

**UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO - USF**  
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

**QUÉLITA CRISTINA PEREIRA**

**EFEITOS DA ERVA MATE  
(*ILEX PARAGUARIENSIS*) NA MODULAÇÃO DO PROCESSO DE  
SARCOPENIA RELACIONADA AO ENVELHECIMENTO EM  
CAMUNDONGOS**

Bragança Paulista  
2022

**QUÉLITA CRISTINA PEREIRA – RA: 202113416**

**EFEITOS DA ERVA MATE  
(*ILEX PARAGUARIENSIS*) NA MODULAÇÃO DO PROCESSO DE  
SARCOPENIA RELACIONADA AO ENVELHECIMENTO EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof.(a) Dr.(a) Marcelo Lima Ribeiro  
Coorientadora: Dr.(a) Tanila Wood dos Santos

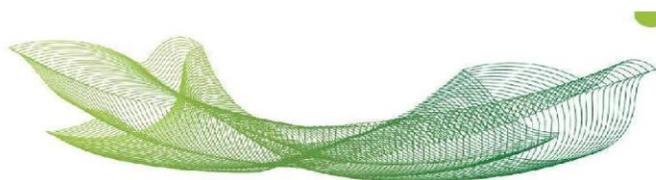
Bragança Paulista  
2022

QV 766 Pereira, Quélita Cristina  
P494e Efeitos da Erva Mate (*Ilex paraguariensis*) na modulação do processo de sarcopenia relacionada ao envelhecimento em camundongos / Quélita Cristina Pereira. – Bragança Paulista, 2022.  
91 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde.

Orientação de: Marcelo Lima Ribeiro.

1. Envelhecimento. 2. Massa muscular. 3. Sarcopenia.  
4. Polifenóis. 5. *Ilex paraguariensis*. 6. Camundongos.  
I. Ribeiro, Marcelo Lima. II. Título.



## Educando para a paz

**PEREIRA, Quélita Cristina.** “Efeitos da erva mate (*Ilex paraguariensis*) na modulação da sarcopenia associada ao envelhecimento em camundongos”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 19 de dezembro de 2022 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro - Orientador e Presidente  
Universidade São Francisco

Profa. Dra. Cintia Rabelo e Paiva Caria  
Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Manoela Marques Ortega  
Universidade São Francisco

## DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais Sr. Daniel Pereira e Sra. Fátima Pereira, que são minha fonte de inspiração e força diária, que de modo singelo renunciaram a muitas coisas para me ajudar a construir esse sonho, essa conquista é nossa.

## AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente pelo dom supremo da vida, por sua graça e misericórdia que me alcançam todos os dias. Ainda que possuísse aqui na terra todo dom da ciência, todos os bens e riquezas, e não tivesse a ti como meu Salvador e Senhor, eu nada teria. A ti seja toda honra, glória e louvor. Amém!

Ao meu pai Daniel Pereira, por ser meu amigo, meu herói e meu protetor. Me faltam palavras para expressar minha gratidão por tudo o que o senhor é e faz por mim. A minha mãe Fátima Pereira, minha melhor amiga de uma vida toda, obrigada por nunca me permitir desistir dos meus sonhos, e por estar comigo em todos os momentos. Vocês são anjos de Deus na minha vida aqui nessa terra, renunciaram a tudo para estarem comigo vivendo esse sonho.

Essa conquista é nossa!

Minha querida Vó Cida, minha maior intercessora, suas orações são bálsamo para minha vida, obrigada por tudo e principalmente por compreender minhas ausências. A senhora é minha fonte de inspiração.

Meus queridos tios, Maria e Izadir, Victor e Marinete, Benedito e Lena, Christina e Iraci, José Carlos e Rita, Benedita e José, Luís Carlos e Rosimeire, Claudete, Marcos e a todos os meus queridos primos e familiares, mas em especial aqueles que estiveram mais próximos e me apoiaram de forma incondicional durante todo esse processo, Rafa, Adna, Miquéias, Oséias, Ozias. E em especial a Glaucia, Gleice, Aniele, Hadassa e ao meu pequeno amor Evellyn, obrigada por tudo, e por estarem presentes na minha vida sempre apesar da distância física, vocês são minha fonte de apoio todos os dias.

Ao meu estimado Orientador Professor Dr. Marcelo Lima Ribeiro, que me acompanha desde o início da minha jornada acadêmica. Obrigada pela oportunidade, por todo seu apoio, dedicação, comprometimento, profissionalismo, prestatividade, e principalmente por toda paciência para comigo ao longo dessa jornada.

A minha querida Coorientadora Professora Dra. Tanila Wood dos Santos, que também me acompanha desde o início da minha vida acadêmica. Obrigada por tudo, por cada ensinamento,

por toda sua dedicação, comprometimento, prestatividade, paciência, mas principalmente pelo privilégio da sua amizade, você é um presente de Deus para minha vida e me inspira sempre.

A querida Professora Dra. Alessandra Gambero, obrigada por todo carinho, apoio, dedicação, prestatividade, cooperação e por estar comigo nos momentos que precisei.

A querida Professora Dra. Raquel de Cássia dos Santos, na qual tive o privilégio de trabalhar ao seu lado. Obrigada por me abraçar quando mais precisei e por não me permitir desistir em nenhum momento. Obrigada por seu comprometimento, profissionalismo, dedicação, prestatividade, paciência, e por toda confiança depositada em mim.

A queridíssima Professora Ana Veiga, que é a principal responsável, por eu estar vivendo a realização desse sonho hoje, sua indicação para que eu ingressasse na IC, fez e faz toda diferença na minha vida, sou eternamente grata. Aos Professores Dr. Lúcio Ferraz, Dra. Giovanna Longato, Dra. Manoela Ortega, Dra. Michelle Darrieux e Dra. Cintia Caria por todo apoio e carinho ao longo da minha trajetória.

Aos meus queridos estimados amigos que estiveram comigo ao longo dessa trajetória acadêmica Felipe e Mel. Obrigada por todo apoio, ajuda, incentivo e por viver intensamente cada momento ao meu lado. A querida Isabela, outro presente que a vida acadêmica me deu. Obrigada por todo apoio e companheirismo sempre, de sempre. Aos meus pupilos queridos, Samuel e Catarina. Obrigada por todo carinho e amizade, vocês de uma maneira especial e singular fazem toda a diferença na minha vida. A Dona Alice, nossa querida anfitriã, obrigada por ser esse ser tão iluminado e por todo cuidado que a senhora tem conosco. A todos amigos e professores dos Laboratórios do Prédio 7, obrigada pela parceria e apoio.

Aos meus queridos amigos Marília, Carol, Samantha, Jade, Grazi, e Jonas por todo brilhantismo e companheirismo ao longo desses anos. E a querida Roberta, na qual tive o privilégio de ser parceira de mestrado, obrigada por sua amizade.

