seu papel na imunidade antiviral e antitumoral, abrangendo áreas como a regulação imunológica, início de respostas imunes adaptativas e eliminação de células senescentes (HAZELDINE; LORD, 2013). Desta maneira, várias características do processo de envelhecimento como a redução da eficácia da vacinação, o aumento do acúmulo de células senescentes e as maiores taxas de infecção fúngica, podem ser parcialmente atribuídas ao declínio da função das células NK que ocorre durante o envelhecimento.

As células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígeno altamente especializadas. Mudanças relacionadas à idade, tanto em termos de quantidade quanto de frequência, têm sido associadas a um significativo prejuízo na secreção de algumas citocinas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (*IL-6*) e interleucina 12 (*IL-12*), em resposta aos receptores do tipo Toll (TLRs) (METCALF et al., 2017; PANDA et al., 2010). Consequentemente, ocorre uma profunda desregulação das funções imunes inatas, com algumas funções sendo reguladas para baixo, outras sendo reguladas para cima ou mesmo aumentadas. Sendo assim, as alterações relacionadas à idade nas células dendríticas e em outros componentes do sistema imunológico podem ter efeitos importantes nas funções imunes inatas, resultando em desregulações que podem contribuir para o envelhecimento e para o aumento da inflamação em indivíduos idosos (SALVIOLI et al., 2013).

O sistema imunológico adaptativo é composto por duas principais respostas, sendo a primeira a resposta imune mediada por células, realizada pelas células T; e em segundo a resposta imune humoral, controlada pelas células B ativadas e pela produção de anticorpos (DAS et al., 2017). As alterações nas respostas adaptativas têm sido observadas no envelhecimento, sendo as células T mais afetadas, contribuindo assim para o processo

inflamatório no indivíduo (FRANCESCHI et al., 2018b; TU; RAO, 2016). É possível identificar duas mudanças principais no sistema imunológico adaptativo que caracterizam o envelhecimento: uma diminuição nas células T virgens e um aumento nas células T de memória estimuladas por diferentes antígenos, acompanhado de regulação positiva de moléculas pró-inflamatórias.

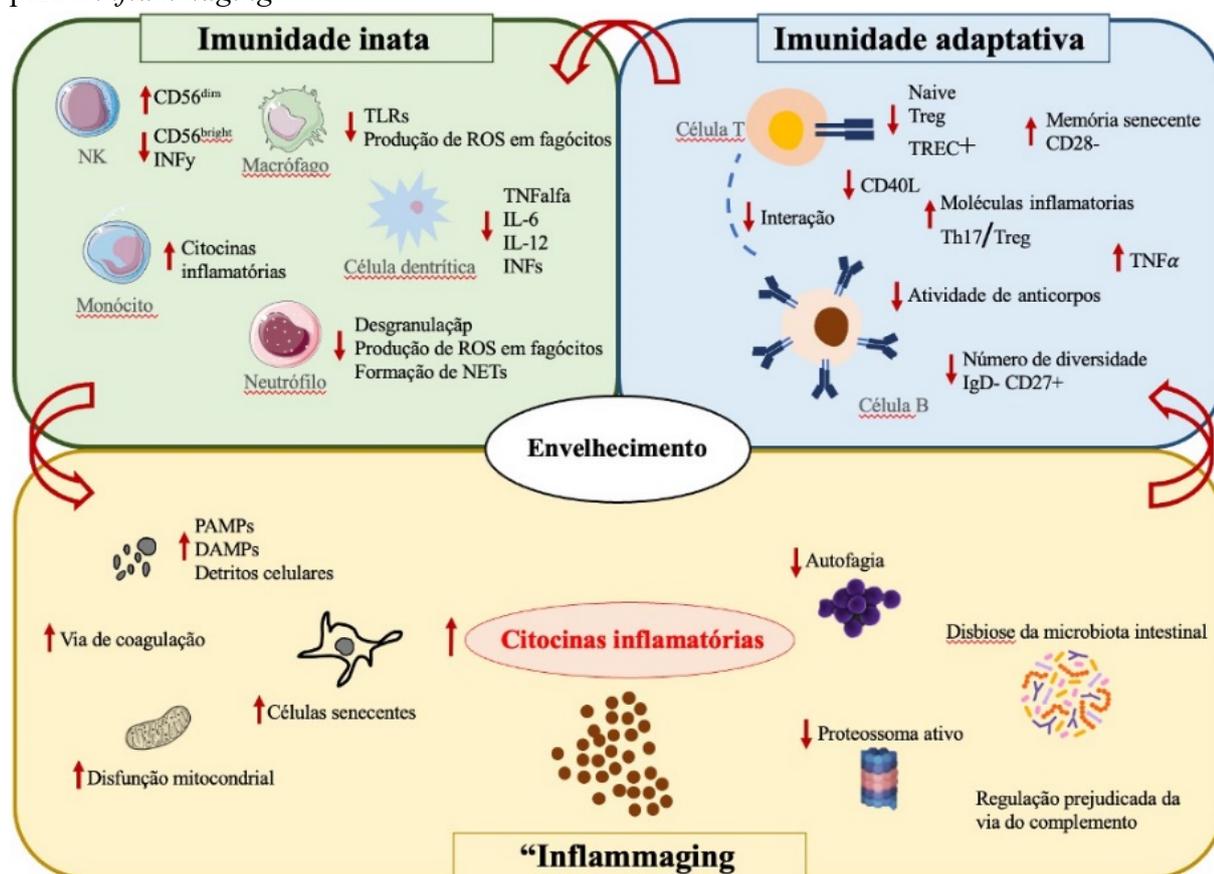
A diminuição da capacidade regenerativa é uma característica do envelhecimento e esta, por sua vez, contribui para a redução das células hematopoiéticas (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013). Essas alterações têm um impacto no repertório de células T e B, sendo parcialmente responsáveis pela diminuição do número dessas células (PALMER, 2013). A expansão das células T de memória em resposta a vírus latentes é a segunda característica da imunossenescência, afetando a diversidade do repertório dessas células. Células senescentes, como as células T CD28- diferenciadas induzidas por encontros repetidos com patógenos e células T senescentes diferenciadas em estágio terminal, são caracterizadas pela redução progressiva do comprimento dos telômeros e pela parada proliferativa, o que gera uma propensão em se acumular (AKBAR; HENSON; LANNA, 2016). Dessa forma, durante o envelhecimento, mudanças nas razões TH17/Treg e a expressão alterada de citocinas podem contribuir para um desequilíbrio entre a resposta imune pró-inflamatória e anti-inflamatória, indicando uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças inflamatórias com o aumento da idade (SCHMITT; RINK; UCIECHOWSKI, 2013). Além disso, assim como os pools de células T, o compartimento de células B também sofre alterações relacionadas à idade. Um exemplo é a diminuição significativa no número e porcentagens de células B periféricas, prejudicando as respostas imunes humorais específicas contra patógenos extracelulares e vacinas. A diversidade do repertório de células B, os isotipos de imunoglobulinas e o repertório de receptores são afetados pela idade (FRASCA et al., 2020).

Apesar das modificações mencionadas poderem fornecer algumas informações sobre a predisposição individual à inflamação, é importante considerar muitas outras variáveis que podem desempenhar um papel nesse processo. Experiências e estímulos imunológicos que cada indivíduo foi exposto ao longo da vida (FRANCESCHI et al., 2018b), sexo (OSTAN et al., 2016), idade (SANSONI et al., 2008), diferentes contextos históricos, geográficos, de estresse e dieta (FRANCESCHI, 2017; SANTORO et al., 2020), bem como a composição do microbioma intestinal (KAUR et al., 2011; SANTORO et al., 2005, 2020) são fatores-chave que contribuem para a inflamação (SANTORO; BIENTINESI; MONTI, 2021).

Em resumo, pode-se observar na figura 1 as principais mudanças na imunidade inata e adaptativa relacionadas ao envelhecimento e sua contribuição para o *inflammaging*. Tais

mudanças são evidentes no sistema imunológico inato com as modificações que ocorrem nos neutrófilos, células NK, monócitos, macrófagos e células dendríticas. Da mesma forma, encontramos que a função das células T e B na imunidade adaptativa se altera com o envelhecimento. As mudanças relacionadas à idade no sistema imunológico inato e adaptativo resultam no aumento de mediadores inflamatórios, que, juntamente com outras modificações, como o aumento de detritos celulares e DAMPs, células senescentes, inflamatório-miRs, componentes da via de coagulação, N agalactosilado-glicanos, meta inflamação, diminuição da capacidade de descarte do proteossoma e autofagia, disbiose da microbiota intestinal e regulação prejudicada do complemento, contribuem para o *inflammaging*.

Figura 1. Alterações relacionadas à idade na imunidade inata e adaptativa e sua contribuição para a *inflammaging*.



Fonte: Figura traduzida e adaptada por Santoro, et al., 2021.

Para definir um processo de inflamação que ocorre de maneira sutil e prejudicial, Franceschi e colaboradores cunharam o termo *inflammaging*, definindo-o como um estado inflamatório crônico de baixo grau devido ao comprometimento do sistema imunológico (FRANCESCHI et al., 2000). Caracterizado por um aumento na concentração de marcadores

inflamatórios na corrente sanguínea, é descrito como uma combinação de imunidade disfuncional com um estado de inflamação sistêmica crônica de baixo grau, e considerado como um fenômeno universal associado com fragilidade e morbidade em idosos (CALDER et al., 2017).

A distinção entre o envelhecimento malsucedido e as doenças associadas à idade, em contraste com o envelhecimento e a longevidade bem-sucedidos, está relacionada à capacidade de resposta adaptativa do organismo. Além de impulsionar uma ativação adaptativa secundária de redes anti-inflamatórias, essa capacidade também é um dos principais pilares que determinam as diferentes trajetórias de envelhecimento e seus resultados (FRANCESCHI et al., 2018b; FURMAN et al., 2019). O desenvolvimento de doenças relacionadas à idade e fragilidade é resultado tanto da estimulação excessiva de respostas pró-inflamatórias, quanto de uma reação anti-inflamatória ineficaz; ao passo que a longevidade e o envelhecimento bem-sucedido são determinados por uma predisposição reduzida para estimular vias inflamatórias, juntamente com uma resposta anti-inflamatória eficaz (MORRISETTE-THOMAS et al., 2014).

A inflamação crônica de baixo grau, como ponto chave no processo fisiopatológico, está associada a alterações complexas e desregulação do sistema imunológico, incluindo seu componente inflamatório demonstrado pelos aumentos de duas a quatro vezes nos níveis séricos de vários mediadores inflamatórios em idosos (KRABBE; PEDERSEN; BRUUNSGAARD, 2004).

É sugerido que a inflamação crônica de baixo grau durante o envelhecimento possa contribuir para o surgimento da tempestade de citocinas em adultos mais velhos (MEFTHAHI et al., 2020). A tempestade de citocinas é caracterizada por um aumento precoce e significativo de citocinas pró-inflamatórias como *IL-1B*, *IL-6*, *IL-8* e *TNF- α* , que estão intrinsecamente associadas a doenças graves (CHOUSTERMAN; SWIRSKI; WEBER, 2017; SHIMABUKURO-VORNHAGEN et al., 2018). Estudos demonstram que as concentrações de marcadores e fatores de inflamação são maiores em idosos quando comparados aos adultos jovens (FERRUCCI et al., 2005; PEDERSEN et al., 2003). Esse processo pode resultar em diferentes desfechos, a depender da natureza da estimulação, da reserva fisiológica, do contexto imunológico e da exposição a infecções (MORRISETTE-THOMAS et al., 2014).

A inflamação crônica de baixo grau é considerada uma causa importante de diversas doenças relacionadas à idade avançada (PAN et al., 2021). Estudos sugerem que as deficiências nas funções imunológicas inatas e adaptativas, juntamente com a inflamação crônica de baixo grau associada à idade podem levar a uma menor eficácia das vacinas em idosos (KOVAIYOU; HERNDLER-BRANDSTETTER; GRUBECK-LOEBENSTEIN, 2007; PAN et al., 2021).

Verificou-se, em uma coorte de idosos vacinados contra influenza, que o grupo que não apresentou resposta adequada à vacina tinha concentrações mais elevadas de marcadores inflamatórios circulantes, como *IL-6* e proteína C reativa (PCR) antes da vacinação. Dessa forma, concluiu-se que um estado inflamatório mais significativo pode afetar a resposta à imunização (TRZONKOWSKI et al., 2009). Estudos têm mostrado que adultos mais velhos têm respostas humorais menos robustas após a vacinação com mRNA contra COVID-19 em comparação com indivíduos mais jovens. Isso ocorre, certamente, devido a uma menor produção de anticorpos neutralizantes (BROCKMAN et al., 2022). Do mesmo modo, encontrou-se a resposta funcional das células T à infecção por COVID-19 após a vacinação parecer comprometida em adultos mais velhos (DEMARET et al., 2021). Ainda, foi observado que os adultos mais velhos têm uma resposta reduzida contra a variante Delta do vírus, sugerindo que mesmo após a vacinação, os idosos mais velhos podem apresentar maior risco de infecção (BROCKMAN et al., 2022).

Morrisette-Thomas e colaboradores identificaram que o padrão de inflamação correlaciona a idade com moléculas pró e anti-inflamatórias, sendo fortemente preditivo de mortalidade e de várias doenças crônicas (MORRISETTE-THOMAS et al., 2014). Em idosos, a citocina *IL-6*, citocina associada à inflamação, está correlacionada positivamente com redução da massa magra, declínio funcional, mortalidade (SANTOS et al., 2011), pior desempenho físico e maior déficit cognitivo (PUZIANOWSKA-KUŹNICKA et al., 2016).

Verificou-se que a imunossenescência contribui para o aumento da expressão de marcadores de envelhecimento, como p16Ink4a, um inibidor do ciclo celular no cérebro (YOUSEFZADEH et al., 2021). O aumento na secreção de citocinas inflamatórias no sangue, agravado pela *inflammaging* (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013), faz com que células imunes senescentes, como células T e macrófagos, se infiltrem nos nichos do sistema nervoso central, secretando moléculas pró-inflamatórias associadas à senescência. Dessa forma, promove a senescência parácrina e prejudica o seu funcionamento normal (WILLIS et al., 2022).

A alta concentração de citocinas inflamatórias está associada a um maior risco de mortalidade devido ao aumento de doenças respiratórias, vasculares e vários tipos de câncer (SPAZZAFUMO et al., 2013). Em outro estudo, Varadhan e colaboradores acompanharam 1155 idosos por 10 anos com o objetivo de criar um *score*, tendo como base alguns marcadores de inflamação; os autores notaram que *IL-6* e TNF- α foram melhores preditores de mortalidade em 10 anos, no Cardiovascular Health Study (VARADHAN et al., 2014). Estudos mostram que doenças ateroscleróticas são acompanhadas por uma inflamação

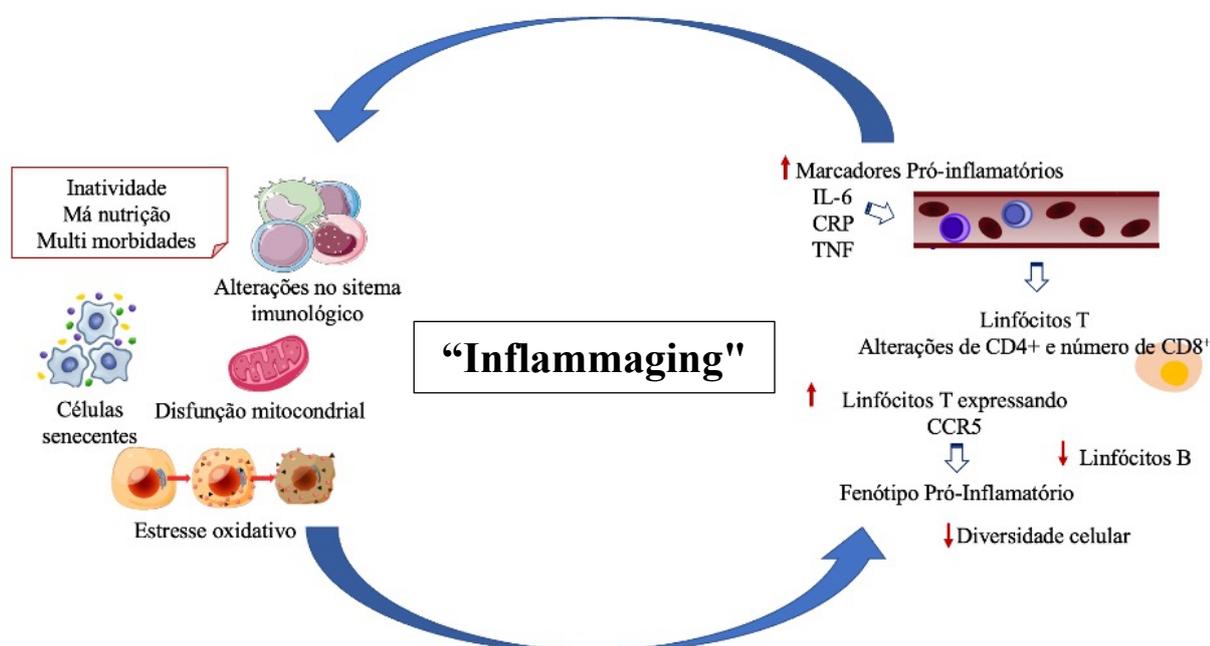
crônica de baixo grau, resposta que atrai células do sistema imune inato e adaptativo para a placa aterosclerótica (POTHINENI et al., 2017; WOLF; LEY, 2019).

A inflamação crônica de baixo grau também desempenha papel preponderante no desenvolvimento da sarcopenia, que é a perda de massa e força muscular relacionada ao envelhecimento, pois causa um desequilíbrio na síntese metabólica de proteínas (PAN et al., 2021; WILSON et al., 2017). Soysal e colaboradores, elaboram uma meta-análise incluindo 32 estudos com 23.910 indivíduos mais velhos e verificaram que a associação entre marcadores inflamatórios e de fragilidade foram associadas a parâmetros inflamatórios séricos significativamente mais altos em comparação com participantes saudáveis. O aumento de alguns marcadores, como PCR, *IL-6*, TNF e contagem de células imunes estavam associados com síndrome da fragilidade (SOYSAL et al., 2016).

Pessoas da mesma idade cronológica podem apresentar diferentes taxas de envelhecimento devido a uma complexa interação entre fatores intrínsecos e extrínsecos, como genética e ambiente, que determinam a chamada "idade biológica" (HAMCZYK et al., 2020). No entanto, está se tornando cada vez mais evidente que a inflamação, estritamente associada à idade biológica, desempenha um papel crítico no envelhecimento e prediz o desenvolvimento de doenças relacionadas à idade em idosos (DEELEN et al., 2019; FRANCESCHI et al., 2018; LEHALLIER et al., 2019). É importante considerar muitas outras variáveis que podem desempenhar um papel nesse processo. As experiências e estímulos imunológicos ao longo da vida de cada indivíduo, bem como a composição do microbioma intestinal, ou seja, o conjunto de bactérias comensais, infecções crônicas (SANSONI et al., 2014), inatividade física, obesidade visceral, disbiose intestinal, dieta, isolamento social, estresse, adversidades na infância (MERZ; TURNER, 2021), distúrbios do sono e ritmo circadiano, exposição a poluentes do ar, resíduos perigosos, produtos químicos industriais e tabagismo são fatores-chave que contribuem para a inflamação (FRANCESCHI et al., 2017; OSTAN et al., 2016; SANTORO; BIENTINESI; MONTI, 2021). Portanto, os marcadores biológicos de inflamação podem variar de acordo com as configurações ambientais, culturais e geográficas ao redor do mundo (BATISTA et al., 2020; FRANCESCHI et al., 2018).

Na Figura 2 podemos observar que *inflammaging* é um ciclo onde alterações no sistema imunológico, inatividade física, má nutrição, acúmulo de células senescentes, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo leva a um aumento de marcadores pró-inflamatórios. Isso pode gerar alterações de alguns tipos celulares, como a diminuição da diversidade celular e o aumento do fenótipo pró-inflamatório, resultando em um aumento da entropia conduzida a um estado de maior desordem.

Figura 2. Representação esquemática da interação dinâmica do processo de *inflammaging*.



Fonte: Campanari, Daniela Dalpabel (2024).

Devido a essa resposta inflamatória alterada, há um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, causando um maior aparecimento de estresse oxidativo na população idosa (PIGGOTT et al., 2015; SERGIO, 2008). Este tema será discutido na seção seguinte. O desenvolvimento de caminhos para a prevenção, diagnóstico e tratamento precoce do *inflammaging* é, portanto, de grande importância para novas intervenções com resultados mais precisos e diretos.

1.3. Estresse Oxidativo

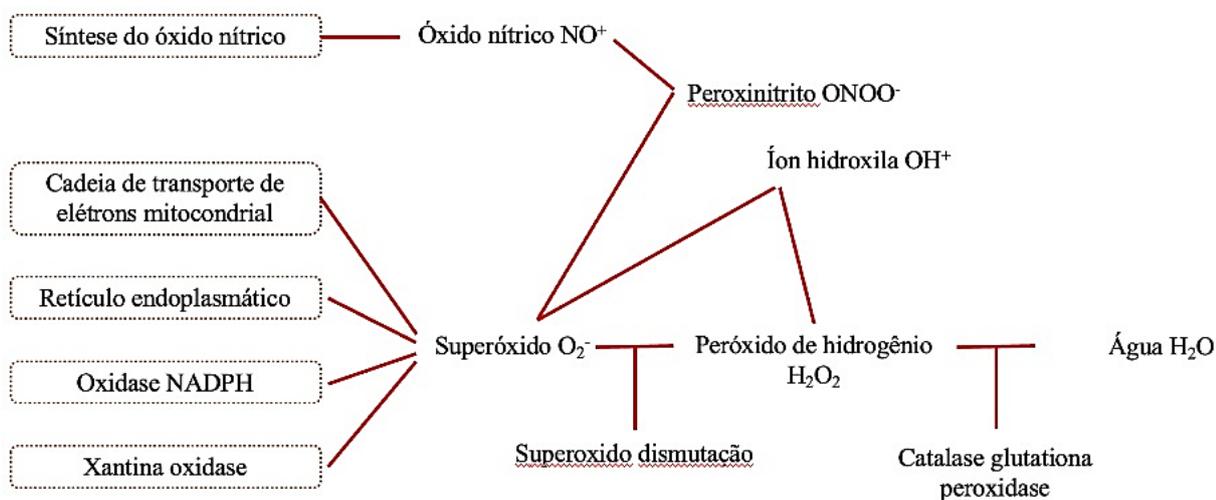
Radical livre (RL) é o termo utilizado para definir qualquer espécie de átomo ou molécula que possua um ou mais elétrons de valência desemparelhados, ocorrido pela perda (oxidação) ou ganho (redução) de um elétron. Essa característica faz com que possuam meia vida curta, grande instabilidade e se tornem quimicamente reativos, o que lhes permite captar (oxidantes) ou ceder (redutores) elétrons e/ou átomos de hidrogênio para outras moléculas que os circundam (NATHAN; CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013; POMPELLA et al., 2014; SELYE H., 1936; SIES, 2015). Os RL podem ser gerados no citoplasma, mitocôndria ou membranas celulares e estão envolvidos nos processos fisiológicos dos organismos, pois atuam como

mediadores para transferência de elétrons em diversas reações, possibilitando geração de ATP, ativação de genes e participando de mecanismos de defesas, regeneração tecidual, sinalização hormonal, regulação redox intracelular e embriogênese (POMPELLA et al., 2014; SIES, 2015).