Meus queridos Rodolfo e Suely Dalprat, obrigada por serem canal de Deus para mim, vocês são presentes em forma de gente na minha vida, me sinto extremamente honrada pelo privilégio de sua amizade.

Minhas queridas amigas e irmãs Kéllany. Kallytha, Silvânia, Fausta e Sara, e todos seus familiares, obrigada por serem meu apoio e por estarem sempre ao meu lado, eu amo vocês!

Querida amiga Sarah Souza, você tem sido de uma maneira tão nobre um instrumento de Deus na minha vida, obrigada por cada palavra, cada gesto, cada carinho, e principalmente pelas suas orações, você faz toda diferença na minha vida, me faltam palavras para expressar.

Meus queridos e estimados amigos e irmãos, Felipe, Aline Souza, Débora Cavaglieri, Dra. Gilvânia Prudêncio, Cíntia, Gezefer, Isabelly, Thiago Mendes, Raquel, Henrique, Fabiano, Helder, Ester, Joice, Mariana, Priscila, Aline, Ju. Vocês são como bálsamo na minha vida, obrigada por todo apoio, amizade e principalmente pelas orações.

Meu querido Pastor Dr. Edvaldo Florêncio e sua mui digna esposa Sra. Ireni Carlos, obrigada pelo apoio incondicional, por cada palavra de ânimo e por cada oração.

Aos meus amigos e irmãos na fé, obrigada por todo apoio e orações.

À banca examinadora pelo prestigioso trabalho e pela contribuição, aos professores, funcionários e colaboradores da universidade que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação acadêmica. Em especial aos bioteiristas que trabalham incansavelmente para que nosso trabalho possa ser realizado.

A Universidade São Francisco e ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciência da Saúde pela oportunidade, apoio e contribuição para minha formação acadêmica, em especial a Andrea, secretária da pós, por todo suporte e prestatividade durante esse processo, e a Professora Dra. Patrícia Carvalho por todo apoio.

E a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo fomento e apoio financeiro para que a realização deste trabalho fosse possível.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento: 88887.601586/2021-00”.

Que Deus retribua a cada um de vocês em bençãos sem medidas.

Minha eterna gratidão!

## RESUMO

Os rápidos avanços na medicina moderna têm contribuído significativamente para um aumento constante da expectativa de vida. Evidências apontam para a existência de eventos moleculares que são afetados com o avanço da idade e estão diretamente associados a fenótipos característicos do envelhecimento celular. Dentre eles, a sarcopenia, destaca-se como uma alteração funcional importante, sendo um dos principais problemas relacionados com o processo de envelhecimento, é ocasionado pela perda gradativa de massa muscular esquelética, força muscular e funcionalidade. Evidências apontam que compostos naturais são capazes de aumentar a expectativa de vida e retardam a ocorrência de doenças relacionadas à idade. Dentre os compostos naturais usados para contrabalancear as disfunções associadas ao envelhecimento destaca-se a erva-mate (EM), *Ilex paraguariensis*, cuja atividade antioxidante, antiinflamatória, imunomodulatória, anticancerígena e antiadipogênica já foram reportadas por nosso grupo de pesquisa. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação com EM no processo de sarcopenia relacionada ao envelhecimento em camundongos. Foram utilizados Camundongos machos C57Bl6 com 4 semanas de idade, provenientes do CEMIB-Unicamp, foram divididos em 2 grupos (n=5) conforme a dieta oferecida, nos quais um deles foi alimentado com ração AIN-93m padrão (CT) e outro com a mesma ração porém com adição de extrato de erva mate liofilizado (1,2 g/Kg de dieta) (CT-MT), por um período de 20 meses, foram avaliados a evolução do peso corpóreo, ingesta alimentar, realizados testes de força e gasto energético, após eutanasiados foram coletadas amostras biológicas para análises. Adicionalmente, um outro grupo de mesma idade, passando pelos mesmos testes, foi considerado controle jovem (CTJ) (n=5) foi alimentado apenas com AIN-93, passando pelos mesmos testes, a eutanásia foi realizada após 8 semanas. Para as análises foram utilizadas a avaliação da evolução da composição corporal, análise da expressão gênica através da PCR em tempo real, sendo avaliados o conteúdo de DNA mitocondrial e genes envolvidos no processo de biogênese mitocondrial e sarcopenia. O consumo de EM foi eficiente para a manutenção do peso corporal, bem como promoveu melhorias na composição corporal, através da redução do peso de gordura visceral e manutenção da massa muscular. Promoveu aumento do número de cópias de DNA mitocondrial (p 0.0003), bem como da expressão gênica de *Nrf1* (p 0.0002), *Nrf2* (p < 0.00001), *mtTFA* (p < 0.00001), *Pgc1a* (p < 0.00001), *Sirt1* (p < 0.00001), *Ampka2* (p < 0.00001), e *UCP3* (p < 0.00001), indicando estímulo de biogênese mitocondrial no grupo CT+MT em relação aos demais grupos, desse modo favoreceu a melhora da qualidade muscular através dos mecanismos de reparo, crescimento e diferenciação e coordenação de contração de miofibras observados pelo aumento da expressão de *Six1* (p 0.0011), *Pax7* (p 0.0001), *Myf5* (p 0.0096), *Creb* (p < 0.0001), *bDNF* (p 0.0187), *GDF8* (p 0.0009), *TGFβ* (p 0.0153), *ActRIIB* (p < 0.00001), *ACTN3* (p 0.0179), *NFATc1* (p 0.0104). Os resultados deste trabalho nos permitem concluir que à ingestão regular de EM pode melhorar a qualidade de vida no processo de envelhecimento estimulando a biogênese mitocondrial e mecanismos de reparo que contribui para melhora no tecido muscular.