A denominação “espécies reativas” engloba os RL e moléculas que, apesar de não possuírem átomos com elétrons, são potencialmente geradoras desses radicais. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são constantemente geradas nas células através das vias metabólicas. O aumento na produção de EROs ou diminuição de sua remoção causam acúmulo na célula, caracterizando o estresse oxidativo (POMPELLA et al., 2014), que é o desequilíbrio entre a ação dos agentes oxidantes e dos antioxidantes, a favor dos primeiros (NATHAN; CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013; SIES, 2015).

Pode-se observar na Figura 3 as principais EROs, suas origens potenciais e suas vias de desintoxicação. É importante ressaltar que, embora os radicais livres possam ser originados de diversos elementos, nos sistemas biológicos aqueles que envolvem oxigênio e nitrogênio são de maior relevância.

Figura 3. As principais espécies reativas de oxigênio.



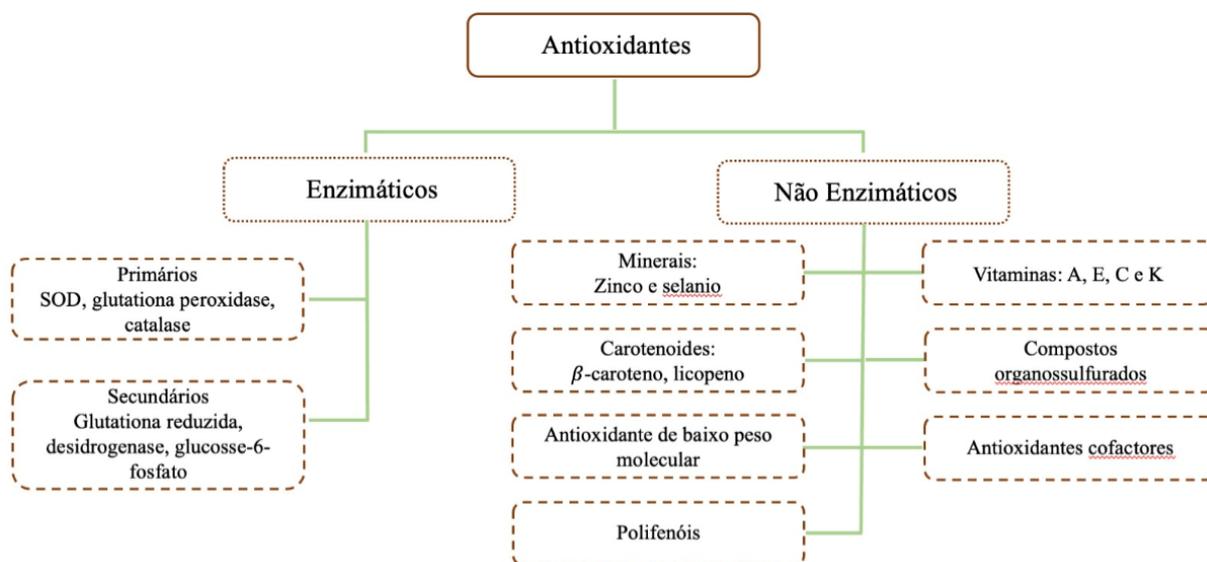
Fonte: Traduzida e adaptada de Oxidative Stress, Burton & Jauniaux, 2010.

O sistema de defesa antioxidante tem a função de conter e/ou inibir os danos causados pela ação dos RL e do ROS. Antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou bloquear as taxas de oxidação através de diferentes mecanismos de ação impedindo a ação dos RL ou EROs e sua formação ou favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (FAIRLAMB; CERAMI, 1992; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; KURUTAS, 2016). Os antioxidantes dividem-se em dois

sistemas: o enzimático, composto pelas enzimas produzidas no organismo; e o não enzimático, composto por vitaminas e outras substâncias, como os flavonoides, licopeno e bilirrubina, como observado na figura 4. Essas substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres e espécies não-radicaais, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com capacidade semelhante (KURUTAS, 2016).

Na neutralização da ROS como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão é realizada por algumas enzimas tais como a glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, glutathiona redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros. Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular. O metabolismo antioxidante demanda gasto energético e possui uma relação intrínseca com o sistema glicolítico (MARCHITTI et al., 2011; SINGH et al., 2017).

Figura 4. Os principais antioxidantes.



Fonte: Campanari, Daniela Dalpubel (2024).

Quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os mecanismos antioxidantes (AO) ocorre um processo denominado estresse oxidativo (EO) (SHARIFI-RAD et al., 2020). Este desequilíbrio pode ser resultante de um aumento na produção de RL ou à diminuição de antioxidantes (FANG; YANG; WU, 2002). O excesso de RL reage com qualquer componente celular como proteínas, lipídios e ácido nucléico, a depender do seu sítio de formação (ROSENFELDT et al., 2013). Estas reações desencadeiam danos celulares que,

conforme a intensidade do estresse, podem acionar o mecanismo de apoptose ou necrose celular (CULOTTA, 2000). A alteração das vias metabólicas, processos de inflamação e adaptação ao estresse, processos biológicos e hábitos de vida estão interligados e atuam como pilares do envelhecimento e das doenças relacionadas à idade (FERRUCCI et al., 2020; FURMAN et al., 2019; JAUL; BARRON, 2017; SHARMA; MEHDI, 2023).

O estresse oxidativo é um dos principais fatores que contribuem para muitos distúrbios durante o envelhecimento. De acordo com a teoria dos radicais livres, os produtos nocivos do metabolismo oxidativo causam danos nas macromoléculas, que estão ligados ao processo de envelhecimento. Esse processo é caracterizado por um desequilíbrio entre EROs e antioxidantes, favorecendo os oxidantes que causam EO e resultando em danos moleculares e interrupção da sinalização e regulação redox (SHARMA; MEHDI, 2023; VONA et al., 2019). A longo prazo, a exposição ao estresse oxidativo pode implicar no aparecimento de doenças crônicas como aterosclerose, diabetes, distúrbios degenerativos e câncer (POMPELLA et al., 2014; ROSENFELDT et al., 2013). O acúmulo de dano oxidativo intracelular está relacionado ao envelhecimento da célula *in vitro* e conseqüentemente à diminuição do potencial de proliferação e diferenciação (RAO; MATTSON, 2001; SHARIFI-RAD et al., 2020).

Produtos de glicação avançada, compostos formados a partir de reações não enzimáticas entre grupamentos amino e carbonilo, produzem moléculas bioativas que podem resultar em modificações intracelulares de proteínas. Isso inclui até mesmo o envolvimento na regulação da expressão gênica, pois têm a capacidade de modificar proteínas que circulam no sangue. Essas proteínas, quando ativadas fazem com que as células endoteliais produzam citocinas inflamatórias, aumentando o EO e a inflamação, e quando presente na população idosa, aumenta a disfunção endotelial, sarcopenia e redução da força muscular (BANERJEE et al., 2019; GRADINARU et al., 2015; GUSTI et al., 2021).

O papel da peroxidação lipídica é muito importante, pois está envolvida em uma variedade de condições patológicas, como disfunção da membrana, causando redução da fluidez e inativação de enzimas e receptores ligados à membrana. Isso ocorre como alvo de um radical livre, eliminando o hidrogênio de um grupo metileno em um ácido graxo, o que resulta na formação de um peróxido lipídico, no qual reage com o oxigênio para formar o radical peroxil lipídico. Ele ainda sofre reação de ciclização para produzir endoperóxidos e de 4-hidroxi nonal (4-HNE) e malondialdeído (MDA). A prova amplamente citada para o papel dos radicais livres nas doenças humanas é um aumento na concentração de produtos da peroxidação lipídica ao ponto de gerar desregulação (ANGELOVA; ESTERAS; ABRAMOV, 2021; BANDEIRA et al., 2013; KATO et al., 2021).

Observa-se maior sensibilidade ao dano peroxidativo lipídico à medida que se envelhece, ainda que seja feita a ingestão adequada de antioxidantes exógenos. Os níveis de MDA são usualmente utilizados como biomarcadores de peroxidação. Estudos mostram que o GSH oxidado, quando expressivamente baixo, apresentou-se determinante como estado antioxidante comprometido em idosos, além de SOD estar diminuído no tecido e no sangue de diabéticos e idosos (SHARMA; MEHDI, 2023).

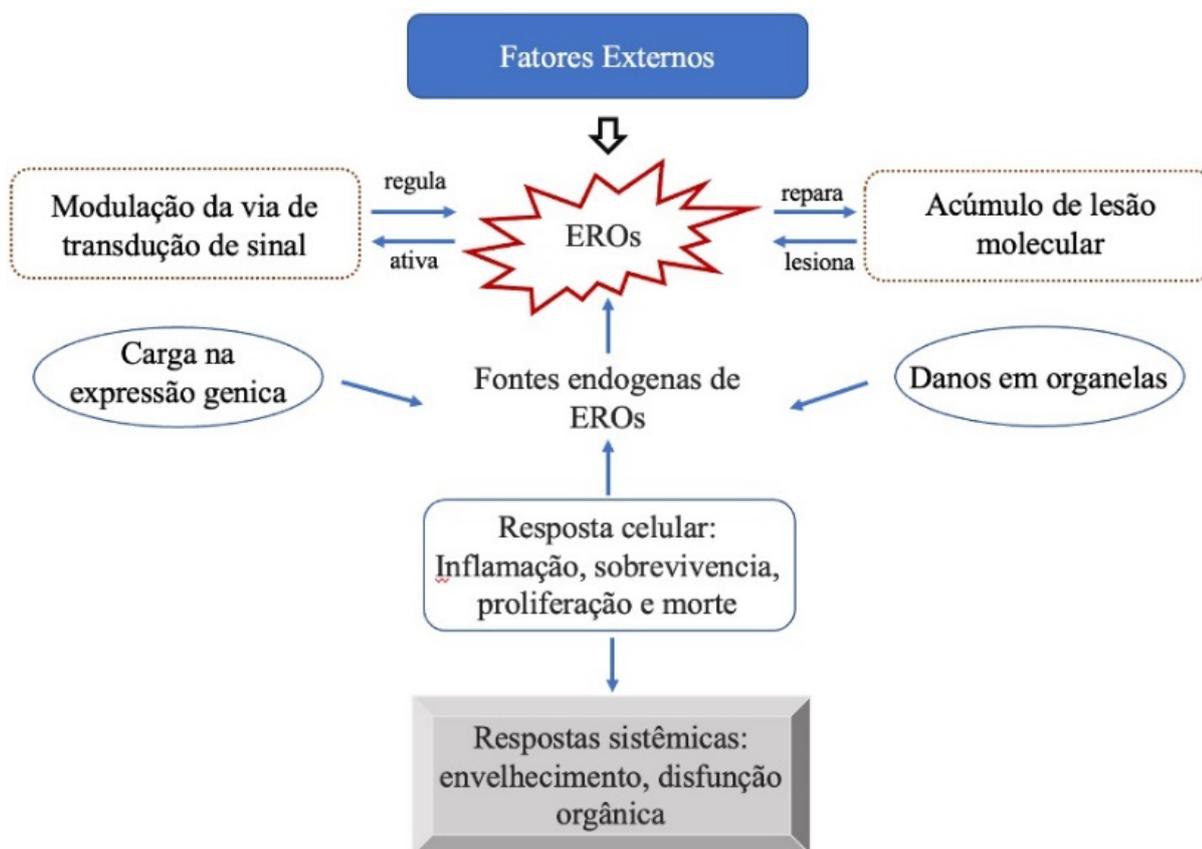
Ao mesmo tempo que mecanismos de sinalização de níveis baixos de EROs podem aumentar a longevidade, níveis mais elevados podem hiper ativar vias que levam ao estresse oxidativo e promover inflamação, resultando em um fenótipo de envelhecimento acelerado e que contribui para o desenvolvimento de doenças crônicas (LIPINA; HUNDAL, 2016). As EROs mitocondrial também podem impulsionar a produção de citocinas pró-inflamatórias e vice-versa (NAIK; DIXIT, 2011; TSE et al., 2007; ZUO et al., 2019) onde essa interação permite que essas moléculas atuem como uma combinação prejudicial capaz de alimentar um estado pró-inflamatório que contribui para o processo de envelhecimento (WEI et al., 2023).

Estudos mostram que EROs são capazes de atuar como moléculas de transdução de sinal em um estado pró-inflamatório. Contudo, quando estão em níveis baixos podem provocar regulação muito baixa de subconjuntos de citocinas pró-inflamatórias por meio de vias moleculares distintas. Essas considerações sobre a origem e o desenvolvimento da interação ERO/citocinas são essenciais para entender os mecanismos de suas interações e as formas pelas quais sua inter-relação é capaz de influenciar tanto o sistema redox e o estado pró-inflamatório (WEI et al., 2023). É importante ressaltar que as citocinas pró-inflamatórias e as EROs parecem ter funções dependentes do contexto. Em relação ao papel patogênico, condições contextuais caracterizadas por uma redução das defesas antioxidantes celulares, as quais diminuem durante o envelhecimento, podem determinar um aumento de EROs, causando danos moleculares, celulares e teciduais. De igual modo, o excesso de EROs pode ativar vias de sinalização pró-inflamatórias com a liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas. O estresse oxidativo e os estados pró-inflamatórios, coadunados, podem acelerar o ritmo do envelhecimento, tornando possível o aparecimento de doenças relacionadas ao envelhecimento (WEI et al., 2023).

Níveis basais equilibrados de EROs, sobretudo quando associados a níveis muito baixos de citocinas pró-inflamatórias, podem desempenhar um papel importante na homeostase (POMATTO; DAVIES, 2017; ZHANG et al., 2022). Isso ocorre porque ativam e regulam as vias de sinalização envolvidas em várias funções fisiológicas basais e adaptativas, capazes de prevenir ou retardar a inflamação evidente. A importância desses níveis basais equilibrados de

EROs e citocinas pró-inflamatórias na homeostase sobre o envelhecimento saudável é substanciada, pois há um declínio lento e progressivo na própria homeostase adaptativa à medida que o envelhecimento progride. Isso altera as condições saúde e tornando-se um potencial contribuinte a senilidade. a depender da idade e aumento do risco de doenças (POMATTO; DAVIES, 2017).

Figura 5. Mecanismo proposto pelo qual as EROs e o estresse oxidativo podem contribuir para o processo de envelhecimento.



Fonte: Adaptada de *Oxidative stress, inflammation and hormesis: The role of dietary and lifestyle modifications on aging*, Sharma & Mehdi, 2023.

Na Figura 5, é possível observar pelo desequilíbrio dos mecanismos antioxidantes e da produção de radicais livres, a atuação pela qual o estresse oxidativo e as EROs contribuem para o processo de envelhecimento, onde esse processo leva a alterações celulares e teciduais, resultando na perda de função e aumento do risco de doenças relacionadas à idade. Os efeitos do envelhecimento podem ser discutidos e observados em diversos níveis fisiológicos, embora muitos indivíduos não desenvolvam doenças durante o envelhecimento.

O estabelecimento de um estado pró-inflamatório sistêmico crônico de baixo grau a longo prazo facilita a progressão para o desenvolvimento de doenças relacionadas ao envelhecimento, como doenças cardiovasculares, neurológicas, comprometimento cognitivo, doenças respiratórias, sarcopenia e desnutrição (GIUNTA, 2006; SONG; MIAO; SONG, 2014; ZUO et al., 2019).

Sendo assim, o momento e a dosagem dos tratamentos antioxidantes são importantes, pois, é possível interferir na sinalização fisiológica das EROs, podendo ser inúteis ou mesmo prejudiciais ao indivíduo (LI; FASIPE; LAHER, 2022; SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

1.4. Sistema Muscular

A homeostase muscular se mantém através de um balanço altamente delicado e é coordenada diretamente e indiretamente pelo sistema nervoso central, sistema endócrino e sistema imunológico. Quando relacionada ao envelhecimento, incontáveis fatores associam-se à perda de massa muscular. É possível exemplificar esses fatores como alterações no neurônio motor- α na efetividade do comando neural, atrofia das fibras musculares tipo I, persistência da elevação de citocinas pró-inflamatórias como *IL-1* e TNF (EBNER et al., 2014), diminuição de IGF1-GH, aumento do estresse oxidativo (MORLEY et al., 2001) e a incapacidade do organismo de manter a homeostase de síntese e degradação muscular. Dessa forma, pode ocorrer o aumento da degradação ou a diminuição da síntese proteica (GUILLET et al., 2004; RASMUSSEN et al., 2006).

A força e a massa muscular atingem seu auge no início da idade adulta e sua diminuição acontece após os 40 anos, com um declínio ainda mais acentuado a partir dos 50 anos de idade. Além disso, é possível observar que, durante o período de 20 anos a 90 anos, pode ocorrer uma diminuição de até 50% na massa muscular (DENNISON; SAYER; COOPER, 2017). A perda da massa muscular tem um papel fundamental na saúde do idoso, pois associa-se à inatividade física, diminuição da velocidade de marcha e mobilidade (FRIED et al., 2001).

O termo sarcopenia, a princípio, foi definido como a diminuição da massa muscular relacionada ao envelhecimento (EVANS, 1995), tornando-se mais abrangente e atualmente utilizado como uma síndrome caracterizada pela perda progressiva e generalizada da força e da massa muscular esquelética (ADAMO; FARRAR, 2006; CRUZ-JENTOFT et al., 2010). A sarcopenia aumenta o risco de hospitalização e eleva os custos de cuidados hospitalares, tornando-se um encargo significativo na família e nos sistemas de saúde (CRUZ-JENTOFT et al., 2010). Calcula-se que a sarcopenia acomete anualmente cerca de 50 milhões de pessoas no

mundo (FRONTERA; RODRIGUEZ ZAYAS; RODRIGUEZ, 2012). Ela atinge 30% dos idosos com 65 anos ou mais, e 50% a partir dos 80 anos (CHEN et al., 2010). Essa condição influencia negativamente a saúde geral e qualidade de vida, pois está associada ao aumento de incidência de morbidades (hipertensão, obesidade, osteoporose), aumento do risco de quedas e fraturas, perda de independência, prejuízos na capacidade funcional e aumento do risco de morte (TRAMPISCH et al., 2012; WOODS et al., 2011).

A inflamação crônica de baixo grau é considerada uma causa importante da perda de massa muscular relacionada ao envelhecimento. Estudos apontam níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias circulantes, como o *IL-6* e TNF em casos de sarcopenia em idosos (CALVANI et al., 2015; PEDERSEN et al., 2003; RONG et al., 2018) e a presença contínua e crescente de citocinas inflamatórias, adipocinas e miocinas no soro durante o envelhecimento, e, quando somadas a condições de fatores de risco tornam o músculo mais vulnerável ao desenvolvimento de sarcopenia (CALVANI et al., 2015).

A regulação negativa do IGF-1, um importante mensageiro do hormônio de crescimento, está associada à sarcopenia por meio da inflamação (CHUNG et al., 2009). Fatores inflamatórios, como TNF- α e *IL-6*, também estão ligados à diminuição da massa, força e qualidade muscular, como demonstrado por Belizario e colaboradores (2016). Ademais, observaram que a exposição prolongada à *IL-6* em níveis elevados pode causar degradação das fibras musculares, além de mediar o catabolismo e diminuição do tecido muscular (BELIZÁRIO et al., 2016) e altos níveis de *IL-6* sérico encontrados na inflamação crônica podem contribuir para a sarcopenia (LI et al., 2019; RONG et al., 2018; WANG, 2022).

A citocina anti-inflamatória *IL-10* pode inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como *IL-6*, além da função de macrófagos e monócitos humanos (PAN et al., 2021b). Em uma análise transversal, nas concentrações séricas em pacientes idosos com sarcopenia, foi observada uma relação positiva entre os níveis de *IL-6* e *IL-10*, bem como as razões *IL-6/IL-10* e a sarcopenia. O mecanismo potencial por trás dessa relação é de que a citocina pró-inflamatória *IL-6* é elevada em resposta a uma condição pró-inflamatória persistente, não obstante, é compensada em parte pelo aumento compensatório da citocina anti-inflamatória *IL-10*. No entanto, a elevação de *IL-10* não é suficiente para compensar totalmente o aumento de *IL-6*, e a condição pró-inflamatória se torna dominante em idosos com sarcopenia (RONG et al., 2018).

A secreção de TNF- α também pode ter impacto negativo na força e massa muscular durante o processo de sarcopenia em indivíduos idosos (BELIZÁRIO et al., 2016), onde níveis mais altos de TNF- α (>11,15 pg/mL) aumentam o risco de sarcopenia em 7,6 vezes em

comparação com o grupo controle (LI et al., 2019). Além disso, camundongos selvagens de 24 meses de idade apresentam níveis mais altos de TNF- α e diminuição da massa muscular em comparação com eles camundongos aos seis meses de idade. Embora muitos estudos sugiram que o aumento dos níveis de pode resultar em sarcopenia, o mecanismo detalhado de como a disfunção muscular é causada, ainda não é compreendido (WANG, 2022). Esses resultados sugerem que a inflamação crônica pode estar envolvida na ligação entre envelhecimento e sarcopenia. Wang e colaboradores (2022) descrevem, em uma revisão, que a sarcopenia pode ser um controlador central da inflamação, criando um ciclo vicioso (LIANG et al., 2022; WANG, 2022).

A síntese muscular é ativada pelo fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), que se liga ao receptor IGF1, desencadeando a ativação de uma via de sinalização incluindo PI3k-Akt e o alvo mamífero da rapamicina (mTOR), que por sua vez fosforila S6 quinase e outros fatores (SCHIAFFINO; MAMMUCARI, 2011).