**Palavras-chave:** Envelhecimento. Massa muscular. Sarcopenia. Polifenóis. Erva mate.

## ABSTRACT

Rapid advances in modern medicine have contributed significantly to a steady increase in life expectancy. Evidence points to the existence of molecular events that are affected with advancing age and are directly associated with characteristic phenotypes of cellular aging. Among them, sarcopenia stands out as an important functional alteration, being one of the main problems related to the aging process, caused by the gradual loss of skeletal muscle mass, muscle strength and functionality. Evidences indicate that natural compounds are able to increase life expectancy and delay the occurrence of age-related diseases. Among the natural compounds used to counterbalance the dysfunctions associated with aging, yerba mate (EM), *Ilex paraguariensis*, stands out, whose antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory, anti-cancer and anti-adipogenic activities have already been reported by our research group. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effects of supplementation with EM on the process of sarcopenia related to aging in mice. Male C57Bl6 mice, 4 weeks old, from CEMIB-Unicamp, were divided into 2 groups (n=5) according to the diet offered, in which one of them was fed with standard AIN-93m (CT) chow and the other with the same diet but with the addition of lyophilized yerba mate extract (1.2 g/Kg of diet) (CT-MT), for a period of 20 months, the evolution of body weight, food intake, strength tests were performed and energy expenditure, after euthanasia, biological samples were collected for analysis. Additionally, another group of the same age, undergoing the same tests, was considered a young control (CTJ) (n=5) was fed only AIN-93, underwent the same tests, euthanasia was performed after 8 weeks. For the analyses, the evaluation of the evolution of the corporal composition, analysis of the genic expression through the PCR in real time, being evaluated the content of mitochondrial DNA and genes involved in the process of mitochondrial biogenesis and sarcopenia. ME consumption was efficient for maintaining body weight, as well as promoting improvements in body composition by reducing visceral fat weight and maintaining muscle mass. Promoted an increase in the number of copies of mitochondrial DNA (p 0.0003), as well as gene expression of *Nrf1* (p 0.0002), *Nrf2* (p < 0.00001), *mtTFA* (p < 0.00001), *Pgc1a* (p < 0.00001), *Sirt1* (p < 0.00001), *Ampka2* (p < 0.00001), and *UCP3* (p < 0.00001), indicating stimulation of mitochondrial biogenesis in the CT+MT group in relation to the other groups, thus favoring the improvement of muscle quality through the mechanisms of repair, growth and differentiation and coordination of myofiber contraction observed by increased expression of *Six1* (p 0.0011), *Pax7* (p 0.0001), *Myf5* (p 0.0096), *Creb* (p < 0.0001), *bDNF* (p 0.0187), *GDF8* (p 0.0009) , *TGFβ* (p 0.0153), *ActRIIB* (p < 0.00001), *ACTN3* (p 0.0179), *NFATc1* (p 0.0104). The results of this work allow us to conclude that the regular intake of EM can improve the quality of life in the aging process by stimulating mitochondrial biogenesis and repair mechanisms that contribute to improvement in muscle tissue.

**Keywords:** Aging. Muscle mass. Sarcopenia. Polyphenols. Yerba mate.

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

**ACE:** *Enzima conversora de angiotensina*

**ACTN:** *Alfa actina*

**ACTN3:** *Alfa actina 3*

**AcTR:** *Receptor de activina*

**AcTRIIB:** *Receptor de activina do tipo IIB*

**ADP:** *Adenina difosfato*

**ALK:** *Aurora como proteína quinase*

**ALK4:** *Aurora como proteína quinase 4*

**AMP:** *Monofosfato de adenina*

**AKT:** *Proína cinase específica de serina/treonina*

**Ampka:** *Proteína quinase AMP ativada subunidade catalítica alfa 2*

**ATP:** *Adenina trifosfato*

**BCL2:** *Família de genes dos mamíferos e às proteínas a que dão origem*

**bDNF:** *Fator neurotrófico derivado do cérebro*

**C2C12:** *Linhagem celular de mioblastos C2*

**CI:** *Solução a base de Clorofórmio e Àlcool isomílico*

**CCL4:** *Tetracloroeto de carbono*

**Creb:** *Regulador transcricional de ligação de DNA*

**CT:** *Grupo controle*

**CTJ:** *Grupo controle jovem*

**CT+EM:** *Grupo tratado com Erva Mate*

**CONCEA:** *Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal*

**COX:** *Cicloxygenase 1*

**DA:** *Doença de Alzheimer*

**DNA:** *Ácido desoxirribonucleico*

**DNAm:** *Ácido desoxirribonucleico mitocondrial*

**DP:** *Doença de Parkinson*

**DTT:** *Ditiotreitól*

**EDTA:** *Ácido Etileno Diamina Tetra Acético*

**EC:** Epicatequina

**EGC:** Epigallocatequina

**EM:** Erva mate

**EROS:** Espécies reativas de oxigênio

**ERRs:** Receptores relacionados ao estrógeno

**EWGSOP:** Grupo de Trabalho Europeu sobre Sarcopenia em Idosos

**FA:** Ácido ferúlico

**FOXO:** Fator de transcrição forkhead box

**GA:** Ácido gálico

**GBD:** Global Burden of Disease

**GDF:** Fatores de crescimento e diferenciação

**GDF8:** Fatores de crescimento e diferenciação 8

**IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**IGF1:** Fator de crescimento -1

**IGF $\beta$ :** Fator de transformador de crescimento

**IL6:** Interleucina 6

**Mef2C:** Fator melhorador de miócito 2C

**MRF:** Fator regulador miogênico

**MHC:** Maior complexo de histocompatibilidade

**mtTFA:** Fator de transcrição mitocondrial

**mTOR:** Alvo mecanicista da quinase da rapamicina

**Myf5:** Fator miogênico 5

**MyoD:** Fatores determinantes de mioblastos

**MyoG:** Miogenina

**ncRNA:** Ácido ribonucleico não codificante

**NAD:** Dinucleotídeo de nicotimida e adenina

**NAD<sup>+</sup>:** Dinucleotídeo de nicotimida e adenina oxidado

**NADH:** Dinucleotídeo de nicotimida e adenina reduzido

**NFAT:** Fator nuclear das células T ativadas

**NFATc1:** Fator nuclear das células T ativadas 1

**NF- $\kappa\beta$ :** Fator nuclear

**Nrf1:** Fator respiratório nuclear 1  
**Nrf2:** Fator respiratório nuclear 2  
**OA:** Osteoartrite  
**OMS:** Organização Mundial da Saúde  
**OXPHOS:** Fosforilação oxidativa  
**PAX7:** Proteína de caixa emparelhada-7  
**Pgc1 $\alpha$ :** Coativador PPARG 1 alfa  
**PCR:** Reação da polimerase em cadeia  
**PCI:** Solução a base de Fenol, Clorofórmio e Álcool isoamílico  
**PMSF:** Flúor de fenilmetilasulfonil  
**POLG:** DNA polimerase subunidade gamma  
**p53:** Gene supressor tumoral  
**p38MAPK:** Proteínas quinase ativadas por mitógenos p38  
**RNA:** Ácido ribonucleico  
**RPC:** Coativador relacionado ao PGC1  
**RE:** Retículo endoplasmático  
**SASP:** Fenótipo secreto associado a senescência  
**Sirt1:** Sirtuína 1  
**Six1:** Sine oculis homeobox homólogo 1  
**Smad:** Família de proteína estruturalmente semelhante  
**TERT:** Transcriptase reversa da telomerase  
**TERC:** Componente de RNA da telomerase  
**TGF $\beta$ :** Fator transformador de crescimento  
**TNF $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral alfa  
**TPs:** Polifenóis do chá  
**TRF2:** Fator de repartição telomérica  
**UCP:** Proteína de desacoplamento mitocondrial  
**UCP3:** Proteína de desacoplamento mitocondrial 3  
**UPS:** Sistema ubiquitina-proteassomal  
**WNT:** Via de sinalização  
**18s:** 18s ribossômico DNA