Evidências crescentes indicam que a *IL-6* pode atuar através da via de degradação muscular ubiquitina-proteossoma (DEJONG et al., 2005), sendo que o aumento da *IL-6* sistêmica está associado ao aumento da E3 ligase (WHITE et al., 2012) e proteína ubiquitina (DEJONG et al., 2005). Além disso, a *IL-6* pode induzir a resistência à insulina que suprime a atividade de Akt-mTOR, favorecendo a degradação proteica e inibindo a síntese muscular (FEBBRAIO et al., 2004; FRANCKHAUSER et al., 2008).

As modificações na dieta e no estilo de vida de um indivíduo desempenham um papel importante. O suporte nutricional é potencialmente considerado um passo essencial para prevenir a perda muscular e melhorar a função física em adultos com idade avançada (SHARMA; MEHDI, 2023).

1.5. Ômega-3

Os ácidos graxos são lipídios formados por cadeias longas de carbonos (C) com um grupamento carboxila (-COOH) em uma de suas extremidades e são uma das principais fontes de energia junto com a glicose e as proteínas. Eles são classificados de acordo com o tamanho da cadeia carbônica, o grau de saturação e a posição da primeira dupla ligação de carbonos. Os ácidos graxos de cadeia longa possuem de quatorze a vinte e quatro carbonos, de cadeia média de seis a doze carbonos e de cadeia curta apresentam de dois a quatro carbonos. São chamados de ácidos graxos saturados quando não possuem dupla ligação em suas moléculas, quando

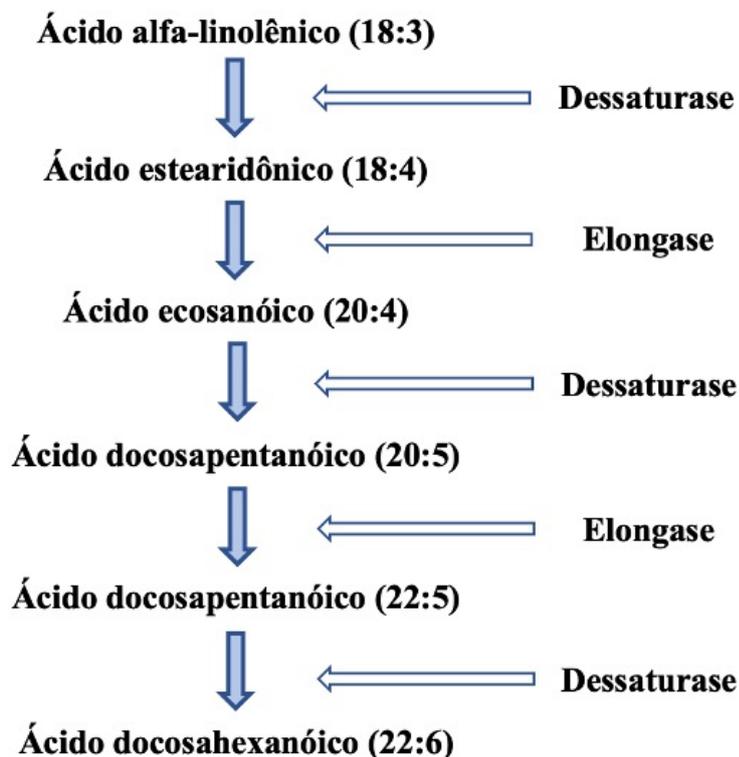
possuem dupla ligação são os monoinsaturados e quando possuem duas ou mais duplas ligações caracterizam os ácidos graxos poliinsaturados (CALDER, 2015; CALDER; YAQOOB, 2009).

Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) são classificados em ômega-3 (ω -3), ômega-6 (ω -6), ômega-7 (ω -7) e ômega-9 (ω -9). Essa classificação se dá de acordo com a localização da primeira dupla ligação com início do grupo metil terminal da molécula. O ω -6 (ácido linoleico) e ω -3 (ácido α -linolênico) quando metabolizados formam outros poliinsaturados como ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA). O ser humano é capaz de sintetizar ácidos graxos saturados das séries ω -7 e ω -9, chamados de não essenciais. Porém, ele não é capaz de sintetizar o ω -6 e ω -3, considerados ácidos graxos essenciais, se fazendo necessária sua ingestão através da alimentação (SMITH et al., 2015).

Os PUFAs fazem parte da composição da membrana celular e a incorporação dos ácidos graxos essenciais pode determinar alterações funcionais (como fluidez e cascatas de sinalização intracelulares) e estruturais da membrana fosfolipídica, como ação direta na superfície de membrana ou nos receptores intracelulares dos ácidos graxos. Tudo isso influencia alguns processos biológicos importantes, como a síntese de mediadores e reguladores inflamatórios que incluem os eicosanóides (CALDER, 2017; CALDER; YAQOOB, 2009). O ômega-3 e ômega-6 são precursores dos eicosanóides reguladores das funções inflamatórias e imune, onde o ômega-6 está associado a respostas pró-inflamatórias e o ômega-3 está associado a potentes mediadores anti-inflamatórios (CALDER, 2015; CALDER; YAQOOB, 2009).

As vias de síntese de eicosanóides são mediadas pelas enzimas ciclooxigenase (COX) que produzem prostanóides (tromboxanos, prostaglandinas) e lipoxigenase (LOX) produtores de leucotrienos e lipoxinas. Por sua vez, o ômega-3 pode ser convertido em EPA e DHA (Figura 6) (CALDER, 2012). Estes, por sua vez, competem com o AA pelas vias enzimáticas da COX e da LOX, formando eicosanóides (CALDER, 2017). Os eicosanóides produzidos pelos PUFA ômega-3 têm poder anti-inflamatório e podem modular a produção de citocinas (CALDER, 2015, 2017).

Figura 6. Metabolismo do ácido graxo poliinsaturado ômega 3.



Fonte: Adaptada de *Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids from Algae*, Khan 2015.

Os PUFAs ômega-3 têm papel significativo na produção desses mediadores e elevam os níveis circulantes de mediadores pró resolução específicos (SOUZA et al., 2020). Os principais mediadores lipídicos anti-inflamatórios e pró-resolução abrangem as resolvinas da série E do ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5 n-3) e as resolvinas, protectinas e maresinas da série D do ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6 n-3). Tais mediadores são neutralizados pelos PUFAs ômega-6, especialmente o ácido araquidônico (AA, C20:4 n-6) e seus produtos bioativos, como leucotrienos e prostaglandinas (BRASH, 2001; SOROKIN et al., 2023).

Diversos mecanismos estão envolvidos no resultado do PUFA ômega-3 na inflamação. A supressão da ativação de NFκB, que regula a geração de células T inflamatórias, é um exemplo desses mecanismos. De igual modo, já foi demonstrado que a expressão gênica de COX2 é inibida pelos PUFA ômega-3. Além disso, estudos demonstraram que o EPA e o DHA podem influenciar as respostas do sistema imunológico inato, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (JEON et al., 2017; KAVYANI et al., 2022; WAN et al., 2018).

Atualmente, realiza-se uma crescente investigação sobre os efeitos do ácido graxo ômega 3 e a melhora da biodiversidade da microbiota. Estudos mostram que a suplementação diária de ômega 3 levou a um aumento no filo de Firmicutes e a uma diminuição simultânea de

bacteroidetes e actinobacteria (SANTORO et al., 2020). Ocorre uma redução na capacidade de absorção dos nutrientes, quadro encontrado em pacientes com doença inflamatória intestinal, quando acontece o desequilíbrio da flora bacteriana intestinal pelo aumento de bacteroidetes e actinobactérias (COSTANTINI et al., 2017; RADZIKOWSKA et al., 2019). Estudos em modelo animal mostraram que a administração prolongada de EPA/DHA pode levar a um efeito anti-inflamatório benéfico associado a uma restauração da composição da microbiota intestinal (GANESH et al., 2013; PUSCEDDU et al., 2015). Acredita-se que alguns distúrbios metabólicos estejam relacionados à inflamação da microbiota intestinal, pois a interação entre microbiota intestinal, ácidos graxos ômega-3 e imunidade ajuda a manter a integridade da parede intestinal e interage com as células imunes (COSTANTINI et al., 2017).

Estudos demonstram que o uso de ácido graxo ômega 3 reduz a produção de TNF- α e de *IL-1* após sua estimulação em monócitos, macrófagos e linfócitos (MILES; CALDER, 2012; RADZIKOWSKA et al., 2019). No caso do TNF- α , aparenta inibir o deslocamento do NF κ B (Fator Nuclear *Kappa B*), presente no citoplasma, para o núcleo da célula, coibindo a síntese do TNF- α (BABCOCK et al., 2002; MILES; CALDER, 2012), interferindo não somente na via metabólica dos eicosanóides, bem como na produção das citocinas (CALDER, 2012; MILES; CALDER, 2012).

Para a *Food and Drug Administration* nos EUA, são indicadas doses diárias de até 3 g/dia de EPA e DHA, já para a União Europeia da Segurança, são indicadas até 5 g/dia do mesmo produto (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2012). Revisões de literatura sobre ácido graxos ômega-3 e suas importantes funções no organismo, têm demonstrado que o consumo de 500 mg/dia de EPA e DHA, provenientes de peixe e consumo de linhaça e óleo de linhaça, nozes e óleo de noz e óleo de canola como fontes da ALA, reduz o risco de doença cardiovascular (GEBAUER et al., 2006). E, para tratar doenças cardiovasculares existentes, recomenda-se 100 mg/dia de EPA e DHA a partir de suplementos de óleo de peixe (RUSSO, 2009).

Um estudo publicado por Cruz Alves e colaboradores teve como objetivo investigar o efeito da suplementação de ácido graxo poliinsaturado ômega-3 por 14 semanas na resposta do treinamento com exercícios resistidos progressivos em idosas sarcopenias sedentárias. Os autores observaram que o uso da suplementação potencializou a resposta neuromuscular ao estímulo anabólico do treinamento, aumentando a força muscular e o desempenho físico em idosas sarcopênicas (CRUZ ALVES et al., 2022). Outro estudo comparou a relação neutrófilo-linfócito, um importante biomarcador de inflamação sistêmica e utilizado para medir o equilíbrio do sistema imune inato-adaptativo, com o índice ômega-3 (quantidade de EPA +

DHA) no sangue de 28871 adultos. Os resultados demonstraram que os níveis de EPA + DHA estão inversamente associados à relação neutrófilo-linfócito, indicando que o equilíbrio entre os sistemas imunes inato e adaptativo está diretamente associado aos níveis do índice ômega-3 (MCBURNEY; TINTLE; HARRIS, 2022). Não obstante, o baixo nível de EPA + DHA no sangue ou uma elevada relação neutrófilo-linfócito estão associados ao aumento do risco de doenças crônicas e mortalidade.

Camacho-Muñoz e colaboradores, com a finalidade de verificar a capacidade do ômega 3 em atenuar os fenótipos inflamatórios promovidos pela dieta ocidental, conhecida por ser altamente calórica, descobriram que a suplementação com n-3PUFA reduziu as concentrações de ceramidas em tecidos adiposos e plasma, além de promover os subconjuntos de Treg supressoras. Dessa forma, preconiza que a ingestão de n-3PUFA pode diminuir parcialmente alguns dos efeitos prejudiciais da dieta ocidental, melhorando a inflamação de baixo grau associada à doença metabólica imune (CAMACHO-MUÑOZ et al., 2022).

Kavyani e colaboradores (2022) objetivaram avaliar a eficácia dos n-3 PUFAs em reduzir biomarcadores inflamatórios em adultos com diferentes condições de saúde. Ao realizar uma metanálise, observaram que a suplementação com ômega-3-PUFAs pode diminuir os níveis séricos de TNF- α , *IL-6* e PCR. Dessa forma, pacientes com doenças cuja patogênese está relacionada à inflamação crônica, como câncer, doenças renais, doenças cardíacas e diabetes mellitus, podem se beneficiar da suplementação (KAVYANI et al., 2022). Outra metanálise que teve como objetivo investigar as evidências sobre os impactos potenciais da ingestão oral de ácidos graxos ômega-3 na expressão gênica de fatores relacionados à inflamação e estresse oxidativo e parâmetros cardiometabólicos, evidenciou que a ingestão de PUFA ômega-3 levou a uma regulação positiva significativa da expressão do gene PPAR-gama e regulação negativa da expressão gênica de LDLR e *IL-1*. Acredita-se que o efeito benéfico dos ácidos graxos ômega-3 no metabolismo da glicose e lipídios, estresse oxidativo e inflamação pode ser justificado por seu efeito na expressão gênica (HESHMATI, 2021; LIU et al., 2021).

A literatura ainda apresenta que mecanismos pelos quais os ácidos graxos ômega-3 mantêm a homeostase corporal, fornecem proteção contra várias doenças crônicas e metabólicas por meio da melhora da produção de eicosanoides anti-inflamatórios; inibição da produção de moléculas de adesão; limitação da produção e a atividade de mediadores inflamatórios e melhora da captação de glicose e a regulação hipotalâmica (KHAN et al., 2022; LIU et al., 2021). Mas há a necessidade de uma melhor e mais aprofundada compreensão sobre as melhores dosagens e tempo de suplementação.

1.6. Modelo Animal

Como discutido anteriormente, o envelhecimento é caracterizado por um aumento na concentração de marcadores inflamatórios e isso é considerado uma causa importante de diversas doenças relacionadas a idades avançadas (PAN et al., 2021). Existem investigações aplicando modelos de roedores que apresentam tal condição, permitindo o desenvolvimento de condições experimentais controladas para entender o início e progressão, tanto do envelhecimento quanto da inflamação crônica de baixo grau.

São utilizados modelos de animais manipulados para que mimetizem o envelhecimento, uma vez que a reprodução do envelhecimento de forma natural em animais cobaias se torna difícil de realizar devido ao longo tempo de espera e de sua alta taxa de mortalidade. Existem alguns modelos conhecidos como animais com envelhecimento induzido pela D-galactose (D-gal) (HSIEH; WU; HU, 2011) e modelos de animais propensos a senescência acelerada 8 (SAMP8) (TAKEDA; HOSOKAWA; HIGUCHI, 1997). Ambos são frequentemente utilizados para estudar funções cognitivas. Ademais, camundongos *knockout* são utilizados para estudos com interleucina 10 (*IL-10*) (WALSTON et al., 2008), o que foi utilizado neste trabalho.

O camundongo *knockout* (KO) para *IL-10* foi inicialmente desenvolvido como modelo de doença inflamatória intestinal (KUHN et al., 1993). Por conta do *knockout*, ele não produz uma importante citocina anti-inflamatória, a *IL-10*, o que resulta em um estado inflamatório crônico caracterizado pelo aumento da expressão de mediadores inflamatórios induzidos pelo NF-KB (WALSTON et al., 2008).

Esse modelo começou a ser utilizado para mimetizar uma condição comum no envelhecimento, a síndrome da fragilidade. Como descrito na literatura, a inflamação crônica, o envelhecimento e o fenótipo de fragilidade estão interligados. Walston e colaboradores demonstraram que camundongos C57BL/6 *IL-10* KO simulam o modelo de fragilidade e inflamação quando comparados a animais do tipo selvagem, *Wild-Type* (WT) (WALSTON et al., 2008). Para isso, foi avaliado a força, níveis séricos de *IL-6*, níveis de atividade, peso corporal e expressão gênica do músculo esquelético de camundongos fêmeas *IL-10* KO em comparação a camundongos WT. Os autores encontraram níveis séricos da citocina *IL-6* aumentados, diminuição da força muscular com o decorrer da idade, além do aumento da expressão de genes relacionados a mitocôndria e apoptose celular no músculo esquelético de animais *IL-10* KO (WALSTON et al., 2008).

Estudos demonstraram que níveis de outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF, *IL-1B* e IFNY estão aumentadas no soro de camundongos *IL-10* KO em comparação aos controles

WT (KO et al., 2016). Os camundongos *IL-10* KO apresentam hipertrofia cardíaca e lentidão no relaxamento cardíaco quando comparado aos controles (SIKKA et al., 2013). E, com o passar da idade exibem uma cinética de ATP diminuída no músculo esquelético (AKKI et al., 2014), além de apresentarem uma degradação mitocondrial reduzida no músculo esquelético (KO et al., 2016). Juntos, tais fatores podem estar por trás da fraqueza muscular esquelética, característica desse modelo (WALSTON et al., 2008).

A inflamação crônica e a incapacidade do organismo de manter a homeostase da síntese proteica resulta em graves complicações, prejudicando a função física e gerando desfechos negativos. Portanto, nas últimas décadas houve aumento no número de estudos que buscam melhores intervenções. Evidências sugerem que os ácidos graxos ômega-3 pode ser um potencial agente terapêutico para a prevenção e tratamento da sarcopenia (GINGRAS et al., 2007), está ligado a uma melhora de estresse oxidativo em tecidos como o fígado (FANG; YANG; WU, [s.d.]; RICHARD et al., 2008) e possuem propriedades anti-inflamatórias (CALDER, 2015; FETTERMAN; ZDANOWICZ, 2009). Desta maneira, encontrar caminhos compartilhados para esses temas é de grande importância para novas intervenções com resultados mais precisos e diretos.

2. JUSTIFICATIVA

Faltam evidências que sustentem o tratamento através da suplementação com ácido graxo ômega-3 em idosos que apresentam quadro de inflamação crônica de baixo grau. A escolha desse tema é motivada pela relevância crescente de estudos que utilizam tal suplementação para fins antioxidantes e anti-inflamatórios, pois este já é conhecido por seus potenciais benefícios à saúde, mas falta compreender melhor sua influência quanto em um estado de inflamação e alterações no sistema imunológico característico do envelhecimento.

Tendo em vista a dificuldade de diagnóstico e monitoramento de idosos com “*inflammaging*” e a necessidade de biópsias como padrão-ouro, estudos in vivo que mimetizem o quadro de inflamação crônica de baixo grau podem oferecer uma forma adequada para investigar tal tema. A ausência da interleucina-10 (*IL-10*) em camundongos pode impactar significativamente as respostas em diferentes tecidos e órgãos, como respostas imunológicas, hepáticas e musculares, e a suplementação com ácido graxo ômega-3 tem sido associada a efeitos anti-inflamatórios e moduladores do sistema imunológico. No entanto, os mecanismos específicos dessas interações em camundongos knockout *IL-10* ainda não foram completamente elucidados e compreender esses mecanismos oferece base para possíveis intervenções em seres humanos

Ao realizar esta pesquisa, espera-se preencher lacunas no entendimento dos efeitos da suplementação com ácido graxo ômega-3 em um contexto de inflamação. Os resultados podem fornecer insights cruciais sobre como a intervenção dietética pode modular a resposta imunológica, hepática e muscular nesse cenário específico. A abordagem metodológica incluirá análises detalhadas dos parâmetros imunológicos, hepáticos e musculares, utilizando técnicas avançadas de biologia molecular, histologia e avaliações funcionais.

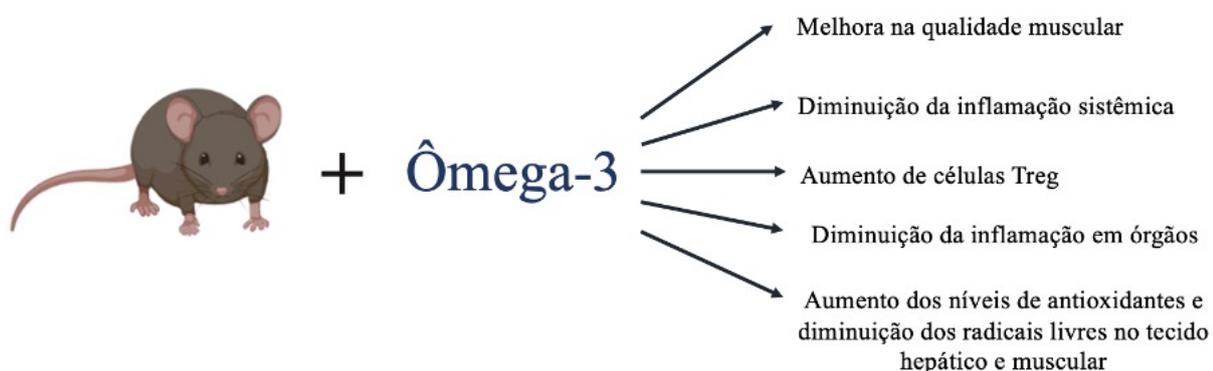
Os resultados desta pesquisa podem ter implicações significativas não apenas para a compreensão científica desses processos, mas também para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas potenciais. Portanto, o presente estudo visa contribuir para o avanço do conhecimento nessa área, potencialmente abrir novas perspectivas para intervenções terapêuticas baseadas em suplementação dietética em condições específicas de inflamação e propiciar uma referência para estabelecer novos padrões para a prevenção, diagnóstico e tratamento precoce no momento que for comprovado seus benefícios.

HIPÓTESE

3. HIPÓTESE

Está demonstrado na literatura que o uso do ácido graxo ômega-3 potencializa a resposta muscular ao estímulo anabólico do treinamento. Quando isso ocorre, potencializa a força muscular e o desempenho físico em idosas sarcopênicas, além de melhorar o quadro de inflamação de baixo grau associada à doença metabólica imune e níveis de antioxidantes. Por isso, formulou-se a hipótese de que a suplementação com ômega-3 melhoraria o estado de inflamação sistêmica crônica de baixo grau, encontrado no envelhecimento, através da ação de células e moléculas anti-inflamatórias e regenerativas em camundongos que têm por característica o estado inflamatório crônico associado ao desenvolvimento de fragilidade, descrito na Figura 7.

Figura 7. Hipótese de melhora após o consumo do ômega-3 na dieta dos camundongos.



Fonte: Campanari, Daniela Dalpubel (2024).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

Investigar eficácia da suplementação com óleo de peixe ômega-3 na melhora da resposta imunológica, hepática e muscular em camundongos *knockout IL-10*.

4.2. Objetivos específicos

- Entender se a suplementação dietética com ômega-3 influencia no ganho de massa dos animais;
- Avaliar o quadro das citocinas inflamatórias (IL-6, IL-1B, TNF- α) no soro após a suplementação de ômega-3;
- Avaliar se o peso do fígado e dos músculos tibial anterior, extensor digital longo, sóleo e gastrocnêmico sofre alteração após a suplementação dietética com ômega-3;
- Entender a relação entre a suplementação de ômega-3 nos parâmetros antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo no tecido hepático e no tecido muscular;
- Entender o quadro histopatológico de fragmentos de músculo, fígado e intestino delgado após a suplementação dietética com ômega-3;
- Avaliar se a suplementação dietética com ômega-3 influencia no perfil de citocinas (IL-6, TGF- β) preexistente nos linfonodos mesentéricos;
- Caracterizar a população de linfócitos T reguladores (Treg) nos linfonodos mesentéricos após a suplementação dietética com ômega-3.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

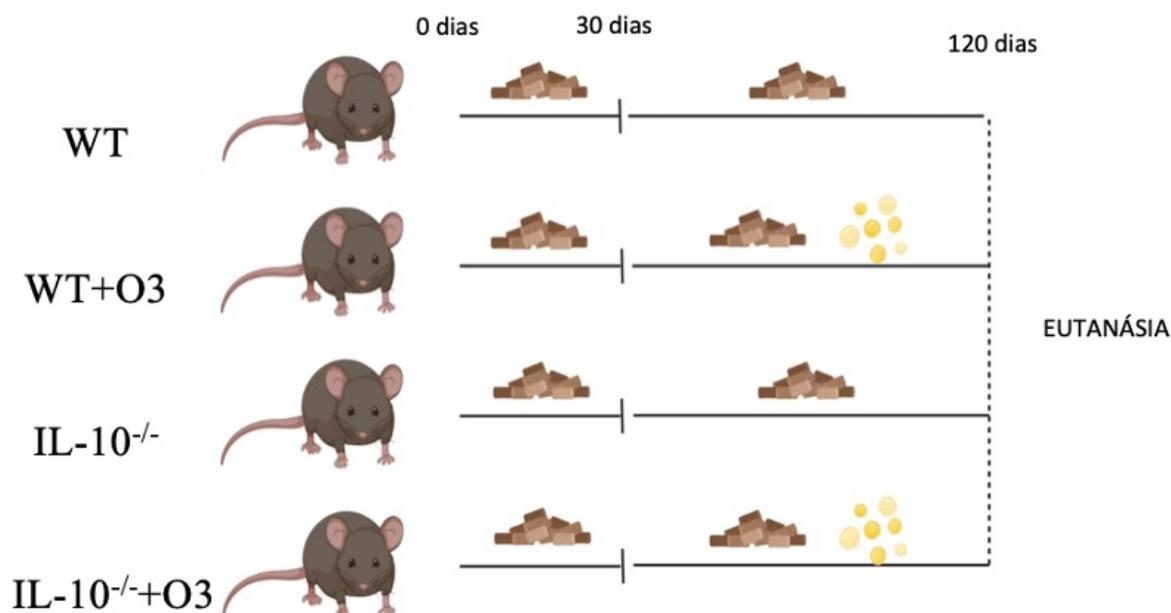
5.1. Animais

Neste estudo, foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 selvagens (WT) e homozigotos *knockouts* para interleucina IL-10 (B6.129P2-Il10^{-/-}) com aproximadamente quatro semanas, aclimatados a 22°C, no ciclo claro/escuro de 12/12h. Eles foram obtidos no Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB-USP e criados em condições livres de patógenos. Sua dieta de ração e água foram oferecidas ad libitum. A limpeza das gaiolas e pesagem desses animais foram realizadas semanalmente. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do comitê de ética do Instituto de Ciências Biomédicas/USP e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo sob o protocolo n°0247/2019.

5.2. Dieta dos animais

Os animais WT e IL-10 KO receberam suas respectivas dietas durante 90 dias, seguindo as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93M) para roedores (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) (Figura 8).

Figura 8. Delineamento do protocolo de dieta controle e dieta com suplementação. WT animais controle sem suplementação; WT O3 animais controle com suplementação; KOIL-10 animais KO sem suplementação; KOIL-10 O3 animais KO com suplementação.



Fonte: Campanari, Daniela Dalpabel (2024).

Os grupos controle receberam uma dieta normolipídica de acordo com o AIN-93M (GC) e o grupo ômega-3, obteve uma dieta com suplementação (GO3), como descrito na Tabela 1. O suplemento de óleo de peixe ômega 3 (Naturalis[®] - registro no Ministério da Saúde número 4.1480.0006.001-4) foi adquirido diretamente no site do fabricante (cada 1g de óleo de peixe continha 540 mg de EPA e 100 mg de DHA). As dietas foram pesadas e repostas três vezes por semana (MOURA-ASSIS et al., 2018).

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina diluídas em soro fisiológico, 100 mg/kg e 10 mg/kg de peso, respectivamente, administrados por via intraperitoneal. O sangue foi imediatamente coletado por punção cardíaca e centrifugado a 3.500 rpm a 4°C para posterior separação do soro. O soro foi armazenado a -80°C para análise posterior. Os tecidos hepático e muscular foram coletados, pesados e congelados a -80°C; o tecido do intestino delgado foi coletado e fixado em formalina tamponada a 10%, e os linfonodos mesentéricos foram coletados e armazenados para posterior análise.

Tabela 1. Comparação das dietas AIN-93M.

Ingredientes	Grupo Controle (g/kg)	Grupo Omega-3 (g/kg)
Óleo de soja (sem aditivos)	40	40
Ômega-3	-	40
Amido de milho	465,692	425,692
Amido Dextrinizado ^b	155	155
Caseína ^b	140	140
Sacarose	100	100
Fibra (celulose microfina) ^b	50	50
Mistura de minerais ^b	35	35
Mistura de vitaminas ^b	10	10
Cistina ^b	1,8	1,8
Bitartarato de colina ^b	2,5	2,5
Tetrabutyl Hidroquinona ^b	0.008	0.008

a. Proteína de soja isolada (ISP SUPRO 783, Tovani Benzaken, Brasil). B. Amido Dextrinizado, Caseína, Celulose microfina, Mix de vitaminas e minerais AIN93M, L-cistina, L-metionina, bitartarato de colina e tetrabutyl-hidroquinona (Rhooster, Brasil). Fonte: Reeves et al., 1993.

A porcentagem de nutrientes presentes na dieta dos animais está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagem de nutrientes por dieta.

Nutrientes	Grupo Controle	Grupo Ômega-3
Carboidrato (%)	75	65
Proteína (%)	15	15
Lipídeos (%)	10	20
Energia Total (Kcal/kg)	3800	4000

Fonte: Campanari, Daniela Dalpubel (2024).

5.3. Grupos experimentais do estudo

Os grupos experimentais, com o respectivo número de animais por grupos estão descritos a seguir:

Grupo controle (WT): camundongos WT com dieta normolipídica com 15 animais;

Grupo controle suplementado (WT+O3): camundongos WT com dieta suplementada com ômega-3 com 17 animais;

Grupo KOIL-10 (IL-10^{-/-}): camundongos KOIL-10^{-/-} com dieta normolipídica com 13 animais;

Grupo KOIL-10 suplementado (IL-10^{-/-} +O3): camundongos KOIL-10^{-/-} com dieta suplementada com ômega-3 com 14 animais.

5.4. Determinação dos parâmetros inflamatórios sistêmicos e cultura do sobrenadante de 48 horas

As citocinas IL-6 (LD: 15,6 pg/mL), TNF- α (LD:15,6 pg/mL) e IL-1 β (LD:15,6 pg/mL) foram determinadas no soro por meio do ensaio imunoenzimático, utilizando kits Opteia (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) ou DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), seguindo as instruções do fabricante.

A citocina IL-6 (LD: 15,6 pg/mL) e TGF-B (LD: 15,6 pg/mL) foi determinada no sobrenadante de 48 horas com adição de Concanavalina A (ConA) na cultura de linfonodos mesentéricos por meio do ensaio imunoenzimático, utilizando kits Opteia (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA) ou DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

5.5. Determinação dos parâmetros antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo

Para preparo dos tecidos para as análises, foi adicionado 100 μ L de solução tampão fosfato de sódio (Na₂HPO₄) em aproximadamente 100 mg de tecido. Esse tecido foi homogeneizado com micro homogeneizador MA1102 da marca Marconi e acrescentado a mesma solução tampão para completar o volume de 500 μ L. Essa solução foi agitada em vórtex AP 59 – Phoenix Lufenco e centrifugada 4000 R.P.M. por 5 minutos a 4°C. As análises a seguir foram realizadas com o sobrenadante dessa solução.

5.6. Determinação de proteína hepática

A determinação da proteína hepática foi realizada por kit comercial pelo Método de Biureto (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil) e a leitura realizada em espectrofotômetro Epoch – BioTek.

5.6.1. Determinação da glutathiona reduzida (GSH) hepática

A dosagem de GSH foi realizada no tecido hepático a partir do método descrito por Sedlak e Lindsay (1968), com pequenas adaptações. Uma alíquota de 50µL do homogenato foi misturada a 200µL de água deionizada, 50µL de ácido tricloroacético a 50% e 500µL EDTA 0,02M. Essa solução foi agitada em vórtex AP 59 – Phoenix Luferco. Após 15 minutos foi incubado à temperatura ambiente e novamente agitado, em seguida a amostra foi centrifugada por cinco minutos a 4000 R.P.M. a 4°C. Após a centrifugação, 250µL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionados 250µL de tampão TRIS (0,4M, pH 8,9), juntamente a 25µL de ácido ditionitrobenzóico a 0,01M em metanol. A solução foi homogeneizada e após cinco minutos, a leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 412 nm no espectrofotômetro Epoch – BioTek. A concentração foi calculada utilizando uma curva padrão de GSH em EDTA (0,02M) contra um branco composto por EDTA, TRIS e DTNB (ARNAUD et al., 1991; SEDLAK; LINDSAY, 1968).

5.6.2. Determinação de vitamina E hepática

As análises hepáticas de vitamina E (alfa-tocoferol) foram realizadas por cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), segundo método adaptado de Arnaud e colaboradores (1991). Em microtubos de 2 ml, foram homogeneizados cerca de 100 mg de tecido em 0,5 ml de etanol. Em seguida foi adicionado 0,5 ml de hexano e agitada em vórtex AP 59 – Phoenix Luferco por um minuto e centrifugada a 4000 R.P.M. durante cinco minutos na centrífuga Sorvall Legend Mach 1.6 R. Após centrifugação, 100µL da fase hexânica (sobrenadante) foram transferidos para outro microtubo, onde foi realizada a secagem com fluxo de nitrogênio, para que permanecesse no microtubo apenas a parte lipídica do material. Foi adicionado 100µL da fase móvel (70% acetonitrila, 20% diclorometano e 10% metanol) e agitados, para ressuspender a gordura. Logo após, todo o material foi transferido para o vial e analisado em HPLC Shimadzu, modelo LC-20AT, coluna tipo C-18 (250 x 4,6 mm – 5µm), detector UV-visível modelo SPD-20A. A concentração da vitamina E foi determinada a partir de uma curva padrão de alfa tocoferol (ARNAUD et al., 1991).

5.6.3. Determinação de glutathiona peroxidase (GPx) hepática

Para determinar a GPx, foi realizada uma adaptação do método proposto por Paglia e Valentine (1967). Em cubeta de 4 ml foi adicionado 1,8 ml de tampão fosfato e 6,7µL de azida sódica, em seguida a cubeta foi colocada em espectrofotômetro SpectraMax M3 – Molecular Devices a 37°C por 30 segundos. Foram adicionados 67µL de glutathiona reduzida, 67µL de NADPH, 2µl de glutathiona redutase e 67µL de amostra a esse material ainda a 37°C. A reação foi iniciada com a adição de 67µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A leitura cinética foi feita a 340 nm e a cada 30 segundos com duração de dois minutos totais. A concentração de GPx foi calculada a partir de seu coeficiente de extinção molar.

5.6.4. Determinação de malondialdeído (MDA) hepático

A análise de MDA hepático foi realizada de acordo com Erdelmeier e colaboradores (1998), com pequenas adaptações. Em um microtubo foram colocados 100µL do homogenato do tecido e 300µL de solução de 1-metil-fenilindol à concentração de 10mM em acetonitrila e metanol (2:1, v/v), em seguida foi agitado em vórtex AP 59 – Phoenix Luferco. Posteriormente adicionou-se 75µl de HCl fumegante (37%) e agitou novamente em vórtex. As amostras foram então incubadas em banho-maria a 45°C por 40 minutos e centrifugadas a 4000 r.p.m. a 4°C por cinco minutos. A leitura de absorvância do sobrenadante foi realizada em equipamento Epoch – BioTek, a um comprimento de onda de 586 nm e a concentração de MDA foi calculada comparando-a a uma curva padrão de MDA (ERDELMEIER et al., 1998).

5.6.5. Determinação do peso dos tecidos muscular e hepático

O tecido hepático e os músculos tibial anterior, sóleo, gastrocnêmio e extensor longo dos dedos foram excisados e pesados em uma balança de precisão para determinar sua massa.

5.7. Análise histopatológica

A análise histopatológica foi realizada conforme descrito por Prado e colaboradores (KLEINER et al., 2005; PRADO et al., 2015). Amostras de fígado, músculo tibial anterior e intestino delgado foram coletadas e fixadas em paraformaldeído 4% em PBS por 24 horas, com

posterior processamento para inclusão em parafina e corados com hematoxilina e eosina (H&E). Para o tecido hepático, foram coletadas amostras do lobo direito para determinação do grau de esteatose de zero a três, adaptado de Kleiner e colaboradores (2005). O grau representa esteatose de 0 até 5%, o grau 1 de 5 a 33%, o grau 2 de 33 a 66% e o grau 3 acima de 66% (KLEINER et al., 2005; PERRY et al., 2016). Para o músculo tibial anterior, a análise foi realizada utilizando a espessura das fibras musculares, onde houve separação entre normal e levemente diminuído. Para a análise do intestino delgado houve separação daqueles com e sem alterações nas criptas intestinais e microvilosidades (PERRY et al., 2016).

5.8. Cultura e imunofenotipagem das células do linfonodo mesentérico

As células dos linfonodos mesentéricos foram incubadas com os seguintes anticorpos marcados com fluorocromos (BD Horizon): anti-CD45-PE CY7 (clone 30-F11), anti-CD3 FITC (clone 145-2C11), anti-CD4 APC (clone RM4-5) para linfócitos T em geral, anti-IFN γ PE (clone XMG12) para Th1, anti-IL-17 PerCP Cy5.5 para Th17 e anti-Foxp3 PE (clone FJK-16s) para Treg. Para imunofenotipagem das células dendríticas utilizamos os anticorpos (BD): anti-CD45-PE Cy7 (clone 30-F11), anti-CD11c BB515 (clone N418), anti-MHC II BB700 (clone M5/114.15.2), anti-CD11b PE (M1/70) e anti-CD103 APC (clone M290). Após a marcação, as células foram lavadas e fixadas em paraformaldeído a 1%. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o citômetro de fluxo FACS Melody (BD Biosciences) no Departamento de Bioquímica e Imunologia (FMRP-USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e os dados foram analisados com o software FlowJo versão 10 (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

5.9. Análise estatística dos dados

As variáveis estudadas foram comparadas entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Bonferroni, quando aplicável. Apenas a variável FOXP3 foi comparada por ANOVA com pós teste de Bonferroni, pois a variável foi submetida à transformação log₁₀ antes da comparação por ANOVA (dados composicionais). Todas as análises e gráficos foram realizados pelo IBM SPSS versão 25.0 (IBM Corp. Armonk, EUA), e valores bilaterais de $p < 0,05$ indicaram diferença estatística.

6. RESULTADOS

6.1. Efeito da suplementação Ômega-3 no ganho de peso dos animais e ingestão de energia

Ao analisar o peso corporal dos animais no dia da eutanásia, observou-se que o grupo *IL-10^{-/-}* +O3 teve aumento de peso significativamente maior em relação ao grupo WT ($p=0,036$) e WT+O3 ($p=0,001$), mas não apresentou diferença entre seu grupo não suplementado ($p=0,251$) (Tabela 3).

Observando a variação de peso dos animais antes e após dieta, constatou que os grupos que receberam suplementação tiveram maior peso em comparação aos grupos que não receberam suplementação durante todo o período experimental, WT e WT+O3 ($p=0,006$) e *IL-10^{-/-}* com *IL-10^{-/-}*+O3 ($p=0,027$) (Tabela 3).

Ao avaliar a quantidade de alimentos consumidos, a ingestão foi semelhante entre os grupos e não apresentou diferença estatística.

Constatou-se que os animais *IL-10^{-/-}* com suplementação apresentaram aumento de peso consideravelmente maior em relação aos WT e WT+O3, mas sem diferença entre os animais *IL-10^{-/-}*. Porém, quando analisados os animais WT no início do experimento, os pesos dos dois grupos eram semelhantes, diferenciando no final, onde apresentou diferença substancial ($p=0,036$). Vê-se que os animais WT+O3 tiveram ganho de peso ($p=0,006$).

Tabela 3. Peso dos animais. Distribuição do peso inicial, final e delta peso entre os grupos IL-10^{-/-} +O3; IL-10^{-/-}; WT+O3 e WT.

Variáveis	IL-10 ^{-/-}		IL10 ^{-/-} +O3		WT		WT+O3		Kruskal-Wallis p-valor
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	
Peso Inicial	22.0	21.4 - 22.8	22.15	21.3 - 22.5	19.5	18.5 - 20.2	19.3	18.7 - 19.7	<0.001*
Peso Final	26.4	24.9 - 27.6	29.65	27.4 - 30.5	23.2	21.5 - 23.8	25.5	24 - 26.4	<0.001*
Delta Peso	4.3	3.5 - 4.9	7.45	5.5 - 8.7	3.9	2.2 - 4.7	6.5	4.9 - 8.2	<0.001*

Bonferroni pós-teste (p-valor)

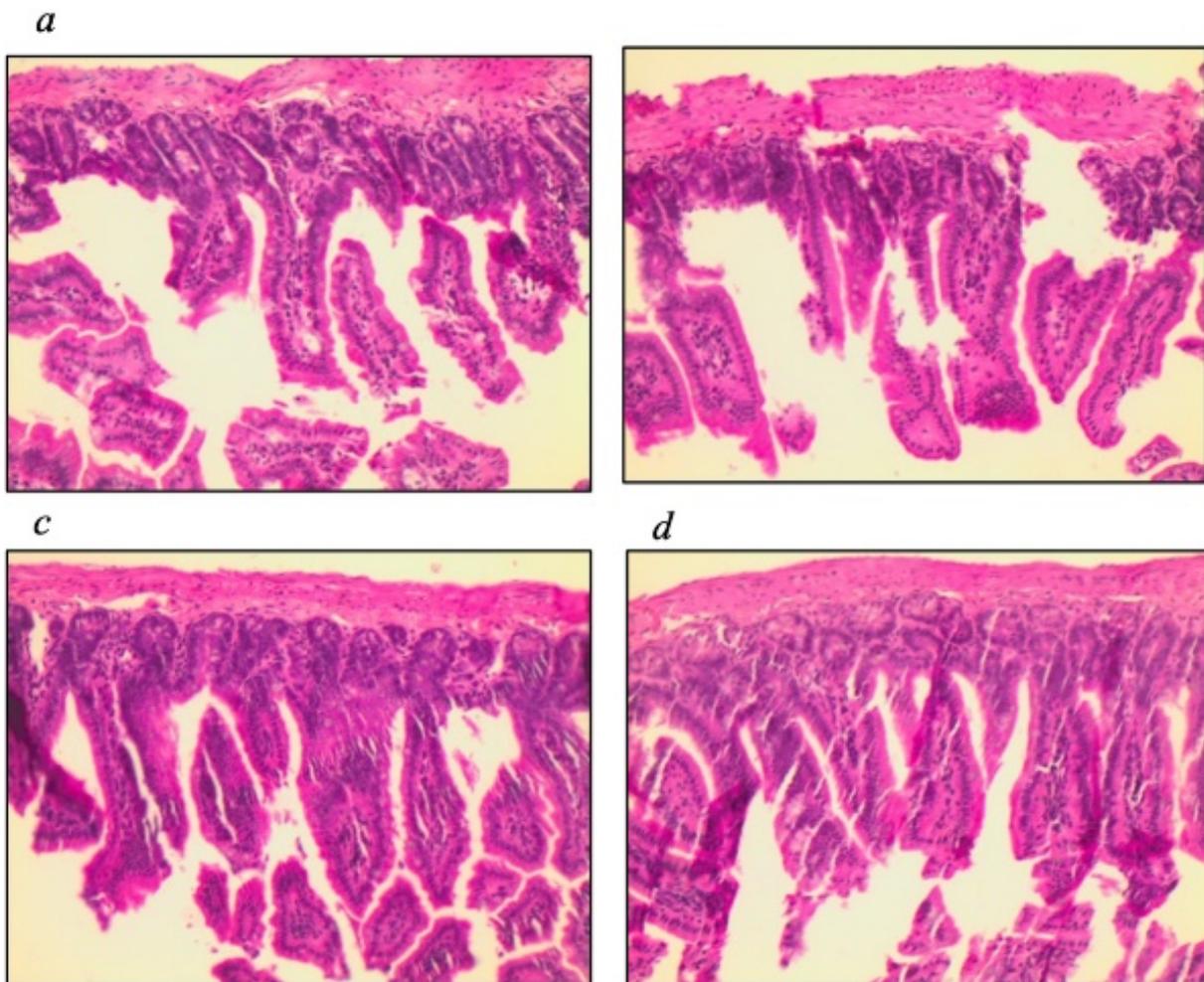
	IL-10 ^{-/-} vs. IL-10 ^{-/-} +O3	IL-10 ^{-/-} vs. WT	IL-10 ^{-/-} vs. WT-03	IL-10 ^{-/-} +O3 vs. WT	IL-10 ^{-/-} +O3 vs. WT-03	WT vs. WT+O3
Peso Inicial	>0.999	0.001*	0.001*	<0.001*	<0.001*	>0.999
Peso final	0.251	0.004*	>0.999	<0.001*	0.013*	0.036*
Delta peso	0.027*	>0.999	>0.999	<0.001*	>0.999	0.006*

IQR: Intervalo Interquartil; * significância estatística (p<0,05). Fonte: Campanari, Daniela Dalpubel (2024).

6.2. Avaliação do tecido intestinal e imunofenotipagem de células provenientes do linfonodo mesentérico

Devido a suplementação ser por via oral, avaliamos os parâmetros histológicos morfométricos do intestino e não houve diferença entre os grupos quando comparadas as vilosidades e criptas intestinais (Tabela 4).

Tabela 4. Histologia do intestino delgado medial de camundongos.