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Pirâmide etária de distribuição populacional.....	17
<b>Figura 2:</b> Representação dos grupos etários residentes no Brasil.....	18
<b>Figura 3:</b> Marcas do Envelhecimento.....	20
<b>Figura 4:</b> Abertura do poro de transição mitocondrial.....	33
<b>Figura 5:</b> Composição Muscular.....	35
<b>Figura 6:</b> Regeneração do músculo esquelético.....	38
<b>Figura 7:</b> Desenho experimental.....	46
<b>Figura 8:</b> <i>Rope Grip Test</i> .....	48
<b>Figura 9:</b> Dados da avaliação da evolução corporal e avaliação de força.....	52
<b>Figura 10:</b> <i>Rope Grip Test</i> (resultado).....	53
<b>Figura 11:</b> Dados da análise de gasto energético.....	54
<b>Figura 12:</b> Dados da avaliação do conteúdo mitocondrial e expressão gênica.....	55
<b>Figura 13:</b> Dados de expressão gênica (sarcopenia).....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Composição das dietas.....	45
<b>TABELA 2:</b> Concentração dos principais fitoquímicos da EM.....	45
<b>TABELA 3:</b> Sequências dos <i>primers</i> no estudo do conteúdo de DNAm.....	49
<b>TABELA 4:</b> Sequência dos <i>primers</i> no estudo de biogênese mitocondrial e sarcopenia..	50
<b>TABELA 5:</b> Dados da avaliação da expressão gênica do conteúdo de DNAm.....	55
<b>TABELA 6:</b> Dados de expressão gênica da avaliação da Biogênese Mitocondrial.....	56
<b>TABELA 7:</b> Dados de expressão gênica da avaliação da Sarcopenia.....	57

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1. <i>Envelhecimento e dados epidemiológicos</i> .....	16
1.2. <i>Pilares do envelhecimento</i> .....	19
1.3. <i>Doenças associadas ao envelhecimento</i> .....	28
1.4. <i>Sarcopenia</i> .....	31
1.5. <i>Alterações no músculo esquelético</i> .....	34
1.6. <i>Alterações moleculares do músculo esquelético relacionado a idade</i> .....	37
1.7. <i>Compostos naturais</i> .....	40
1.8. <i>Erva mate (Ilex paraguariensis)</i> .....	41
2. OBJETIVOS .....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	44
3.1. <i>Animais e desenho experimental</i> .....	44
3.2. <i>Rope Grip Test</i> .....	46
3.3. <i>Análise do gasto energético por calorimetria indireta</i> .....	47
3.4. <i>Eutanásia e avaliação da composição corporal</i> .....	47
3.5. <i>Análise do conteúdo de DNA mitocondrial</i> .....	48
3.6. <i>Extração de RNA e qPCR por tempo real</i> .....	49
3.7. <i>Formas de análise dos resultados – Análises estatísticas</i> .....	51
4. RESULTADOS .....	52
4.1. <i>Avaliação da composição corporal</i> .....	52
4.2. <i>Rope Grip Test e avaliação da composição corporal</i> .....	53
4.3. <i>Análise do gasto energético por calorimetria indireta</i> .....	53
4.4 <i>Avaliação do conteúdo de DNAm e expressão gênica</i> .....	54
5. DISCUSSÃO .....	58
6. CONCLUSÃO .....	70
REFERÊNCIAS .....	71
ANEXO .....	91