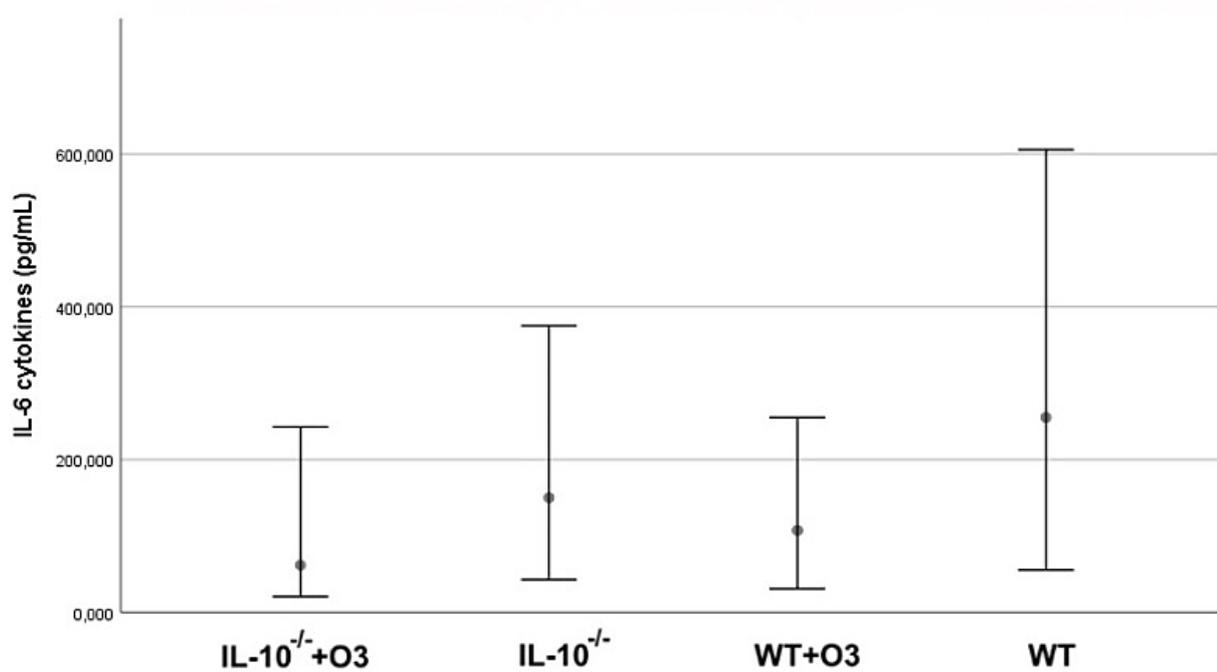


Legenda: (a) IL-10^{-/-} +O3; (b) IL-10^{-/-}; (c) WT+O3 e (d) WT. Fonte: Campanari, Daniela Dalpubel (2024).

Após coletados os tecidos intestinais, os linfonodos mesentéricos foram avaliados. A análise da produção das citocinas TGF- β e *IL-6* do sobrenadante da cultura do linfonodo mesentérico de 48 horas, ambos analisadas pelo método de imunoenzimático ELISA, não encontrou produção da citocina TGF- β (dados não apresentados). Porém, quando observada a

produção de citocina *IL-6*, constatou-se menor produção no sobrenadante (Gráfico 3 e Tabela 2), embora não tenha havido diferença significativa.

Gráfico 3. Avaliação da produção de *IL-6* em sobrenadante de cultura de linfonodo mesentérico após 48 horas de cultura com adição de ConA.



Fonte: Campanari, Daniela Dalpubel (2024).

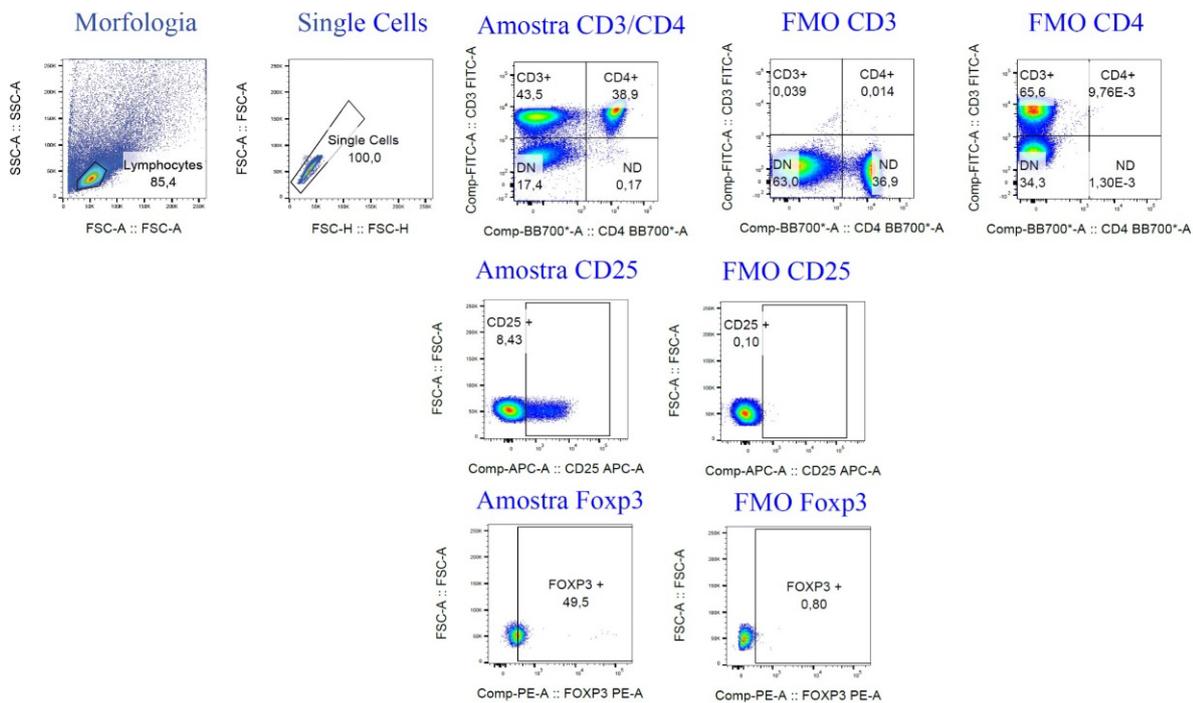
Tabela 2. Mediana da produção de IL-6 no sobrenadante de cultura de linfonodo mesentérico após 48 horas de cultura com adição de ConA.

Variáveis	KOIL-10 ^{-/+} O3	KOIL-10 ^{-/-}	WT+O3	WT	Kruskal-Wallis p-valor	
IL-6	Mediana	61,76	150,13	107,22	255,17	0,162
	IQR	41,40 - 177,63	73,76 - 273,31	34,88 - 224,54	65,44 - 496,16	

Legenda: IQR: Intervalo interquartil; * Significância estatística ($p < 0,05$). Fonte: Campanari, Daniela Dalpubel (2024).

A avaliação de células T reguladoras por citometria de fluxo foi realizada pela expressão da molécula FOXP3 em células T, onde foi possível avaliar a frequência dessas células entre os grupos. A estratégia de análise (Figura 9) foi realizada obtendo o perfil final CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺.

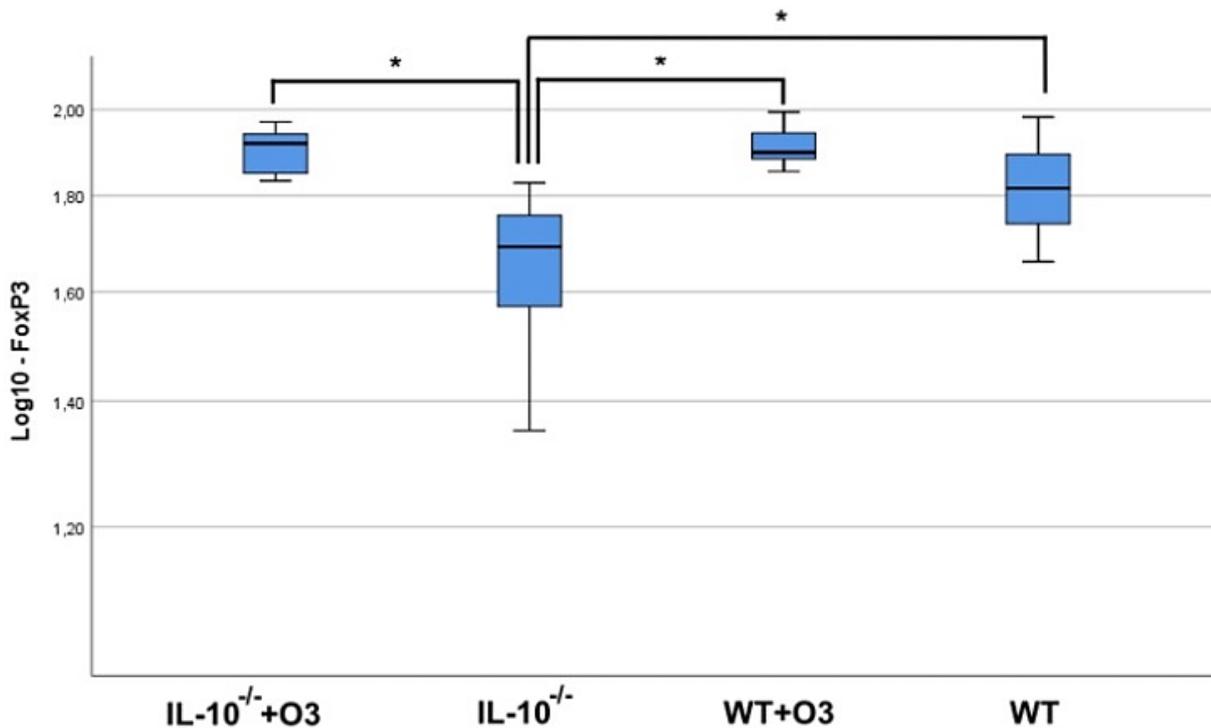
Figura 9. Estratégia de análise para obtenção de células T reguladoras. Células provenientes do linfonodo de animais suplementados ou não com ômega-3.



Fonte: Campanari, Daniela Dalpabel (2024).

A avaliação de células positivas para FOXP3 por citometria de fluxo apresentou uma maior expressão de células no grupo *IL-10*^{-/-}+O3 quando comparado ao seu grupo não suplementado (p=0,001). Logo, foi observado que após a suplementação houve aumento na porcentagem de células Tregs presentes no linfonodo mesentérico. Também foi observada diferença nos grupos WT em comparação com *IL-10*^{-/-} (p=0,026) e WT+O3 com *IL-10*^{-/-} (p=0,001) (Gráfico 4).

Gráfico 4. Expressão de FOXP3 em células T reguladoras. Células vindas de linfonodo mesentérico dos grupos IL-10^{-/-} +O3; IL-10^{-/-}; WT+O3 e WT.



Legenda: * Significância estatística ($p < 0,05$). Fonte: Campanari, Daniela Dalpubel (2024).

Ao observar esses resultados, nota-se que houve maior expressão de Foxp3 nos animais WT não suplementados comparado ao grupo *IL-10^{-/-}* não suplementado, indicando maior inflamação, assim como esperado para esse modelo. Similarmente, verificou um aumento da expressão de Foxp3 nos animais *IL-10^{-/-}*+O3, que apresentaram resultados semelhantes aos animais WT, sugerindo aumento de células Treg, potentes reguladoras do sistema imune.

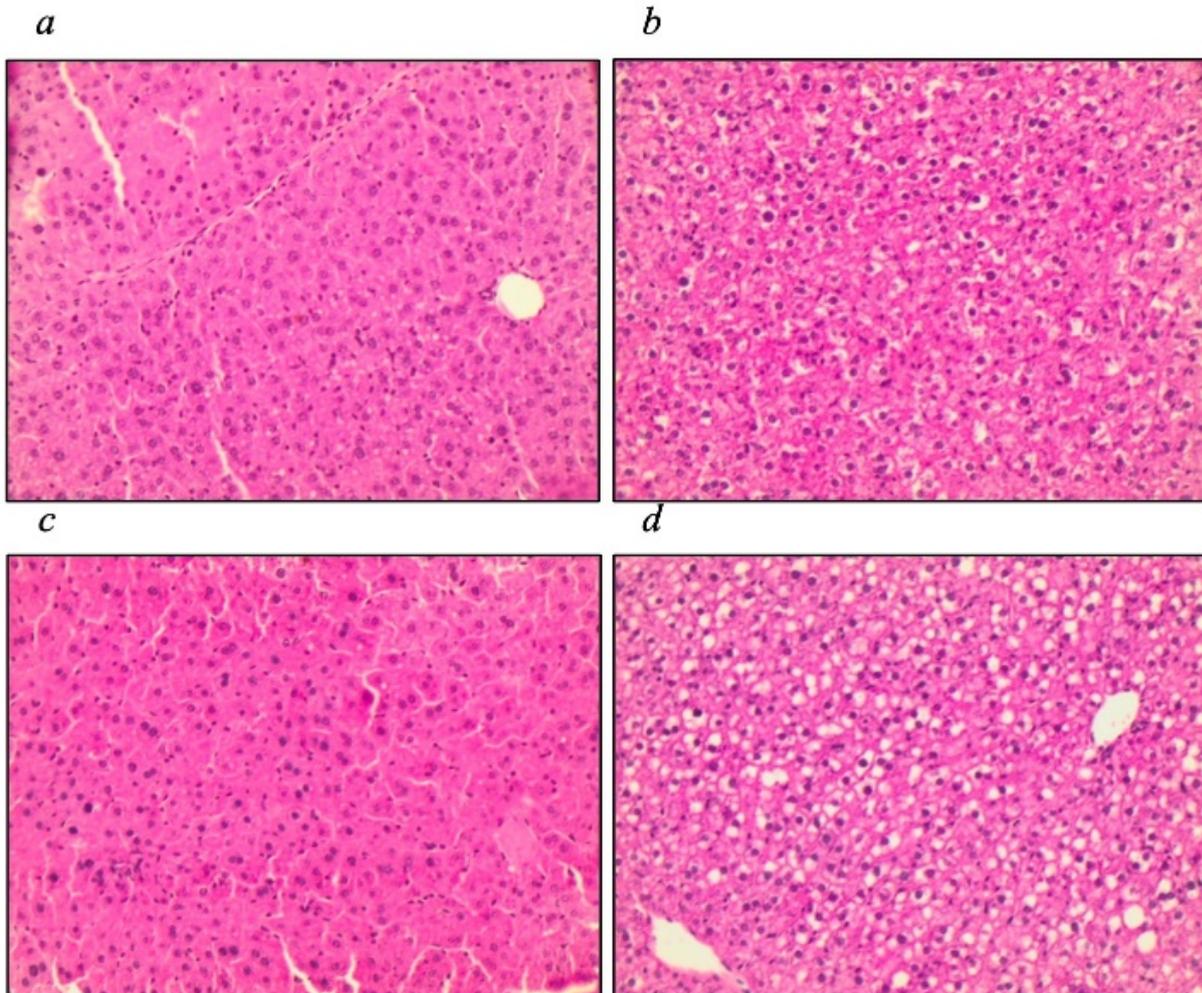
6.3. Tecidos hepático, função antioxidante e marcadores de estresse oxidativo

Foram realizadas análises do tecido hepático a fim de avaliar algumas respostas sistêmicas com a suplementação de ômega-3.

Análise histológica do tecido hepático (Figura 10) demonstrou que os animais do grupo *IL-10^{-/-}* +O3 apresentaram menores níveis de esteatose quando comparados ao grupo *IL-10^{-/-}* ($p=0,017$), ocorrendo resultado semelhante quando comparado o grupo WT+O3 com *IL-10^{-/-}* ($p=0,017$). Não houve diferença entre os grupos e *IL-10^{-/-}*+O3 com WT ($p=0,999$) e *IL-10^{-/-}*+O3 com WT+O3 ($p=0,999$), notando-se uma possível proteção para esteatose nos animais

knockout quando suplementado com ômega 3 (Tabela 5). Ao se examinar o peso do tecido hepático, não houve diferenças significativas entre os grupos (Tabela 6).

Figura 10. Análise histológica do lobo direito do tecido hepático entre os grupos.



Legenda: (a) IL-10^{-/-} +O3; (b) IL-10^{-/-}; (c) WT+O3 e (d) WT. Fonte: Campanari, Daniela Dalpubel (2024).

Tabela 5. Escore de esteatose do tecido hepático entre os grupos IL-10^{-/-} +O3; IL-10^{-/-}; WT+O3 e WT.

Variáveis	IL-10 ^{-/-}		IL-10 ^{-/-} +O3		WT		WT+O3		Kruskal-Wallis p-value
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	
Scores	3,0	1,50 - 3,0	1,0	0 - 1,0	2,0	0 - 3,0	1,0	0-10	0,009*
Pós-teste de Bonferroni p-valor									
Variáveis	IL-10 ^{-/-} vs. IL-10 ^{-/-} +O3		IL-10 ^{-/-} vs. WT		IL-10 ^{-/-} vs. WT-O3		IL-10 ^{-/-} +O3 vs. WT-O3		WT vs. WT-O3
Scores	0,017*		0,260		0,017*		>0,999		>0,999

Legenda: IQR: Intervalo interquartil. * Significância estatística (p<0,05). Fonte: Campanari, Daniela Dalpubel (2024).

O tecido hepático foi analisado com o objetivo de verificar a função antioxidante (GPx, GSH, vitamina E) e o marcador de estresse oxidativo (MDA) (Tabela 6).

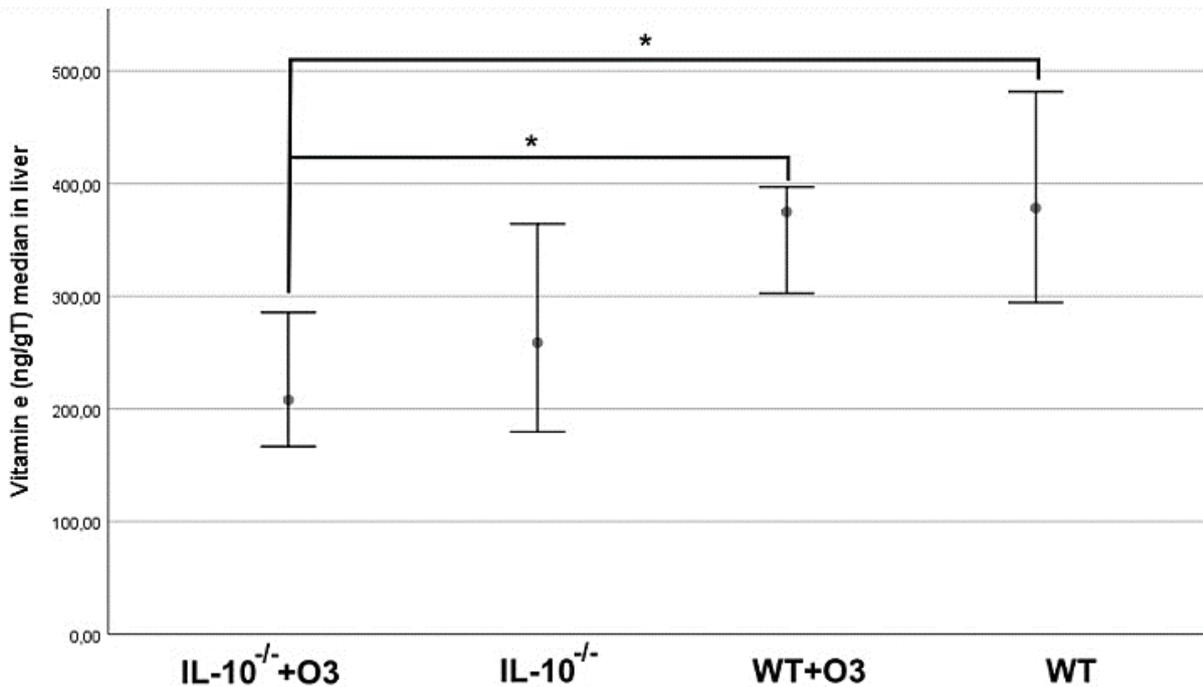
Nas funções antioxidantes, não foram observadas alterações para GSH e GPx. Para a Vitamina E, que possui importante função de antioxidante protegendo o tecido adiposo do ataque de radicais livre, observou-se maior atividade no grupo WT comparado ao *IL-10*^{-/-} +O3 (p=0,0 01), idem no grupo WT +O3 comparado ao *IL-10*^{-/-} +O3 (p=0,002) (Gráfico 5).

Ao analisar o marcador de estresse oxidativo MDA, foi encontrado aumento da peroxidação lipídica no grupo *IL-10*^{-/-} +O3 quando comparado ao grupo *IL-10*^{-/-} (p=0,03). A peroxidação lipídica constitui uma reação em cadeia dos ácidos poliinsaturados da membrana celular, gerando radicais livres que alteram a permeabilidade, fluidez e integridade dessas.

Tabela 6. Peso, função antioxidante e estresse oxidativo do tecido hepático. Glutationa peroxidase, glutaciona reduzida, vitamina E e malondialdeído nos grupos IL-10^{-/-} +O3; IL-10^{-/-}; WT+O3 e WT.

Variáveis	IL-10 ^{-/-}		IL-10 ^{-/-} +O3		WT		WT+O3		Kruskal-Wallis p-value			
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR				
Peso Fígado	1.2	1.2 - 1.3	1.2	1.1 - 1.3	1.2	1.1 - 1.2	1.1	1.0 - 1.2	0.208			
GSH hepático	216.2	171.2 - 271.1	201.7	167.4 - 269.6	231.0	197.6 - 320.0	270.0	232.7 - 278.7	0.236			
GPx hepático	237.5	219.4 - 263.5	224.7	148.9 - 239.3	223.0	207.3 - 236.6	217.8	201.1 - 240.2	0.257			
MDA hepático	17.7	15.6 - 24.8	25.0	24.0 - 29.0	21.0	19.4 - 23.2	21.3	20.6 - 24.8	0.025*			
Vit E hepático	259.0	185.6 - 336.1	208.2	167.4 - 277.5	378.5	294.7 - 481.7	374.9	302.8 - 397.1	<0.001*			
Pós-teste de Bonferroni p-valor												
	IL-10 ^{-/-} vs. IL-10 ^{-/-} +O3		IL-10 ^{-/-} vs. WT		IL-10 ^{-/-} vs. WT+O3		IL-10 ^{-/-} +O3 vs. WT		IL-10 ^{-/-} +O3 vs. WT+O3		WT vs. WT+O3	
MDA hepático	0.030*		>0.999		>0.999		0.085		0.236		>0.999	
VIT E hepático	0.951		0.139		0.211		0.001*		0.002*		>0.999	

Legenda: IQR: Intervalo interquartil. * Significância estatística (p<0,05). Fonte: Campanari, Daniela Dalpubel (2024).

Gráfico 5. Função antioxidante.

Legenda: * Significância estatística ($p < 0,05$). Fonte: Campanari, Daniela Dalpubel (2024).

Nota-se, com esses resultados, que os animais *IL-10*^{-/-} suplementados apresentaram menores níveis de vitamina E e maiores níveis de MDA. Por outro lado, apresentaram menores níveis de esteatose, presumido que a função antioxidante pode ter ajudado a frear os níveis de esteatose, em contrapartida seus números se apresentaram menores.

6.4. Tecidos musculares: avaliação do músculo tibial anterior, extensor digital longo, sóleo e gastrocnêmio

Quando analisado o peso dos músculos, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (Tabela 7).

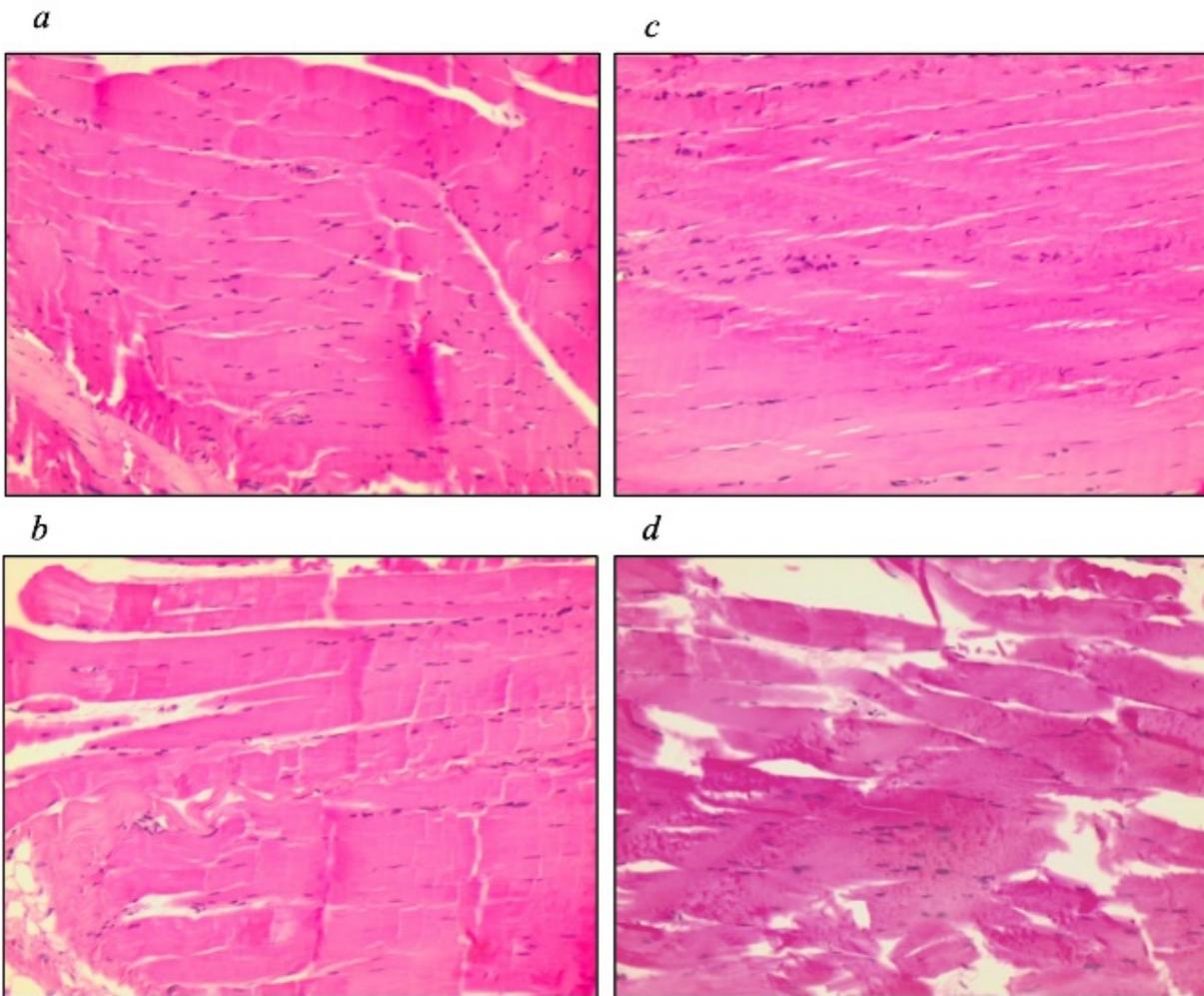
Tabela 7. Peso dos músculos entre os grupos IL-10^{-/-} +O3; IL-10^{-/-}; WT+O3 e WT.

Variáveis	IL-10 ^{-/-}		IL-10 ^{-/-} +O3		WT		WT+O3	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
Peso gastro	0,13	0,10 - 0,15	0,14	0,13 - 0,14	0,11	0,10 - 0,12	0,12	0,11 - 0,14
Peso tibial anterior	0,04	0,03 - 0,04	0,04	-	0,04	-	0,04	-
Peso EDL	0,01	-	0,01	-	0,01	-	0,01	-
Peso soleo	0,01	-	0,01	-	0,01	-	0,01	-

IQR: Intervalo interquartil; * Significância estatística ($p < 0,05$). Fonte: Campanari, Daniela Dalpubel (2024).

Ao analisar a histologia do músculo tibial anterior (Figura 11), foi possível observar diminuição das fibras musculares nos grupos *IL-10*^{-/-} +O3, *IL-10*^{-/-} e WT+O3, com diferença significativa entre os grupos *IL-10*^{-/-} e WT ($p=0.001$) e WT e WT+O3 ($p=0,001$) (Tabela 8).

Figura 11. Histologia do músculo tibial anterior dos grupos.



Legenda: (a) *IL-10*^{-/-} +O3; (b) *IL-10*^{-/-}; (c) WT+O3 e (d) WT. Fonte: Campanari, Daniela Dalpubel (2024).

Tabela 8. Escore do músculo tibial anterior dos grupos IL-10^{-/-} +O3;IL-10^{-/-}; WT+O3 e WT.

Variáveis	Grupos								Bonferroni teste			
	IL-10 ^{-/-}		IL-10 ^{-/-} +O3		WT		WT+O3		Chi-square p-value	IL-10 ^{-/-} vs. WT	WT vs. WT+O3	
	n	%	n	%	n	%	n	%				
Músculo	Delgado	11	84.6	9	64.3	2	15.4	15	88.2	<0.001*	0.002*	<0.001*
	Normal	2	15.4	5	35.7	11	84.6	2	11.8			

Nota: Foram realizadas outras comparações entre os grupos, no entanto, não os resultados não são significativos (p<0.05). Fonte: Campanari, Daniela Dalpubel (2024).

Não foram observadas alterações na função antioxidante GPx do músculo gastrocnêmio (Tabela 9).

Tabela 9. Função antioxidante do músculo gastrocnêmio entre os grupos IL-10^{-/-} +O3; IL-10^{-/-}; WT+O3 e WT.

Variáveis	KOIL-10		KOIL10O3		WT		WT_O3		Kruskal-Wallis p-valor
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	
GPx muscle	148,4	132,5 – 157,3	158,1	140,1 – 161,7	149,9	139,1 – 180,7	150,3	135,3 – 190,4	0,726

IQR: Intervalo interquartil. Fonte: Campanari, Daniela Dalpubel (2024).

Verificou-se que a suplementação com ômega 3 não apresentou diferenças quando foi analisada a atividade antioxidante e o tamanho das fibras musculares em animais *knockout*, e, para os animais WT, a suplementação pode não ter apresentado resultados positivos quanto ao tamanho das fibras musculares.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo analisar a resposta imunológica e muscular de camundongos *KOIL-10^{-/-}* após a suplementação com óleo de peixe rico em ômega 3 na dieta desses animais por 90 dias. Os principais resultados obtidos mostraram que animais *KOIL-10^{-/-}* suplementados apresentaram maior expressão de FOXP3 em linfonodos mesentéricos, maiores níveis de MDA; ao mesmo tempo, menores níveis de Vitamina E, menor esteatose hepática, e diferença em tamanho das fibras musculares.

Nesta pesquisa, foi ofertada aos animais uma dieta composta por 10% óleo de soja aos grupos controle e 10% óleo de soja + 10% óleo de peixe rico em ômega-3 aos animais suplementados. A quantidade de lipídios ofertada nesta dieta corresponde a 20% no total de energia do consumo de lipídios, com 10% além da recomendação diária para roedores (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). A Sociedade Brasileira de Cardiologia recomenda aproximadamente 10% de consumo de lipídios no total de energia diária em humanos (DE OLIVEIRA IZAR et al., 2021)

A utilização de uma dieta hiperlipídica com ômega-3 tem origem de esta ser uma popular escolha de suplementação que normalmente é comercializada em formato de cápsulas e administrada, muitas vezes, sem prescrição. O consumo em seres humanos deve ser cauteloso e sua extrapolação vista com cuidado, considerando a quantidade administrada e as diferenças metabólicas entre indivíduos (PARK; HARRIS, 2003).

Modelos animais são amplamente utilizados para produzir fenótipos semelhantes a humanos e com esse objetivo o camundongo *knockout* para interleucina 10 (IL-10) foi inicialmente desenvolvido como modelo de doença inflamatória intestinal (KUHN et al., 1993). Por conta do *knockout*, ele não produz uma importante citocina anti-inflamatória, a IL-10, o que resulta em um estado inflamatório crônico de baixo grau semelhantes a idosos (SANTORO et al., 2020; WALSTON et al., 2008; WANG, 2022).

Observou-se que os animais suplementados apresentaram maior peso corporal. Ao comparar o valor do delta no ganho de peso dos animais, os grupos que receberam suplementação apresentaram maior ganho de peso ao longo do experimento em comparação aos grupos não suplementados. Mello e colaboradores (2019), obtiveram resultados diferentes em sua pesquisa ao avaliar os efeitos do ômega-3 na inflamação e estresse oxidativo no cérebro de camundongos. Vale ressaltar que essa divergência de resultados pode ser explicada pela duração e quantidade de lipídios adicionados à dieta dos animais suplementados, uma vez que, no presente trabalho, os animais permaneceram em dieta por 90 dias e no estudo de Mello e

colaboradores (2019) permaneceram apenas 30 dias na dieta (MELLO et al., 2019). Sabe-se que quando há aumento na quantidade de lipídios os animais tendem a ganhar peso.

A suplementação ocorreu de forma oral, o tecido intestinal foi o primeiro a entrar em contato com a intervenção, portanto, objetivou-se verificar a histologia do intestino e analisar a organização histológica das vilosidades intestinais. Verificou-se, no presente estudo, que não houve alterações entre os grupos de animais.

Anormalidades na barreira intestinal resultam em translocação bacteriana e liberação de mediadores pró-inflamatórios (LIU et al., 2012; WEISBERG et al., 2003). Estudos mostram que os ácidos graxos ômega 3, mais especificamente EPA e DHA, preservam a integridade da barreira intestinal e reduzem as citocinas inflamatórias (LIU et al., 2012; YU et al., 2014). Porém, pesquisas recentes sugeriram que PUFA podem influenciar o conteúdo da microbiota intestinal (MUJICO et al., 2013), e outros dados mostraram que camundongos tratados com EPA e DHA não estão protegidos da disbiose na microbiota intestinal (MUJICO et al., 2013).

Não observamos diferenças morfológicas intestinais no presente estudo. Em outros estudos, a administração de ômega 3 por via intravenosa melhorou a morfologia intestinal (altura das vilosidades, altura das criptas e espessura da mucosa) em camundongos que passaram por lesão intestinal induzida por irradiação (SUN et al., 2014) e o tratamento com maresina 1 (vinda da biossíntese do DHA), por via oral, em camundongos atenuou significativamente a inflamação induzida por ácido sulfônico (MARCON et al., 2013). Uma dieta rica em ômega-3 melhora as vilosidades, criptas intestinais no tecido intestinal e pode influenciar positivamente a microbiota. Diferentemente do presente estudo, no qual os animais não foram submetidos a nenhum procedimento que cause injúria no tecido intestinal, os trabalhos citados apresentaram uma lesão gastrointestinal, justificando, dessa forma, resultados divergentes. Em vista disso, pode não haver melhora no tecido já intacto.

Ao verificar a produção das citocinas TGF- β e *IL-6* do sobrenadante da cultura de 48 horas com adição de ConA das células do linfonodo mesentérico, constatou-se que não houve produção significativa das citocinas TGF- β no sobrenadante. Quando avaliada a produção da citocina *IL-6*, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos. É possível ressaltar que, mesmo sem encontrar diferença significativa entre os grupos na produção da citocina *IL-6* no sobrenadante de 48 horas da cultura de linfonodos mesentéricos, nos animais suplementados houve menor produção da citocina. Esta menor produção de citocinas, é corroborada pela alta expressão de FOXP3, detectada nos linfonodos mesentéricos dos mesmos grupos de animais que receberam suplementação.

Em animais obesos suplementados com óleo de peixe, há menor produção de IL-4 e IL-10 estimulada por ConA nas células imunes dos linfonodos mesentéricos em comparação com o grupo de animais controle (RUTH; PROCTOR; FIELD, 2009). E para os níveis de IL-2, interferon- γ , IL-4 ou IL-6 não há diferença (RUTH; PROCTOR; FIELD, 2009). Em nosso estudo, ao se observar a população de FOXP3 nas células do linfonodo mesentérico por citometria de fluxo, houve uma maior expressão nos grupos *IL-10*^{-/-} +O3 comparado ao seu grupo não suplementado. Camacho-Muñoz e colaboradores (2022) encontraram resultados similares, ao averiguar que a dieta rica em ômega 3 atenuou os fenótipos inflamatórios promovidos pela dieta ocidental em órgãos linfóides. Esses resultados sugerem que o enriquecimento de ômega 3 pode modular benéficamente a produção de alguns tipos de ceramidas, contribuindo para otimizar o perfil e a composição da população de células do sistema imunológico (CAMACHO-MUÑOZ et al., 2022).

Sabendo que o processo de envelhecimento traz consigo modificações em vários tecidos (KIM; WON, 2022; SHAW; GOLDSTEIN; MONTGOMERY, 2013), objetivou-se avaliar algumas respostas sistêmicas da suplementação de ômega-3.

O envelhecimento é a causa mais comum para a progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica e a esteatose hepática. A fase inicial é caracterizada por um acúmulo de triglicerídeos no citoplasma dos hepatócitos e é observada em camundongos a partir dos 12 meses de idade (COHEN; HORTON; HOBBS, 2011; ENGIN, 2017).

Os animais pertencentes ao grupo *IL-10*^{-/-} suplementados demonstraram uma redução significativa na esteatose hepática em comparação com os seus homólogos não suplementados. Observou-se que camundongos suplementados com PUFA apresentam maior preservação da integridade do tecido hepático quando avaliados em relação à esteatose. Khadge e colaboradores (2018) encontraram resultados semelhantes: examinando os efeitos da composição dietética ômega-6 e ômega-3 na fisiopatologia hepática os autores encontraram, em animais suplementados com ômega 3, maior proteção do tecido hepático quando analisado referente à esteatose (KHADGE et al., 2018).

Não verificamos os mecanismos pelo qual o ômega-3 protegeu o tecido hepático dos animais *IL-10*^{-/-} +O3 de apresentarem menor esteatose, mas a literatura sugere, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, que a capacidade protetora hepática conferida pelos ácidos graxos PUFA n-3 contra a esteatose hepática é atribuída aos efeitos protetores do receptor FFA4 nos hepatócitos, bem como aos metabólitos PUFA n-3, como resolvinas e protetinas. Além disso, o efeito antiinflamatório do receptor FFA4 em macrófagos e adipócitos (GONZÁLEZ-PÉRIZ et al., 2009; KANG et al., 2018; OH et al., 2010)

Em relação ao peso do tecido hepático, não foram detectadas diferenças entre os grupos suplementados e não suplementados. Na literatura, existem resultados semelhantes aos desta pesquisa (GONZÁLEZ-PÉRIZ et al., 2009; JUMP et al., 2016), porém, também, resultados distintos (KHADGE et al., 2018; ZENG et al., 2022). Destaca-se que o tempo da suplementação e a quantidade de ácido graxo poliinsaturado adicionado à ração, ou administrado em forma de gavagem, tem importante papel nos resultados do peso do tecido hepático. Grande parte dos estudos utilizou quantidades expressivas de gordura para induzir esteatose hepática e comparou os resultados com fígado de camundongos controle alimentados com uma dieta padrão com relação de ω -6: ω -3 de cerca de 10:1. Esse grande aumento de lipídio em dietas pode ser uma consequência da esteatose grave, juntamente com a indução de fibrose no fígado e aumento do seu peso (PORRAS et al., 2017; TETRI et al., 2008).

O estresse oxidativo está envolvido em uma grande variedade de processos patológicos, incluindo lesão e envelhecimento celular, câncer, inflamação crônica e algumas doenças degenerativas, como Alzheimer (BAUER; DE LA FUENTE, 2013; DANNENBERGER et al., 2013; SOARES GONÇALVES VELASQUE et al., 2022). Estudos indicam que a quantidade de ácido graxo ingerido e sua composição podem influenciar desfechos de saúde, modificando o sistema antioxidante (GUÉRAUD et al., 2010; KAUR et al., 2011), justificando análises no tecido hepático como funções antioxidantes (GPx, GSH e vitamina E) e marcador de estresse oxidativo (MDA).

A atividade da GSH, referente à defesa antioxidante, não foi significativamente alterada entre os grupos de animais. Na literatura, em estudos com animais e meta análises, existem resultados semelhantes, sem se observar diferença considerável na concentração hepática de GSH entre os grupos. Isso se aplica quando verificados os benefícios do óleo de peixe para o tratamento de comorbidades vindas da síndrome metabólica (CASTRO et al., 2012), quando analisados subgrupos com ampla gama de fatores (incluindo doenças metabólicas e não metabólicas, animais diabéticos e não diabéticos, duração da suplementação, dosagem de ácidos graxos ômega-3, idade e sexo dos participantes) (KIM; WON, 2022). Justifica-se esse resultado pois as concentrações teciduais de GSH são frequentemente esgotadas após um curto período de estresse oxidativo. Todavia, seu conteúdo é elevado depois da exposição a longo prazo aos oxidantes, a depender da dose administrada e da extensão de exposição a alguns tipos de alimentos (SLANINOVA et al., 2009).

Não foi encontrada diferença significativa para o antioxidante GPx, enzima responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos. No estudo de Soares Gonçalves Velasque e colaboradores (2022), os autores objetivaram verificar os benefícios do tratamento

com óleo de peixe rico em $\omega 3$ contra o estresse oxidativo no tecido hepática durante a sepse em ratos. Dessa forma, evidenciaram que o tratamento com ômega-3 aumentou a atividade da GPx nos animais sépticos suplementados quando comparados aos animais com sepse sem tratamento (SOARES GONÇALVES VELASQUE et al., 2022). Não obstante, ao analisar os benefícios da suplementação com PUFA na melhora da capacidade metabólica e antiinflamatória/antioxidante do coração, não se encontrou diferença na atividade da GPx (ANDERSON et al., 2014).

Uma possível explicação para que as atividades de GSH e GPx não se mostrarem diferentes entre os grupos de animais suplementados e não suplementados pode ter sido o fato de que, para adultos, é necessário doses de PUFA menores que 2000 mg por dia para um aumento da atividade da GPx, no presente trabalho a ração ofertada para os camundongos estava acima da dose recomendada, e vale lembrar que a atividade da GPx depende da GSH e os níveis de GSH são mantidos a partir da glutathione redutase (GSR), que reduz a GSSG em GSH através da oxidação do NADPH, portanto, os níveis desses antioxidantes estão interligados (ANDERSON et al., 2014; HESHMATI, 2021).

Foi encontrada uma maior atividade da vitamina E no grupo WT não suplementado quando comparado ao *IL-10^{-/-}* suplementado, WT não suplementado comparado ao *IL-10^{-/-}* não suplementado e WT suplementado comparado ao grupo *IL-10^{-/-}* suplementado. Logo, os animais suplementados apresentaram menor atividade da vitamina E quando comparado aos animais não suplementados. Castro e colaboradores (2012) constataram maior atividade de α -tocoferol no tecido hepático em ratos que foram suplementados por 45 dias com óleo de peixe (CASTRO et al., 2012). É importante ressaltar que, o α -tocoferol possui a função de proteger a bicamada de fosfolípidios de radicais livres em conjunto com outros antioxidantes, como vitamina C e a GPx (ROMÁN et al., 2019).

O presente estudo notou que as atividades antioxidantes foram menores em animais suplementados. Os animais *IL-10^{-/-}* suplementados apresentaram menos esteatose que os não suplementados, sendo possível inferir que os níveis mais baixos de antioxidantes ocorrem devido a sua utilização no tecido hepático para frear a esteatose. Além disso, destaca-se que a presença do ômega-3 realiza uma ação protetiva dos efeitos dos radicais livres, não se fazendo necessário altos níveis de antioxidantes.

Ao analisar o marcador de estresse oxidativo MDA, o grupo *IL-10^{-/-}* suplementado apresentou valores maiores desse marcador quando comparado ao grupo *IL-10^{-/-}* não suplementado, enquanto os grupos WT não apresentaram diferenças nos níveis de MDA. Como descrito na literatura, os ácidos graxos EPA e DHA auxiliam na proteção da lesão hepática em

ratos, pois quando houve injúria do tecido hepático, os níveis de MDA aumentaram. Porém, quando os animais foram tratados com EPA e DHA, houve uma redução significativa desse marcador de estresse oxidativo (EL-MOWAFY; ABDEL-AZIZ; ABDEL-DAYEM, 2022; SOARES GONÇALVES VELASQUE et al., 2022).

Observa-se que nos estudos citados referentes ao marcador de estresse oxidativo MDA (EL-MOWAFY; ABDEL-AZIZ; ABDEL-DAYEM, 2022; SOARES GONÇALVES VELASQUE et al., 2022) ocorreram injúria no tecido hepático dos animais. No entanto, no presente trabalho, obtivemos resultados distintos, pois, quando acontece a injúria de tecido, há uma inflamação expressiva que pode mudar as respostas fisiológicas (CHEN et al., 2018; VAUGHN et al., 2018). Destaca-se ainda que o MDA é resultado da peroxidação lipídica; em vista disso, quando há aumento no consumo de PUFA, pode ocorrer o aumento de MDA (EL-MOWAFY; ABDEL-AZIZ; ABDEL-DAYEM, 2022). Desse modo, o consumo em humanos deve ser cauteloso e sua extrapolação vista com cuidado, considerando a quantidade administrada e as diferenças metabólicas entre os indivíduos (PARK; HARRIS, 2003).