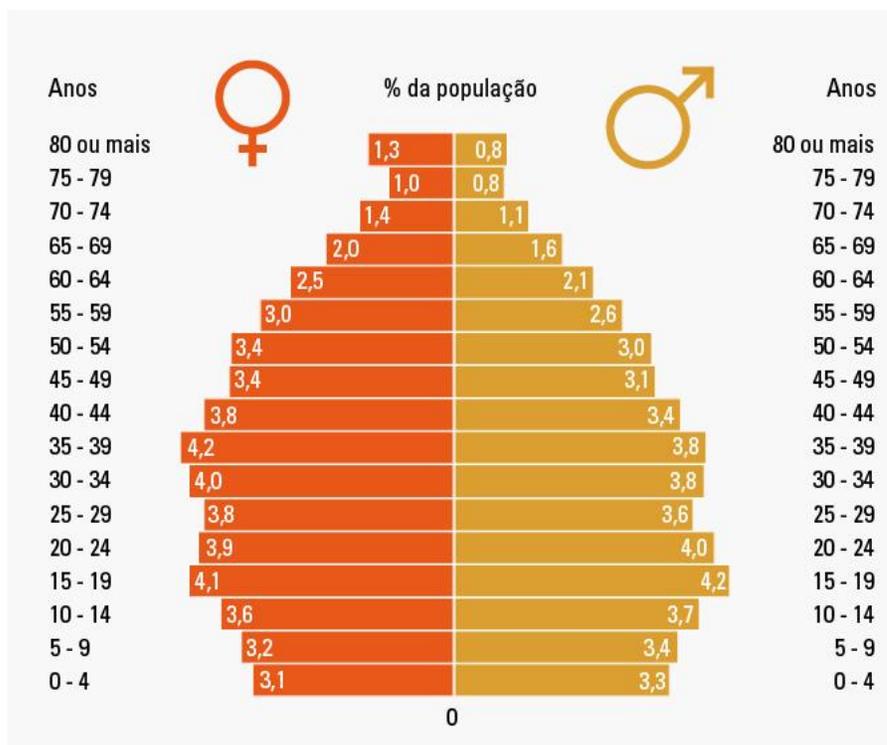
## 1. Introdução

### 1.1. Envelhecimento e dados epidemiológicos

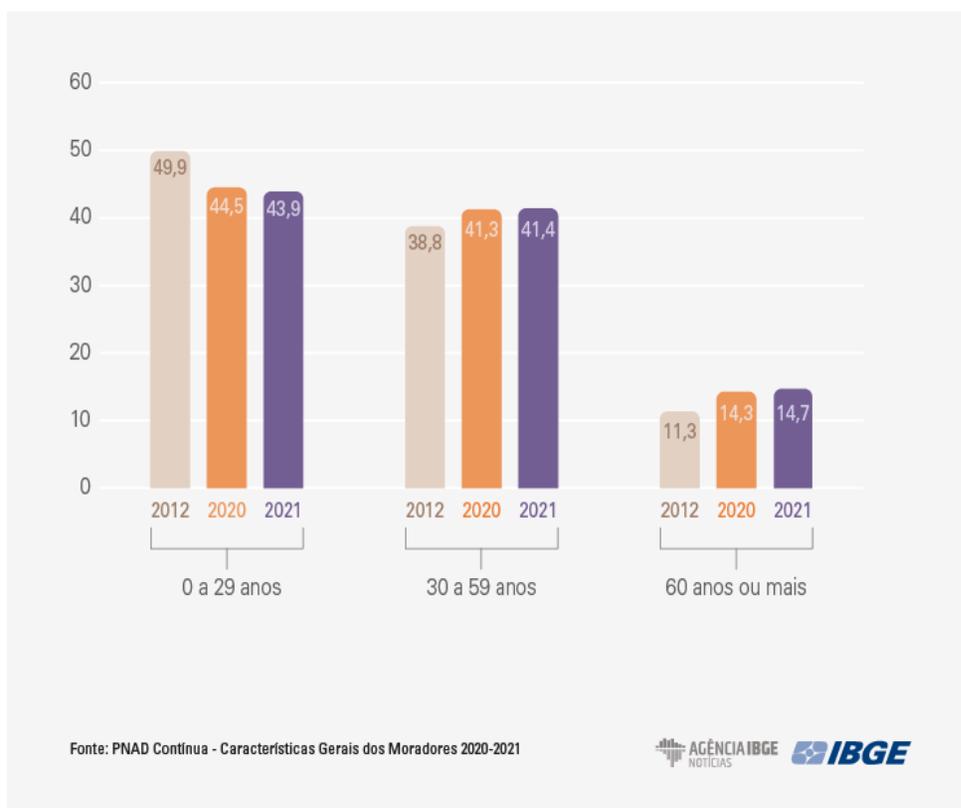
O envelhecimento é um processo progressivo que ocorre ao longo da vida afetando todos os organismos, promovendo alterações nos aspectos fisiológicos padrão de um indivíduo e possui relação direta com os fatores sociais, culturais, biológicos e psicológicos. O estado global da população idosa é determinado pelas condições de saúde, que não se determina apenas pela ausência de doenças, mas leva em consideração o índice satisfatório de independência funcionalidade (DE MENDONÇA et al., 2021). A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que em relação a população mundial dos grupos etários com 60 anos ou mais haverá um aumento, de 12% para 22%, entre 2015 e 2050 (LINHARES et al., 2019). O aumento da longevidade populacional tem sido cada vez mais evidente, desse modo compreende-se que o envelhecimento é uma realidade. O aumento da expectativa de vida tem sido um fato devido a redução das taxas de mortalidade, das doenças infecciosas, além do avanço e tecnologia na assistência à saúde; no entanto quanto maior o número da população idosa, mais a chance do crescimento das condições de dependência. Embora o envelhecimento populacional seja considerado um triunfo, ao mesmo tempo torna-se um desafio para os serviços de saúde bem como para a sociedade como um todo, mas ao mesmo tempo favorece a oportunidade da convivência e da troca de experiências com pessoas idosas (CARRETTA et al., 2013).

Em uma análise percentual publicada pela Agência de Notícias do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2017, apresentou uma crescente de 18% da população idosa em 5 anos, ultrapassando os 30 milhões, demonstrando que esse crescimento no Brasil tem sido cada vez mais representativo (**Figura 1**) (IBGE, 2018). Tais dados foram confirmados por uma análise recente onde foi demonstrado que a população está cada vez mais velha, uma observação feita entre 2012 e 2021, apontou que o número de pessoas com menos de 30 anos caiu 5,4% no país, em contrapartida houve um aumento em todos os grupos com idade superior em todas as faixas etárias no mesmo período. Desse modo, as pessoas com 30 anos ou mais passaram a representar em 2021 o equivalente a 56,1% do total da população, enquanto em 2012 essa representação era de 50,1%. De 2012 a 2021 houve um aumento de 7,6% na população total do país, que foi estimado em 212,7 milhões de pessoas, indicando que a parcela de pessoas com mais de 60 anos de idade saltou de 11,3% para 14,7% do total da população (**Figura 2**). Em

números absolutos, esse grupo passou de 22,3 milhões para 31,2, representando um crescimento em 39,8% nesse período. O estudo aponta que a queda do grupo etário com menos de 30 anos é um reflexo na diminuição da fecundidade que vem ocorrendo nas últimas décadas no país e já foi apontado em outras pesquisas realizadas pelo IBGE (IBGE, 2022).



**FIGURA 1:** Pirâmide etária de distribuição populacional por sexo e grupo de idade. Gráfico demonstra crescimento de 18% da população com 60 anos ou mais nos últimos 5 anos, apontando para um crescimento cada vez mais representativo da população idosa no Brasil, onde ultrapassa os 30 milhões de idosos. Fonte: IBGE, 2018.



**FIGURA 2:** Grupos etários residentes no Brasil, população residente (%). Entre 2012 e 2021 pode se observar um aumento de 3,4% da população residente no Brasil com 60 anos de idade ou mais, enquanto registra uma queda de cerca de 6% da população com menos de 30 anos de idade no mesmo período como reflexo da diminuição da taxa de fecundidade. Fonte: IBGE, 2022.

Segundo a OMS o ritmo de envelhecimento populacional é muito rápido, e aponta que entre 2015 e 2050 o percentual mundial da população com mais de 60 anos quase dobrará de 12% para 22% (OMS, 2021). De acordo com a última estimativa de envelhecimento populacional, publicada pela *Global Burden of Disease* (GBD) em 2017, acredita-se que esta medição reflete tanto a longevidade quanto o estado de saúde (CHANG et al., 2019).

O envelhecimento é um processo biológico complexo modulado por aspectos genéticos e ambientais. Tais eventos à longo prazo pode resultar em declínio funcional das células, tecidos e órgãos, contribuindo com a perda da integridade fisiológica e podendo consequentemente contribuir para o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de diversas patologias, elevando, dessa forma o risco de mortalidade (GLADYSHEV&GLADYSHEV, 2016a; SORIA-VALLES& LÓPEZ-OTÍN, 2016; LARSSON et al., 2019a). Tem sido verificado que o processo de envelhecimento é acompanhado de um declínio funcional de tecidos e órgãos, tais como,

aumento de deposição de gordura corporal, declínio de funções cognitivas, bem como sarcopenia (GLADYSHEV&GLADYSHEV, 2016b; PARTRIDGE et al., 2018).