Não houve diferença entre os grupos ao analisar o peso dos músculos tibial anterior, extensor digital longo, sóleo e gastrocnêmio, embora, nos animais suplementados, verificou-se aumento no peso corporal. Estudo de Brown e colaboradores (2019), objetivou determinar o papel dos metabólitos de PUFA na síntese de proteínas do músculo esquelético, na presença ou ausência de atividade de FADS2 em camundongos alimentados com dieta rica em ômega-3 ou 6; os autores constataram, em animais que receberam a suplementação ômega-3, que o músculo gastrocnêmio apresentou os maiores pesos. Outros estudos que avaliaram a relação entre ômega-3 e massa muscular, encontraram um efeito protetor e anabólico na massa muscular esquelética tanto em estados saudáveis quanto doentes, mas sem diferença de peso entre os músculos (MURPHY et al., 2011; RYAN et al., 2009; SMITH et al., 2015)

O crescimento e hipertrofia do músculo esquelético dependem da proliferação de células satélites, pois os exercícios resistidos induzem a hipertrofia muscular através da sua ativação e proliferação, posterior quimiotaxia e fusão destas às fibras musculares pré-existentes (SALA; SACCO, 2016). Porém, é importante ressaltar que, no presente estudo, não houve treinamento de força e/ou resistência. Dessa maneira, quanto à histologia, foram encontradas fibras musculares diminuídas em todos os grupos quando comparado ao grupo WT não suplementado. Maurício e colaboradores (2013), obtiveram resultados diferentes ao avaliarem os efeitos do óleo de peixe na degeneração muscular e inflamação em camundongos controle e camundongos *mdx*, modelo de distrofia muscular de Duchenne. Eles concluíram que os animais que fizeram a suplementação com óleo de peixe apresentaram melhora na histologia geral dos músculos

distróficos, redução no número de fibras positivas (correspondentes a fibras com permeabilidade de membrana alterada), aumento do número de fibras nucleadas periféricas (correspondentes a fibras que não sofreram degeneração-regeneração) (MAURÍCIO et al., 2013).

A resposta anabólica dos PUFA ocorre através de mecanismos envolvidos na síntese proteica, com regulação positiva da via Akt-mTOR-p70S6k (GINGRAS et al., 2007; HEMMINGS; RESTUCCIA, 2012). Smith e colaboradores demonstraram, em modelos humanos saudáveis, que a suplementação de EPA/DHA por oito semanas aumentou a fosforilação de mTOR e p70s6k em biópsias musculares, porém não houve efeito sobre Akt (SMITH et al., 2011). E, camundongos com dieta rica em gordura por 20 semanas exibiram estresse e reduções na atividade da via mTOR (DELDICQUE et al., 2010). Embora nossos resultados não tenham mostrado um papel para o ômega-3 ou FADS2 na síntese protéica, fornecemos evidências de que os n-3 podem ter um efeito na degradação da proteína.

8. CONCLUSÕES

Retomando o objetivo do estudo que foi avaliar os benefícios da suplementação com óleo de peixe rico em ômega 3 na resposta imunológica, hepática e muscular de camundongos IL-10^{-/-} por 90 dias, podemos verificar que a suplementação foi capaz de induzir uma série de efeitos metabólicos, incluindo:

Aumento de peso corpóreo;

Aumento da expressão de Foxp3, o que sugere aumento de células Treg, que são potentes reguladoras do sistema imune;

Melhora na esteatose hepática, o que sugere benefícios para a saúde do fígado;

Menores níveis do antioxidante vitamina E e maiores níveis de estresse oxidativo analisado por MDA e

Diminuição das fibras musculares do músculo tibial anterior.

Os parâmetros relacionados ao peso do tecido hepático, antioxidantes GPx e GSH e análise histológica do intestino não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

Dessa forma, avaliando os resultados desse estudo, podemos concluir que o uso ácido graxo poliinsaturado ômega 3 poderia ser uma alternativa terapêutica de baixo custo, desde que dosados com cautela e sob supervisão de um profissional da saúde apto para compreender seus benefícios.

Este estudo representa uma contribuição pioneira ao associar o óleo de peixe rico em ômega-3 em camundongos knockout IL-10^{-/-}, proporcionando insights valiosos. No entanto, reconhecemos as limitações inerentes, como a ausência de comparação com estudos semelhantes na literatura e as considerações sobre a forma de administração. Portanto, instiga-se a continuidade de pesquisas para aprofundar nossa compreensão desses fenômenos complexos e suas implicações práticas e clínicas.

9. REFERÊNCIAS

ADAMO, M. L.; FARRAR, R. P. Resistance training, and IGF involvement in the maintenance of muscle mass during the aging process. **Ageing Research Reviews**, v. 5, n. 3, p. 310–331, 2006.

AKBAR, A. N.; HENSON, S. M.; LANNA, A. Senescence of T Lymphocytes: Implications for Enhancing Human Immunity. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 12, p. 866–876, 2016.

AKKI, A. et al. Skeletal muscle ATP kinetics are impaired in frail mice. **Age**, v. 36, n. 1, p. 21–30, 2014.

ALEXANDRE, O. et al. (orgs.) **Política Nacional do Idoso velhas e novas questões**. Rio de Janeiro: IPEA, 2016.

ALVES, V. P.; DE OLIVEIRA, R. C.; GREGORI, D. Non-communicable chronic diseases: Mortality of older adult citizens in Brazil and Italy before the Covid-19 pandemic. **Health Policy OPEN**, v. 2, 2021.

ANDERSON, E. J. et al. Do fish oil omega-3 fatty acids enhance antioxidant capacity and mitochondrial fatty acid oxidation in human atrial myocardium via PPAR γ activation? **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 21, n. 8, p. 1156–1163, 2014.

ANGELOVA, P. R.; ESTERAS, N.; ABRAMOV, A. Y. Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention. **Medicinal Research Reviews**, v. 41, n. 2, p. 770–784, 2021.

ARNAUD, J. et al. **Simultaneous determination of retinol,-tocopherol and fl-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography**, v. 572, p. 103-116, 1991.

BABCOCK, T. A. et al. Modulation of lipopolysaccharide-stimulated macrophage tumor necrosis factor- α production by ω -3 fatty acid is associated with differential cyclooxygenase-2 protein expression and is independent of interleukin-10. **Journal of Surgical Research**, v. 107, n. 1, p. 135–139, 2002.

BANDEIRA, S. DE M. et al. Oxidative stress as an underlying contributor in the development of chronic complications in diabetes mellitus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3265–3284, 2013.

BANERJEE, M. et al. Interaction of antioxidant gene variants and susceptibility to type 2 diabetes mellitus. **British Journal of Biomedical Science**, v. 76, n. 4, p. 166–171, 2 out. 2019.

BATISTA, M. A. et al. Inflammaging in Endemic Areas for Infectious Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

BAUER, M. E.; DE LA FUENTE, M. Oxidative Stress, Inflammaging, and Immunosenescence. **Inflammation, Advancing Age and Nutrition**, p. 39–47, 2013.

BELIZÁRIO, J. E. et al. Skeletal muscle wasting and renewal: a pivotal role of myokine IL-6. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, 2016.

BRASH, A. R. Arachidonic acid as a bioactive molecule. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 11, p. 1339–1345, 2001.

BROCKMAN, M. A. et al. Reduced Magnitude and Durability of Humoral Immune Responses to COVID-19 mRNA Vaccines among Older Adults. **Journal of Infectious Diseases**, v. 225, n. 7, p. 1129–1140, 2022.

CALDER, P. C. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. **Journal of Nutrition**, v. 142, n. 3, 2012.

CALDER, P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1851, n. 4, p. 469–484, 2015.

CALDER, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: From molecules to man. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 5, p. 1105–1115, 2017.

CALDER, P. C. et al. Health relevance of the modification of low grade inflammation in ageing (inflammaging) and the role of nutrition. **Ageing Research Reviews**, v. 40, p. 95–119, 2017.

CALDER, P. C.; YAQOUB, P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. **BioFactors**, v. 35, n. 3, p. 266–272, 2009.

CALVANI, R. et al. Biomarkers for physical frailty and sarcopenia: State of the science and future developments. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 6, n. 4, p. 278–286, 2015.

CAMACHO-MUÑOZ, D. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids reverse the impact of western diets on regulatory T cell responses through averting ceramide-mediated pathways. **Biochemical Pharmacology**, v. 204, 2022.

CARISSIMO, G. et al. Whole blood immunophenotyping uncovers immature neutrophil-to-VD2 T-cell ratio as an early marker for severe COVID-19. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.

CASTRO, G. S. F. et al. Omega-3 improves glucose tolerance but increases lipid peroxidation and DNA damage in hepatocytes of fructose-fed rats. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 37, n. 2, p. 233–240, 2012.

CHEN, C. Y. et al. The prevalence of subjective frailty and factors associated with frailty in Taiwan. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 50, p. S43–S47, 2010.

CHOUSTERMAN, B. G.; SWIRSKI, F. K.; WEBER, G. F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. **Seminars in Immunopathology**, v. 39, n. 5, p. 517–528, 2017.

CHUNG, H. Y. et al. Molecular inflammation: Underpinnings of aging and age-related diseases. **Ageing Research Reviews**, v. 8, n. 1, p. 18–30, 2009.

COHEN, J. C.; HORTON, J. D.; HOBBS, H. H. Human fatty liver disease: Old questions and new insights. **Science**, v. 332, n. 6037, p. 1519–1523, 2011.

COSTANTINI, A. et al. Age-related M1/M2 phenotype changes in circulating monocytes from healthy/unhealthy individuals. **AGING**, v. 10, n. 6, 2018.

COSTANTINI, L. et al. Impact of omega-3 fatty acids on the gut microbiota. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, 2017.

COVARRUBIAS, A. J. et al. Senescent cells promote tissue NAD⁺ decline during ageing via the activation of CD38⁺ macrophages. **Nature Metabolism**, v. 2, n. 11, p. 1265–1283, 2020.

CRUZ ALVES, N. M. et al. Randomised Controlled Trial of Fish Oil Supplementation on Responsiveness to Resistance Exercise Training in Sarcopenic Older Women. **Nutrients**, v. 14, n. 14, 2022.

CRUZ-JENTOFT, A. J. et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis. **Age and Ageing**, v. 39, n. 4, p. 412–423, 2010.

CULOTTA, V. C. Superoxide Dismutase, Oxidative Stress, and Cell Metabolism. **Current topics in cellular regulation**, v. 36, 2000.

DANNENBERGER, D. et al. High-fat diets rich in ω -3 or ω -6 polyunsaturated fatty acids have distinct effects on lipid profiles and lipid peroxidation in mice selected for either high body weight or leanness. **Nutrition**, v. 29, n. 5, p. 765–771, 2013.

DAS, A. et al. Effector/memory CD4 T cells making either Th1 or Th2 cytokines commonly co-express T-bet and GATA-3. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, 2017.

DE OLIVEIRA IZAR, M. C. et al. Position statement on fat consumption and cardiovascular health-2021. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, n. 1, 2021.

DEELEN, J. et al. A metabolic profile of all-cause mortality risk identified in an observational study of 44,168 individuals. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.

DEJONG, C. H. et al. Systemic inflammation correlates with increased expression of skeletal muscle ubiquitin but not uncoupling proteins in cancer cachexia. **ONCOLOGY REPORTS**, v. 14, p. 257–263, 2005.

DELDICQUE, L. et al. The unfolded protein response is activated in skeletal muscle by high-fat feeding: Potential role in the downregulation of protein synthesis. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 299, n. 5, 2010.

DEMARET, J. et al. Impaired Functional T-Cell Response to SARS-CoV-2 After Two Doses of BNT162b2 mRNA Vaccine in Older People. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

DENNISON, E. M.; SAYER, A. A.; COOPER, C. Epidemiology of sarcopenia and insight into possible therapeutic targets. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 6, p. 340–347, 2017.

DIZ, J. B. M. et al. Prevalence of sarcopenia in older Brazilians: A systematic review and meta-analysis. **Geriatrics and Gerontology International**, v. 17, n. 1, p. 5–16, 2017.

EBNER, N. et al. Highlights from the 7th Cachexia Conference: Muscle wasting pathophysiological detection and novel treatment strategies. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 5, n. 1, p. 27–34, 2014.

EL-MOWAFY, A. M.; ABDEL-AZIZ, A. A.; ABDEL-DAYEM, M. A. Novel protection by Omega-3-FAs (DHA or EPA) against carbamazepine's liver-injury: differential suppression of oxidative-stress and inflammatory markers, and the influence on carbamazepine-clearance. **Clinical Nutrition Open Science**, v. 42, p. 14–26, 2022.

ENGIN, A. Non-alcoholic fatty liver disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 960, p. 443–467, 2017.

ERDELMEIER, I. et al. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, n. 10, p. 1176–1183, 1998.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA). **EFSA Journal**, 2012.

EVANS, W. J. What Is Sarcopenia? Downloaded from. **The Journals of Gerontology Series A**, v. 50, p. 5–8, 1995.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. **Annu Rev Microbiol**, v. 46, p. 695-729, 1992.

FANG, Y.-Z.; YANG, S.; WU, G. Regulation of physiological systems by nutrients. **Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.

FEBBRAIO, M. A. et al. Interleukin-6 Is a Novel Factor Mediating Glucose Homeostasis During Skeletal Muscle Contraction. **DIABETES**, v. 53, p. 1643, 2004.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. RADICAIS LIVRES: CONCEITOS E MECANISMO DE LESÃO. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERRUCCI, L. et al. The origins of age-related proinflammatory state. **Blood**, v. 105, n. 6, p. 2294–2299, 2005.

FERRUCCI, L. et al. Measuring biological aging in humans: A quest. **Aging Cell**, v. 19, n. 2, 2020.

FETTERMAN, J. W.; ZDANOWICZ, M. M. Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 66, n. 13, p. 1169–1179, 2009.

FRANCESCHI, C. et al. Inflamm-aging An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. **Ann NY Acad Sci**, v. 14, p. 576-590, 2000.

FRANCESCHI, C. Healthy ageing in 2016: Obesity in geroscience-is cellular senescence the culprit? **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 2, p. 76–78, 2017.

FRANCESCHI, C. et al. Immunobiography and the heterogeneity of immune responses in the elderly: A focus on inflammaging and trained immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. AUG, 2017.

FRANCESCHI, C. et al. The continuum of aging and age-related diseases: Common mechanisms but different rates. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. MAR, 2018a.

FRANCESCHI, C. et al. Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 10, p. 576–590, 2018b.

FRANCKHAUSER, S. et al. Overexpression of Il6 leads to hyperinsulinaemia, liver inflammation and reduced body weight in mice. **Diabetologia**, v. 51, n. 7, p. 1306–1316, 2008.

FRASCA, D. et al. B Cell Immunosenescence. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 36, p. 551-574, 2020.

FRIED, L. P. et al. Frailty in Older Adults: Evidence for a Phenotype. **Journal of Gerontology**, v. 56, n. 3, p. 146–156, 2001.

FRONTERA, W. R.; RODRIGUEZ ZAYAS, A.; RODRIGUEZ, N. Aging of Human Muscle: Understanding Sarcopenia at the Single Muscle Cell Level. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 201–207, 2012.

FULOP, T. et al. Immunosenescence and inflamm-aging as two sides of the same coin: Friends or Foes? **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JAN, 2018.

FURMAN, D. et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nature Medicine**, v. 25, n. 12, p. 1822–1832, 2019.

GANESH, B. P. et al. Commensal *Akkermansia muciniphila* Exacerbates Gut Inflammation in Salmonella Typhimurium-Infected Gnotobiotic Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.

GEBAUER, S. K. et al. n3 Fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. **American Society for Nutrition**, v. 83, p. 1526S–35S, 2006.

GINGRAS, A. A. et al. Long-chain omega-3 fatty acids regulate bovine whole-body protein metabolism by promoting muscle insulin signalling to the Akt-mTOR-S6K1 pathway and insulin sensitivity. **Journal of Physiology**, v. 579, n. 1, p. 269–284, 2007.

GIUNTA, S. Is inflammaging an auto[innate]immunity subclinical syndrome? **Immunity and Ageing**, v. 3, 2006.

GONZÁLEZ-PÉRIZ, A. et al. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by ω -3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 6, p. 1946–1957, 2009.

GRADINARU, D. et al. Oxidized LDL and NO synthesis-Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 151, p. 101–113, 2015.

GUÉRAUD, F. et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. **Free Radical Research**, v. 44, n. 10, p. 1098–1124, 2010.

GUILLET, C. et al. Impaired anabolic response of muscle protein synthesis is associated with S6K1 dysregulation in elderly humans. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 13, p. 1586–1587, 2004.

GUSTI, A. M. T. et al. Glutathione s-transferase (GSTT1 rs17856199) and nitric oxide synthase (nos2 rs2297518) genotype combination as potential oxidative stress-related molecular markers for type 2 diabetes mellitus. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity**, v. 14, p. 1385–1403, 2021.

HAMCZYK, M. R. et al. Biological Versus Chronological Aging: JACC Focus Seminar. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 75, n. 8, p. 919–930, 2020.

HAZELDINE, J.; LORD, J. M. The impact of ageing on natural killer cell function and potential consequences for health in older adults. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 4, p. 1069–1078, 2013.

HEMMINGS, B. A.; RESTUCCIA, D. F. PI3K-PKB/Akt pathway. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 9, 2012.

HESHMATI, J. Effect of omega-3 fatty acid supplementation on gene expression of inflammation, oxidative stress and cardiometabolic parameters: Systematic review and meta-analysis. **Journal of Functional Foods**, v. 85, 2021.

HSIEH, H. M.; WU, W. M.; HU, M. L. Genistein attenuates D-galactose-induced oxidative damage through decreased reactive oxygen species and NF- κ B binding activity in neuronal PC12 cells. **Life Sciences**, v. 88, n. 1–2, p. 82–88, 2011.

JAUL, E.; BARRON, J. Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. **Frontiers in Public Health**, v. 5, 2017.

JEON, Y. J. et al. Rhododendrin inhibits toll-like receptor-7-mediated psoriasis-like skin inflammation in mice. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 49, n. 6, 2017.

JUMP, D. B. et al. Impact of dietary fat on the development of non-alcoholic fatty liver disease in Ldlr-/- mice. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 75, n. 1, p. 1–9, 2016.

KANG, S. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids protect human hepatoma cells from developing steatosis through FFA4 (GPR120). **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1863, n. 2, p. 105–116, 2018.

KATO, H. et al. Advanced oxidation protein products contribute to chronic kidney disease-induced muscle atrophy by inducing oxidative stress via CD36/NADPH oxidase pathway. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 12, n. 6, p. 1832–1847, 2021.

KAUR, G. et al. Docosapentaenoic acid (22:5n-3): A review of its biological effects. **Progress in Lipid Research**, v. 50, n. 1, p. 28–34, 2011.

KAVYANI, Z. et al. Efficacy of the omega-3 fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: An umbrella meta-analysis. **International Immunopharmacology**, v. 111, 2022.

KHADGE, S. et al. Dietary omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids modulate hepatic pathology. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 52, p. 92–102, 2018.

KHAN, S. A. et al. Omega 3 fatty acids - Potential modulators for oxidative stress and inflammation in the management of sickle cell disease. **Jornal de Pediatria**, v. 34, n. 18, p. 1-6, 2022.

KIM, S.; WON, C. W. Sex-different changes of body composition in aging: a systemic review. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 102, 2022.

KLEINER, D. E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313–1321, 2005.

KO, F. et al. Impaired mitochondrial degradation by autophagy in the skeletal muscle of the aged female interleukin 10 null mouse. **Experimental Gerontology**, v. 73, p. 23–27, 2016.

KOVAIOU, R. D.; HERNDLER-BRANDSTETTER, D.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. Age-related changes in immunity: Implications for vaccination in the elderly. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 9, n. 3, p. 1–17, 2007.

KRABBE, K. S.; PEDERSEN, M.; BRUUNSGAARD, H. Inflammatory mediators in the elderly. **Experimental Gerontology**, v. 39, n. 5, p. 687–699, 2004.

KUHN, R. et al. Interleukin-10-Deficient Mice Develop Chronic Enterocolitis. **Cell**, v. 75, p. 263–274, 1993.

KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, 2016.

LEHALLIER, B. et al. Undulating changes in human plasma proteome profiles across the lifespan. **Nature Medicine**, v. 25, n. 12, p. 1843–1850, 2019.

LI, C. WEI et al. Circulating factors associated with sarcopenia during ageing and after intensive lifestyle intervention. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 10, n. 3, p. 586–600, 2019.

LI, S.; FASIPE, B.; LAHER, I. Potential harms of supplementation with high doses of antioxidants in athletes. *Journal of Exercise Science and Fitness*. **J Exerc Sci Fit**, v. 20, p. 269-275, 2022.

LIANG, Z. et al. Inflammaging: The ground for sarcopenia?. **Experimental Gerontology**, v. 169, 2022.

LIPINA, C.; HUNDAL, H. S. Modulation of cellular redox homeostasis by the endocannabinoid system. **Open Biology**, v. 6, n. 4, 2016.

LIU, S. H. et al. Fish oil enriched ω -3 fatty acids ameliorates protein synthesis/degradation imbalance, inflammation, and wasting in muscles of diet-induced obese rats. **Journal of Functional Foods**, v. 87, 2021.

LIU, Y. et al. Inhibits TLR4 and NOD2 Signaling Pathways in Weaned Pigs after LPS Challenge 1-3. **Journal of Nutrition**, v. 142, n. 11, p. 2017–2024, 2012.

LÓPEZ-OTÍN, C. et al. The hallmarks of aging. **Cell**, v. 153, p. 1194-1217, 2013.

MARCHITTI, S. A. et al. Ultraviolet radiation: Cellular antioxidant response and the role of ocular aldehyde dehydrogenase enzymes. **Eye and Contact Lens**, v. 37, n. 4, p. 206–213, 2011.

MARCON, R. et al. Maresin 1, a Proresolving Lipid Mediator Derived from Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Exerts Protective Actions in Murine Models of Colitis. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 8, p. 4288–4298, 2013.

MCBURNEY, M. I.; TINTLE, N. L.; HARRIS, W. S. The omega-3 index is inversely associated with the neutrophil-lymphocyte ratio in adults'. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 177, 2022.

MEFTAH, G. H. et al. The possible pathophysiology mechanism of cytokine storm in elderly adults with COVID-19 infection: the contribution of “inflammageing”. **Inflammation Research**, v. 69, n. 9, p. 825–839, 2020.

MELLO, A. H. et al. Omega-3 Fatty Acids Attenuate Brain Alterations in High-Fat Diet-Induced Obesity Model. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 1, p. 513–524, 2019.