## **1.2. Pilares do Envelhecimento**

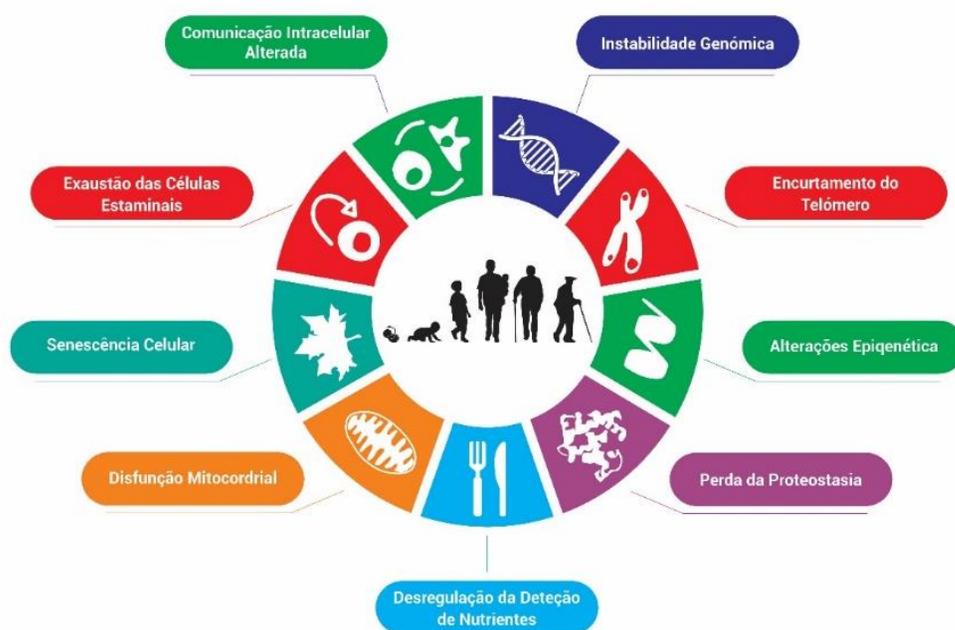
Um corpo de evidências aponta para a existência de eventos moleculares que se desregulam com o avanço da idade, e estão diretamente associados à fenótipos característicos do envelhecimento celular. Também conhecido como senescência, o envelhecimento celular é composto por um conjunto de fatores descritos como marcas do envelhecimento, as quais podem ser agrupadas em três categorias, tais como, aquelas associadas a danos em funções celulares, respostas antagônicas aos danos, bem como marcas integrativas, as quais contribuem para os aspectos clínicos verificados no processo de envelhecimento (GRAMMATIKAKIS et al., 2014; AUNAN et al., 2016; BOTTAZZI et al., 2018).

O envelhecimento é uma característica natural de todos os seres vivos, considerado um processo biológico complexo é resultante de fatores genéticos, e em maior parte aos fatores ambientais e ao tempo e ocorre de maneiras distintas em múltiplas células e nos tecidos. Sabe-se que a taxa de envelhecimento não acontece de forma igual em todos os seres humanos, dessa forma a idade biológica não necessita estar de acordo com a idade cronológica. Com o avanço da idade é observado a ocorrência de diversas mudanças e marcas evidentes no corpo humano, quando associada à idade avançada, essas mudanças são divididas em categorias: envelhecimento normal, doenças somáticas, diversas condições crônicas, alterações psicológicas, cognitivas e sociais (JAUL; BARRON, 2017). O processo que envolve o envelhecimento normal causa mudanças sensoriais podendo implicar em perda auditiva, acuidade visual, tontura; nesse processo também é observado o enfraquecimento dos músculos que resulta na redução da capacidade de mobilidade, e mudanças de gordura. Essas mudanças podem favorecer o surgimento de algumas doenças, que inclui a hipertensão, diabetes, doenças cardiovasculares, osteoartrite, osteoporose, câncer e vários distúrbios neurológicos. A pessoa idosa é propensa há várias alterações funcionais do sistema respiratório, como a capacidade vital reduzida, o volume residual aumentado, difusão pulmonar reduzida, gradiente de oxigênio arterial-alveolar aumentado, hipóxia, hipercapnia, percentual de neutrófilos aumentados, proporção de células CD4/CD8 aumentadas no fluido de lavagem bronco alveolar e nível de compostos antioxidantes

diminuídos (superóxido dismutase, glutatona, catalase, proteínas de ligação metálica, vitaminas C e E) (SHARMA; GOODWIN, 2006; PIZENT et al., 2010).

São nove os "pilares" ou "marcas" do envelhecimento que foram descritos e estes incluem senescência celular, disfunção mitocondrial, instabilidade genômica, atrito de telômeros, alterações epigenéticas, perda de proteostase, desregulação do sensor de nutrientes, exaustão celular e comunicação intercelular alterada (**Figura 3**) (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013; KENNEDY et al., 2014).

O processo de envelhecimento, é considerado um estado degenerativo progressivo podendo ser oriundo de um esgotamento de células-tronco teciduais, bem como inflamação tecidual, alterações na matriz celular, senescência celular e disfunção metabólica. Essas alterações celulares e teciduais configuram em desordens moleculares subjacentes em mitocôndrias, proteostase, comunicação intercelular, sensoramento de nutrientes, epigenética e reparação de DNA (ácido desoxiribonucleico) levando a instabilidade genômica e a danos, incluindo disfunção do telômero. Com o conhecimento cada vez mais expandido dos diversos mecanismos moleculares associados ao envelhecimento, o telômero é apontado como um estimulador ou amplificador dos eventos moleculares que acompanham o processo de envelhecimento e suas doenças associadas (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013).



**FIGURA 3:** O esquema demonstra as nove marcas do envelhecimento: instabilidade genômica, encurtamento de telômeros, alterações epigenéticas, perda de proteostase, desregulação de detecção de nutrientes, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão de células-tronco e comunicação intercelular alterada (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013).

#### **a) Instabilidade genômica**

Um DNA íntegro e estável, é continuamente desafiado por condições adversas como os agentes físicos, químicos e biológicos exógenos, e até mesmo por ameaças endógenas, que inclui os erros de replicação de DNA, reações hidrolíticas espontâneas e espécies reativas de oxigênio (EROS). Nesse sentido podem ocorrer as chamadas lesões genéticas que são decorrentes dos danos extrínsecos ou intrínsecos que são diversas e estas incluem mutações pontuais, translocações, ganhos e perdas cromossômicas, encurtamento de telômeros. Há uma rede complexa de mecanismos de reparo de DNA, capazes de lidar com os possíveis danos ocorridos para minimizar essas lesões. A manutenção da estabilidade genômica também depende de mecanismos específicos como a funcionalidade adequada dos telômeros, e isso inclui o seu comprimento e desse modo garante a integridade do DNA mitocondrial (DNAm). Sabe-se que os danos genéticos é um denominador comum relacionado ao processo de envelhecimento, o acúmulo de danos no DNA favorece o desenvolvimento de diversas doenças relacionadas a idade (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013). A instabilidade genômica, uma marca característica do envelhecimento, pode promover o aumento da inflamação através da exaustão das células-tronco. Essa instabilidade pode ser alimentada pela disfunção do telômero que favorece a instabilidade cromossômica, que pode ser evidenciado pela análise citogenética das células e tecidos de última geração; essas análises permitem avaliar as ampliações, supressões, translocações e formação de pontes de anáfase em tumores incluindo cânceres colorretais (BLASCO et al., 1997; ARTANDL et al., 2000; MACIEJOWSKI; DE LANGE, 2017).