MERZ, M. P.; TURNER, J. D. Is early life adversity a trigger towards inflammaging? **Experimental Gerontology**, v. 150, 2021.

METCALF, T. U. et al. Human Monocyte Subsets Are Transcriptionally and Functionally Altered in Aging in Response to Pattern Recognition Receptor Agonists. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 4, p. 1405–1417, 2017.

MILES, E. A.; CALDER, P. C. Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. SUPPL. 2, 2012.

MIRANDA, G. M. D.; MENDES, A. DA C. G.; SILVA, A. L. A. DA. Population aging in Brazil: current and future social challenges and consequences. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 19, n. 3, p. 507–519, 2016.

MORLEY, J. E. et al. Sarcopenia. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 137, n. 4, p. 231–243, 2001.

MORRISETTE-THOMAS, V. et al. Inflamm-aging does not simply reflect increases in pro-inflammatory markers. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 139, n. 1, p. 49–57, 2014.

MOURA-ASSIS, A. et al. Flaxseed oil rich in omega-3 protects aorta against inflammation and endoplasmic reticulum stress partially mediated by GPR120 receptor in obese, diabetic and dyslipidemic mice models. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 53, p. 9–19, 2018.

MUJICO, J. R. et al. Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 4, p. 711–720, 2013.

MURPHY, R. A. et al. Nutritional intervention with fish oil provides a benefit over standard of care for weight and skeletal muscle mass in patients with nonsmall cell lung cancer receiving chemotherapy. **Cancer**, v. 117, n. 8, p. 1775–1782, 2011.

NAIK, E.; DIXIT, V. M. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 3, p. 417–420, 2011.

NATHAN, C.; CUNNINGHAM-BUSSEL, A. Beyond oxidative stress: An immunologist's guide to reactive oxygen species. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 5, p. 349–361, 2013.

OH, D. Y. et al. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. **Cell**, v. 142, n. 5, p. 687–698, 2010.

ORTMANN, W.; KOLACZKOWSKA, E. Age is the work of art? Impact of neutrophil and organism age on neutrophil extracellular trap formation. **Cell and Tissue Research**, v. 371, n. 3, p. 473–488, 2018.

OSTAN, R. et al. Gender, aging and longevity in humans: An update of an intriguing/neglected scenario paving the way to a gender-specific medicine. **Clinical Science**, v. 130, n. 19, p. 1711–1725, 2016.

PALMER, D. B. The effect of age on thymic function. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013.

PAN, L. et al. Inflammation and sarcopenia: A focus on circulating inflammatory cytokines. **Experimental Gerontology Elsevier Inc.**, v. 154, 2021.

PAN, L. et al. Inflammation and sarcopenia: A focus on circulating inflammatory cytokines. **Experimental Gerontology**, v. 154, 2021.

PANDA, A. et al. Age-Associated Decrease in TLR Function in Primary Human Dendritic Cells Predicts Influenza Vaccine Response. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 5, p. 2518–2527, 2010.

PARK, Y.; HARRIS, W. S. Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. **Journal of Lipid Research**, v. 44, n. 3, p. 455–463, 2003.

PEDERSEN, M. et al. Circulating levels of TNF-alpha and IL-6-relation to truncal fat mass and muscle mass in healthy elderly individuals and in patients with type-2 diabetes. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 124, n. 4, p. 495–502, 2003.

PERRY, C. et al. A Buffered Alcohol-Based Fixative for Histomorphologic and Molecular Applications. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 64, n. 7, p. 425–440, 2016.

PIGGOTT, D. A. et al. Frailty, inflammation, and mortality among persons aging with HIV infection and injection drug use. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 70, n. 12, p. 1542–1547, 2015.

POMATTO, L. C. D.; DAVIES, K. J. A. The role of declining adaptive homeostasis in ageing. **Journal of Physiology**, v. 595, n. 24, p. 7275–7309, 2017.

POMPELLA, A. et al. The use of total antioxidant capacity as surrogate marker for food quality and its effect on health is to be discouraged. **Nutrition**, v. 30, n. 7–8, p. 791–793, 2014.

PORRAS, D. et al. Protective effect of quercetin on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice is mediated by modulating intestinal microbiota imbalance and related gut-liver axis activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 102, p. 188–202, 2017.

POTHINENI, N. V. K. et al. Infections, atherosclerosis, and coronary heart disease. **European Heart Journal**, v. 38, n. 43, p. 3195–3201, 2017.

PRADO, R. Q. et al. Attenuation of experimental asthma by mycobacterial protein combined with CpG requires a TLR9-dependent IFN- γ -CCR2 signalling circuit. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 45, n. 9, p. 1459–1471, 2015.

PUSCEDDU, M. M. et al. N-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) reverse the impact of early-life stress on the gut microbiota. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, 2015.

PUZIANOWSKA-KUŹNICKA, M. et al. Interleukin-6 and C-reactive protein, successful aging, and mortality: The PolSenior study. **Immunity and Ageing**, v. 13, n. 1, 2016.

RADZIKOWSKA, U. et al. The influence of dietary fatty acids on immune responses. **Nutrients**, v. 11, n. 12, 2019.

RAO, M. S.; MATTSON, M. P. Stem cells and aging: expanding the possibilities. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 122, p. 713–734, 2001.

RASMUSSEN, B. B. et al. Insulin resistance of muscle protein metabolism in aging. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 6, p. 768–769, 2006.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **J. Nutr**, v. 123, p. 1939–1951, 1993.

RICHARD, D. et al. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. **Pharmacological Research**, v. 57, n. 6, p. 451–455, 2008.

RODRIGUEZ-ROSALES, Y. A. et al. Immunomodulatory aged neutrophils are augmented in blood and skin of psoriasis patients. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 148, n. 4, p. 1030–1040, 2021.

ROMÁN, G. C. et al. Mediterranean diet: The role of long-chain ω -3 fatty acids in fish; polyphenols in fruits, vegetables, cereals, coffee, tea, cacao and wine; probiotics and vitamins in prevention of stroke, age-related cognitive decline, and Alzheimer disease. **Revue Neurologique**, v. 175, n. 10, p. 724–741, 2019.

RONG, Y. D. et al. Study on relationship between elderly sarcopenia and inflammatory cytokine IL-6, anti-inflammatory cytokine IL-10. **BMC Geriatrics**, v. 18, n. 1, 2018.

ROSENFELDT, F. et al. Oxidative stress in surgery in an ageing population: Pathophysiology and therapy. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 1, p. 45–54, 2013.

RUSSO, G. L. Dietary n - 6 and n - 3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 6, p. 937–946, 2009.

RUTH, M. R.; PROCTOR, S. D.; FIELD, C. J. Effects of feeding fish oil on mesenteric lymph node cytokine responses in obese leptin receptor-deficient JCR:LA-cp rats. **International Journal of Obesity**, v. 33, n. 1, p. 96–103, 2009.

RYAN, A. M. et al. Enteral nutrition enriched with eicosapentaenoic acid (EPA) preserves lean body mass following esophageal cancer surgery: Results of a double-blinded randomized controlled trial. **Annals of Surgery**, v. 249, n. 3, p. 355–363, 2009.

SALA, D.; SACCO, A. Signal transducer and activator of transcription 3 signaling as a potential target to treat muscle wasting diseases. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 19, n. 3, p. 171-176, 2016.

SALVIOLI, S. et al. Immune System, Cell Senescence, Aging and Longevity-Inflamm-Aging Reappraised. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, p. 1675, 2013.

SANSONI, P. et al. The immune system in extreme longevity. **Experimental Gerontology**, v. 43, n. 2, p. 61–65, 2008.

SANSONI, P. et al. New advances in CMV and immunosenescence. **Experimental Gerontology**, v. 55, p. 54–62, 2014.

SANTORO, A. et al. Microbiomes other than the gut: inflammaging and age-related diseases. **Seminars in Immunopathology**, v. 42, p. 589–605, 2005.

SANTORO, A. et al. Inflammaging, hormesis and the rationale for anti-aging strategies. **Ageing Research Reviews**, v. 64, 2020.

SANTORO, A.; BIENTINESI, E.; MONTI, D. Immunosenescence and inflammaging in the aging process: age-related diseases or longevity? **Ageing Research Reviews**, v. 71, 2021.

SANTOS, M. L. A. S. et al. Muscle strength, muscle balance, physical function and plasma interleukin-6 (IL-6) levels in elderly women with knee osteoarthritis (OA). **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 52, n. 3, p. 322–326, 2011.

SCHIAFFINO, S.; MAMMUCARI, C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: Insights from genetic models. **Skeletal Muscle**, v. 1, n. 1, 2011.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. 453-463, 2014.

SCHMITT, V.; RINK, L.; UCIECHOWSKI, P. The Th17/Treg balance is disturbed during aging. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 12, p. 1379–1386, 2013.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SELYE H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. **Nature**, v. 138, p. 32, 1936.

SERGIO, G. Exploring the complex relations between inflammation and aging (inflamm-aging): Anti-inflamm-aging remodelling of inflamm- aging, from robustness to frailty. **Inflammation Research**, 2008.

SHARIFI-RAD, M. et al. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 11, 2020.

SHARMA, V.; MEHDI, M. M. Oxidative stress, inflammation and hormesis: The role of dietary and lifestyle modifications on aging. **Neurochemistry International**, v. 164, 2023.

SHAW, A. C.; GOLDSTEIN, D. R.; MONTGOMERY, R. R. Age-dependent dysregulation of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 12, p. 875–887, 2013.

SHIMABUKURO-VORNHAGEN, A. et al. Cytokine release syndrome. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 6, n. 1, 2018.

SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2015.

SIKKA, G. et al. Interleukin 10 knockout frail mice develop cardiac and vascular dysfunction with increased age. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 2, p. 128–135, 2013.

SIMELL, B. et al. Aging reduces the functionality of anti-pneumococcal antibodies and the killing of *Streptococcus pneumoniae* by neutrophil phagocytosis. **Vaccine**, v. 29, n. 10, p. 1929–1934, 2011.

SINGH, Y. P. et al. Structure and antioxidant superoxide dismutase activity of copper(II) hydrazone complexes. **Polyhedron**, v. 122, p. 1–15, 2017.

SMITH, G. I. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids augment the muscle protein anabolic response to hyperinsulinaemia-hyperaminoacidaemia in healthy young and middle-aged men and women. **Clinical Science**, v. 121, n. 6, p. 267–278, 2011.

SMITH, G. I. et al. Fish oil-derived n-3 PUFA therapy increases muscle mass and function in healthy older adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, n. 1, p. 115–122, 2015.

SOARES GONÇALVES VELASQUE, M. J. et al. Fish Oil - Omega-3 Exerts Protective Effect in Oxidative Stress and Liver Dysfunctions Resulting from Experimental Sepsis. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, 2022.

SONG, Y.; MIAO, Y.; SONG, C. P. Behind the scenes: The roles of reactive oxygen species in guard cells. **New Phytologist**, v. 201, n. 4, p. 1121–1140, 2014.

SOROKIN, A. V. et al. Comparison of the dietary omega-3 fatty acids impact on murine psoriasis-like skin inflammation and associated lipid dysfunction. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 117, 2023.

SOUZA, P. R. et al. Enriched Marine Oil Supplements Increase Peripheral Blood Specialized Pro-Resolving Mediators Concentrations and Reprogram Host Immune Responses: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. **Circulation Research**, p. 75–90, 2020.

SOYSAL, P. et al. Inflammation and frailty in the elderly: A systematic review and meta-analysis. **Ageing Research Reviews**, v. 31, p. 1–8, 2016.

SPAZZAFUMO, L. et al. Remodelling of biological parameters during human ageing: Evidence for complex regulation in longevity and in type 2 diabetes. **Age**, v. 35, n. 2, p. 419–429, 2013.

SUN, M. et al. Attenuating effects of omega-3 fatty acids (Omegaven) on irradiation-induced intestinal injury in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 64, p. 275–280, 2014.

TAKEDA, T.; HOSOKAWA, M.; HIGUCHI, K. Senescence-accelerated mouse (sam): a novel murine model of senescence. **Experimental Gerontology**, v. 32, n. 2, p. 105–109, 1997.

TETRI, L. H. et al. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 295, p. 987–995, 2008.

TRAMPISCH, U. S. et al. Optimal jamar dynamometer handle position to assess maximal isometric hand grip strength in epidemiological studies. **Journal of Hand Surgery**, v. 37, n. 11, p. 2368–2373, 2012.

TRZONKOWSKI, P. et al. From bench to bedside and back: The SENIEUR Protocol and the efficacy of influenza vaccination in the elderly. **Biogerontology**, v. 10, n. 1, p. 83–94, 2009.

TSE, H. M. et al. Disruption of Innate-Mediated Proinflammatory Cytokine and Reactive Oxygen Species Third Signal Leads to Antigen-Specific Hyporesponsiveness. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 2, p. 908–917, 2007.

TU, W.; RAO, S. Mechanisms underlying T cell immunosenescence: Aging and cytomegalovirus infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

UNITED NATION. **World Population Ageing 2019**. 2019

UNITED NATION. **World social report 2023: Leaving no one behind in an ageing world**. 2023.

VARADHAN, R. et al. Simple biologically informed inflammatory index of two serum cytokines predicts 10 year all-cause mortality in older adults. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 69 A, n. 2, p. 165–173, 2014.

VONA, R. et al. Biomarkers of oxidative stress in metabolic syndrome and associated diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

VOROBEVA, N. V.; CHERNYAK, B. V. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. **Biochemistry (Moscow)**, v. 85, n. 10, p. 1178–1190, 2020.

WALSTON, J. et al. The Physical and Biological Characterization of a Frail Mouse Model. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 63, n. 4, p. 391–398, 2008.

WAN, M. T. et al. Psoriasis and the risk of diabetes: A prospective population-based cohort study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 78, n. 2, p. 315- 322, 2018.

WANG, T. Searching for the link between inflammaging and sarcopenia. **Ageing Research Reviews**, v. 77, 2022.

WASMÁLIA, P. et al. Projeções da população do brasil por sexo e idade para o período 2000/2060. **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE**. 2013.

WEI, Y. et al. Balanced basal-levels of ROS (redox-biology), and very-low-levels of pro-inflammatory cytokines (cold-inflammaging), as signaling molecules can prevent or slow-down overt-inflammaging, and the aging-associated decline of adaptive-homeostasis. **Experimental Gerontology**, v. 172, 2023.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.

WHITE, J. P. et al. IL-6 regulation on skeletal muscle mitochondrial remodeling during cancer cachexia in the ApcMin/+ mouse. **Skeletal Muscle**, v. 2, n. 1, 2012.

WILLIS, C. M. et al. Soluble factors influencing the neural stem cell niche in brain physiology, inflammation, and aging. **Experimental Neurology**, v. 355, 2022.

WILSON, D. et al. Frailty and sarcopenia: The potential role of an aged immune system. **Ageing Research Reviews**, v. 36, p. 1–10, 2017.

WOLF, D.; LEY, K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 124, n. 2, p. 315–327, 2019.

WOODS, J. L. et al. Poor physical function in elderly women in low-level aged care is related to muscle strength rather than to measures of sarcopenia. **Clinical Interventions in Aging**, v. 6, n. 1, p. 67–76, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Decade of Healthy Ageing The Global strategy and action plan on ageing and health 2016-2020: towards a world in which everyone can live a long and healthy life., v. 15, n. 1, 2020.

YOUM, Y. H. et al. Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 4, p. 519–532, 2013.

YOUSEFZADEH, M. J. et al. An aged immune system drives senescence and ageing of solid organs. **Nature**, v. 594, n. 7861, p. 100–105, 2021.

YU, H. N. et al. Effects of Fish Oil with a High Content of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Mouse Gut Microbiota. **Archives of Medical Research**, v. 45, n. 3, p. 195–202, 2014.

ZENG, C. et al. Resolvin D1 ameliorates hepatic steatosis by remodeling the gut microbiota and restoring the intestinal barrier integrity in DSS-induced chronic colitis. **International Immunopharmacology**, v. 103, 2022.

ZHANG, B. et al. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. **Redox Report**, v. 27, n. 1, p. 45–52, 2022.

ZUO, L. et al. Inflammaging and oxidative stress in human diseases: From molecular mechanisms to novel treatments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, 2 set. 2019.

10. ANEXOS

10.1. Anexo I. Autorização da instituição para a utilização de animais para fins de pesquisa.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CEUA
FMRP-USP
Comissão de Ética no Uso de Animais
Replacement | Reduction | Refinement

A U T O R I Z A Ç Ã O

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: **“Efeito da suplementação dietética com ácido graxo poliinsaturado ômega-3 na resposta imunológica e muscular de camundongos knockout IL-10”**, registrado com o número do protocolo **247/2019**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Eduardo Ferrioli**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 29 de junho de 2020.

Colaboradores: Daniela Dalpabel Campanari
Profª. Dra. Vania Luiza Deperon Bonato
Bruno José Conti
Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva

Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade			() Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização			29/06/2020 a 06/06/2021	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem
Camundongo / C57Bl 6	24	20g / 42 dias	Fêmea	Serviço de Biotério
Camundongo / IL-10 KO	24	20g / 42 dias	Fêmea	Centro de Criação de Camundongos Especiais

Ribeirão Preto, 29 de junho de 2020

Profª. Dra. Katiuchia Uzzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP

10.2. Anexo II. Comprovante de submissão do manuscrito à Revista *Nutrients*.

ddalpubel@gmail.com My Profile (/user/edit) Logout Submit (/user/manuscripts/upload)

 (<https://susy.mdpi.com>) Journals (<https://www.mdpi.com/about/journals/>) Topics (<https://www.mdpi.com/topics>)

Information (<https://www.mdpi.com/guidelines>) Author Services (<https://www.mdpi.com/authors/english>) Initiatives

About (<https://www.mdpi.com/about>)

User Menu 		Assigned Editor	Anita Wang			
Home (/user/myprofile)		Journal	Nutrients			
Manage Accounts (/user/manage_accounts)		Manuscript Status	Pending minor revisions			
Change Password (/user/chgpwd)		Manuscript ID	nutrients-2801979			
Edit Profile (/user/edit)		Type	Article			
Logout (/user/logout)		Recruiting Reviewers	yes			
		Title	Effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acid on the generation of regulatory T lymphocyte and on antioxidant parameters and markers of oxidative stress in liver tissue of IL-10 knockout mice.			
		Manuscript	manuscript.docx (/user/manuscripts/displayFile/dd5cfa6f22817dc60635e434da064a1e)			
		Manuscript	manuscript.pdf (/user/manuscripts/displayFile/dd5cfa6f22817dc60635e434da064a1e/review)			
Submissions Menu 		Authors				
Submit Manuscript (/user/manuscripts/upload)		Mrs.	Daniela Dalpubel Campanari *	danieladalpubel@usp.br	B R	Universidade...
Display Submitted Manuscripts (/user/manuscripts/status)		Ms.	Ualter Guilherme Cipriano	ualtercipriano@usp.br	B R	Universidade...
English Editing (/user/pre_english_article/status)		Prof. Dr.	Thais Fernanda de Campos Fraga Silva 	thaisfragasilva@gmail.com	B R	Universidade...
Discount Vouchers (/user/discount_voucher)		Prof. Dr.	Leandra Naira Zambelli Ramalho	lramalho@fmrp.usp.br	B R	University of ...
Invoices (/user/invoices)		Ms.	Paula Payão Ovídio	ppayao@usp.br	B R	Department o...
LaTeX Word Count (/user/get/latex_word_count)		Prof. Dr.	Alceu Afonso Jordão	alceu@fmrp.usp.br	B R	Department o...
		Prof. Dr.	Vânia L.D. Bonato	vlbonato@fmrp.usp.br	B R	Departament...

Reviewers Menu 



[\(/volunteer_reviewer_info/view\)](#)

Eduardo Ferrioli

Prof.  [eferriol@fmrp.u](mailto:eferriol@fmrp.usp.br) B
 Dr. ([https://sciprofiles.c](https://sciprofiles.com/profile/2295849) sp.br R Department o...

Section	Nutritional Immunology (https://www.mdpi.com/journal/nutrients/sections/Nutritional_Immunology)
Author Contributions	Conceptualization, Daniela Dalpabel Campanari and Eduardo Ferrioli; Methodology, Daniela Dalpabel Campanari, Ualter Guilherme Cipriano, Thais Fernanda de Campos Fraga Silva, Leandra Naira Zambelli Ramalho, Paula Payão Ovídio and Alceu Afonso Jordão; Formal analysis, Daniela Dalpabel Campanari and Thais Fernanda de Campos Fraga Silva; Investigation, Daniela Dalpabel Campanari, Ualter Guilherme Cipriano and Thais Fernanda de Campos Fraga Silva; Writing – original draft, Daniela Dalpabel Campanari and Eduardo Ferrioli; Writing – review & editing, Ualter Guilherme Cipriano; Supervision, Vânia L.D. Bonato and Eduardo Ferrioli.
Coverletter	Text
Number of Words	4150
Submission Received	15 December 2023
<i>Preprints.org</i>	Post a preprint of your work immediately at our platform <i>Preprints.org</i> (https://www.preprints.org). <i>More...</i>

Reply to Reviewers

Please download the latest version of the manuscript for revision. Your original submission may have been changed.

Manuscript for Revisions	Download Manuscript (/user/manuscripts/displayFile/dd5cfa6f22817dc60635e434da06)
Reviewer 1	Review Report (Round 1) (/user/manuscripts/review/45047055?report=34254532) <i>Click here (/user/manuscripts/review/45047055?report=34254532) to upload your response to reviewer.</i>
Reviewer 2	Review Report (Round 1) (/user/manuscripts/review/45093404?report=34291747) <i>Click here (/user/manuscripts/review/45093404?report=34291747) to upload your response to reviewer.</i>
Reviewer 3	Review Report (Round 1) (/user/manuscripts/review/45150274?report=34337850) <i>Click here (/user/manuscripts/review/45150274?report=34337850) to upload your response to reviewer.</i>
	<p>If there has been a change in the authorship during revisions of your paper, please download the "Authorship Change Form" (/user/download/authorship_form_file/dd5cfa6f22817dc60635e434)</p>



da064a1e)" to provide details of the change, then please upload it together with your resubmission.

Submit Revised Manuscript

Options to upload a new version of your manuscript will be available once all the reviewer comments have been replied to.

Language Editing

If the reviewers or editor recommended English language editing, this can be arranged by MDPI. Note that language editing by MDPI is not compulsory, nor does it guarantee that your manuscript will eventually be accepted for publication. Click on the link for more information and to request a quotation.

More information on English editing from MDPI
(<https://www.mdpi.com/authors/english?id=2801979>).