#### **b) Encurtamento de telômeros**

A fim de manter a integridade dos cromossomos, os telômeros formam uma “estrutura de tampa”, que são compostos por sequências repetitivas de nucleotídeos, está localizado nas extremidades distais dos cromossomos. Durante a divisão celular se criticamente os telômeros atingirem um comprimento curto, que é conhecido como o limite *hayflick*, como consequência ele desencadeia danos de DNA e senescência celular (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961;

HERRMANN et al., 2018). Observa-se que o encurtamento do telômero também ocorre durante o envelhecimento natural tanto em humanos como em camundongos (ZHU et al., 2018). Diversos estudos epidemiológicos apontam que o esgotamento do telômero é correlacionado de forma significativa ao envelhecimento, morbidade biológica e mortalidade (MENSÀ et al., 2019). As falhas genéticas que são associadas à manutenção do telômero humano estão ligadas a doenças degenerativas germinativas e somáticas, como a fibrose pulmonar idiopática, a colite ulcerativa entre outras. O telômero e telomerase são importantes por conferirem proteção ao genoma contra ameaças que podem surgir de uma deficiência ligada à replicação assimétrica do DNA. Por sua vez, a ausência de telômeros pode ocasionar na perda do material genético toda vez que houver divisão celular. O início da replicação do DNA depende da DNA polimerase associada a um primer de RNA (ácido ribonucleico) e um grupo de doadores de hidroxílico de 3'. À medida que a polimerase se move ao longo da cadeia, o primer se dissocia, deixando uma lacuna nas extremidades dos cromossomos. Desse modo a fita de DNA que foi recentemente sintetizada torna-se mais curta do que a fita original. O complexo de telômeros e telomerase ao fornecerem uma sequência repetitiva promovem a reparação enzimática das extremidades dos cromossomos, amenizando este problema evitando assim que ocorram perdas de informações geneticamente codificadas durante a mitose (CALADO; YOUNG, 2009). A disfunção do telômero, uma das nove marcas descritas como marcadores celulares do envelhecimento, pode ocorrer pela limitação das reservas de telômeros. Estas servem como uma barreira à imortalização celular, porém a perda de função do telômero pode estar relacionada tanto com o declínio relacionado ao envelhecimento quanto com a instabilidade do genômica, sabidamente um evento indutor de diversos tipos de câncer. No envelhecimento a disfunção do telômero também está associada a outras marcas do envelhecimento (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013). A diminuição da eficiência do processo replicativo dos telômeros com o passar dos anos, resulta em encurtamento considerável dessa região a cada geração da célula, até atingirem um comprimento crítico (HORNSBY, 2007). No âmbito do envelhecimento celular, fatores como níveis de estresse oxidativo, antioxidantes, alteração mitocondrial, inflamação, encurtamento de telômeros e mutações genéticas têm um papel determinante. Tem sido proposto que o estresse oxidativo bem como os radicais livres formados nessa reação desempenham um papel crucial no encurtamento dos telômeros, através da inibição da atividade de telomerase e dos níveis de expressão do fator de ligação à repetição telomérica 2 (TRF-2). O encurtamento do comprimento

dos telômeros leva à instabilidade genômica e consequente comprometimento da função do ciclo celular, senescência e apoptose das células, resultando em prejuízos à saúde (SHAY; WRIGHT, 2007; MALEKI et al., 2020).

### **c) Alterações epigenéticas**

Um dos mecanismos cruciais relacionados às funções celulares danificadas durante o processo de envelhecimento e nos desarranjos relacionados a idade, são conhecidas como alterações epigenéticas (PAL; TYLER, 2016). As alterações epigenéticas compreendem uma das marcas do envelhecimento, sendo um importante mecanismo envolvido no processo de deterioração das funções celulares observadas durante o envelhecimento (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013). A descoberta dos mecanismos epigenéticos, possibilitou esclarecer fatos complexos, tais como, a diferença de padrões de envelhecimento existentes entre gêmeos idênticos, por exemplo (FRAGA et al., 2005). As informações codificadas pelo epigenoma incluem metilação do DNA, remodelamento da cromatina, modificações pós-traducionais das proteínas histonas, variações estruturais e funcionais das histonas e transcrição de RNAs não codificantes (ncRNAs). A combinação desses diferentes tipos de informações epigenéticas determinam a função e o destino de todas as células e tecidos (GUILLAUMET-ADKINS et al., 2017). As alterações epigenéticas desempenham um papel vital no desenvolvimento saudável de um organismo, pois são cruciais para vários processos biológicos, tais como transcrição, divisão celular, replicação de DNA e muitos outros. Portanto, a estabilidade geral dos mecanismos epigenéticos é determinante para a manutenção da atividade molecular adequada, o que reduz a possibilidade de várias doenças e ainda contribui para retardar o processo de envelhecimento (PAL; TYLER, 2016).

### **d) Perda de proteostase**

A rede de proteostase abrange um conjunto de sistemas de controle de qualidade, que envolve mecanismos de depuração de proteínas os quais permitem conter o acúmulo de proteínas danificadas e a toxicidade resultante dessa circunstância. Assegurar a manutenção da proteostase celular demanda uma rigorosa regulação da síntese proteica, dobramento, manutenção conformacional e degradação. Para tanto, dos principais mecanismo de controle da proteostase, as chaperonas moleculares de diversas classes e seus reguladores exercem papel fundamental,

coordenando uma série de eventos complexos e adaptativos. Quanto aos sistemas de remoção de proteínas danificadas o “sistema ubiquitina-proteassomal” (UPS), figura como a maquinaria proteolítica central das células de mamíferos, principal responsável pela proteostase, bem como o sistema autofagia-lisossomal, que medeia a renovação das organelas celulares e grandes agregados. Muitas patologias relacionadas com a idade e o próprio processo de envelhecimento são acompanhados por uma desregulação da UPS, autofagia e *crossstalk* entre ambos os sistemas (KOROVILA et al., 2017; KLAIPS; JAYARAJ; HARTL, 2018a). Falhas no sistema de proteostase que impeçam a degradação de proteínas desdobradas resultam em acúmulo e agregação dessas proteínas, induzindo o envelhecimento (DIKIC, 2017; HIPPI; KASTURI; HARTL, 2019). Embora as redes de controle de qualidade de proteínas garantam a proteostase sob condições basais, condições adversas tais como estresse oxidativo ou aumentos de temperatura, resultam em estresse conformacional, fazendo com que muitas proteínas adicionais se tornem propensas ao dobramento incorreto, acometendo particularmente subtipos de proteínas mais vulneráveis à instabilidade (AGUILANIU et al., 2003; KLAIPS; JAYARAJ; HARTL, 2018b). O processo de envelhecimento e a maior parte das doenças relacionadas a idade estão relacionadas as falhas da homeostase proteica (BASISTY; MEYER; SCHILLING, 2018).

#### **e) Desregulação da detecção de nutrientes**

Estudos apontam que a regulação de nutrientes é atribuída ao aumento da atividade de *Sirt-1*. A *Sirt-1* faz parte da família das sirtuínas, uma classe de reguladores de informações epigenéticas sensíveis a nutrientes, capaz de modular a senescência e a expectativa de vida útil das células, estando, portanto, associada à longevidade. *Sirt1* é uma desacetilase dependente de  $\text{NAD}^+$  e tem como alvo diversos fatores de transcrição, envolvidos em respostas adaptativas ao estresse celular, tais como fator nuclear NF- $\kappa$ B, fator de transcrição forkhead box (*FOXO*) 1, 3 e 4, receptor ativado por proliferador de peroxissoma gamma co-ativador 1 (*PGC-1*) e *p53*. Por exemplo, *Sirt1* pode inibir a transcrição de *p53*, por meio de mecanismos de desacetilação desse alvo molecular, resultando na modulação de vias envolvidas no controle do envelhecimento celular (ONG; RAMASAMY, 2018). No processo de envelhecimento é observado uma rede altamente conservada, compostas por vias de sinalização como o fator de crescimento (*IGF-1*) e regulação da proliferação e crescimento *mTOR-S6* e por membros da família de proteínas *FOXO* e *AMPK*, acarretando conseqüentemente na desregulação da detecção de nutrientes. De modo a

manter a homeostase metabólica essas vias se regulam entre si. A família *AMPK* é um sensor central de nutrientes que modula a sinalização *mTOR* e ativa transcrição fatores de transcrição *FOXO* e *SIRT1* (SAXTON; SABATINI, 2017). Já o *SIRT1* pode, por sua vez realizar a ativação do *FOXO* e *PGC1 $\alpha$* , que são fundamentais para a biogênese mitocondrial (BRUNET et al., 2004; RODGERS et al., 2005). Desse modo, a ativação do *p53* e a repressão de *PGC1 $\alpha$*  e *SIRT1*, pode impactar no metabolismo decorrente da capacidade de disfunção do telômero (SAHIN et al., 2011a). A disfunção de telômero induz o comprometimento mitocondrial o que aumenta a dependência dos tecidos no metabolismo da glicose (MISSIOS et al., 2014). Nesse sentido, há um aumento da glicólise versus metabolismo oxidativo mitocondrial, que leva a alterações nas vias NAD/NADH, de modo a prejudicar de modo acentuado a atividade da sirtuina (BAI et al., 2011).

#### **f) Disfunção mitocondrial**

O consumo de adenina trifostado (ATP) é envolvido por reações anabólicas do metabolismo energético, e é necessário para a formação de moléculas catabólicas e mais complexas, em que a produção de ATP é necessária para a degradação de macromoléculas. A produção de ATP, uma molécula de alta energia, é gerada a partir da energia gerada através do catabolismo, e é necessária para desempenhar diversas funções celulares, como os processos de secreção de hormônios e citocinas, e a contração muscular entre outros. Os ácidos graxos, glicose e aminoácidos, são os principais substratos energéticos utilizados para a síntese de ATP, e eles são fornecidos através da dieta e são disponibilizados para a síntese de energia a partir de processos de glicogenólise, proteólise e lipólise (KLINGENBERG, 1975; MAZAT et al., 2013). A função mitocondrial é diminuída durante o envelhecimento, o que causa uma inibição na síntese de energia em forma de ATP, assim como favorece o aumento na produção de EROS, visto que a atividade dos telômeros e das mitocôndrias estão intimamente relacionadas. A redução da síntese de energia causa vulnerabilidade de modo geral, enquanto o aumento de EROS causa danos celulares (TRIFUNOVIC et al., 2004; SAHIN et al., 2011b). Diversos estudos têm demonstrado que o aumento da produção de EROS mitocondrial e danos oxidativos não reduzem a vida útil do organismo, pois somente quando for excedido o limiar do nível de EROS, se agravam os danos relacionados à idade. O desequilíbrio da função e da rede mitocondrial podem levar a um desequilíbrio no estado metabólico do músculo esquelético

culminando na redução de massa muscular (HEKIMI; LAPOINTE; WEN, 2011; KAUPPILA et al., 2018; HOOD et al., 2019). Estudos realizados em camundongos que possuem mutações no DNA polimerase subunidade gamma (*POLG*) de polimerase mitocondrial, evidenciam uma ligação direta para o declínio mitocondrial em condições de envelhecimento, pois esses camundongos mutantes apresentam redução do número de mitocôndrias, anormalidades na morfologia mitocondrial como por exemplo a crista mitocondrial fragmentada, e apresentam características precoces de envelhecimento como: alopecia, redução de peso corporal, redução de tecido adiposo subcutâneo, anemia, cardiomiopatia e densidade óssea reduzida; características fenotípicas de envelhecimento notavelmente relacionadas a disfunção mitocondrial refletem os de camundongos deficientes em telomerase, camundongos *p53* hiperativados e camundongos *PGC1 $\alpha$ / $\beta$*  nulos (TYNER et al., 2002; LAI et al., 2008).

#### **g) Senescência celular**

A senescência celular ou envelhecimento celular, causada pelo dano excessivo ou estresse celular, é um mecanismo supressivo de tumor que interrompe o ciclo celular inativando o risco de transformação maligna. Diversas evidências apontam que as células senescentes podem ter efeitos deletérios no microambiente tecidual, entre esses efeitos o mais significativo é o ganho de um fenótipo secreto associado à senescência (SASP) que tem como função transformar os fibroblastos senescentes em células pró-inflamatórias com capacidade de promover a progressão do tumor (COPPÉ et al., 2010a). O acúmulo de estresses pode ser um dos fatores que provocam senescência celular, esse estresse pode estar relacionado com a disfunção telomérica resultado de divisão celular repetida, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, dano de DNA grave ou irreparável, ruptura da cromatina, e a expressão de certos oncogenes (BEN-PORATH; WEINBERG, 2004, 2005). O acúmulo de células senescentes nos tecidos envelhecidos contribui para o envelhecimento e para o desenvolvimento de doenças relacionadas a idade por vários mecanismos. Os dois mecanismos mais estudados são: impedimento do potencial replicativo das células tronco teciduais e a interrupção de funções do órgão pela liberação de fatores pró-inflamatórios, que inclui, mas não se limita à interleucina 6 (*IL-6*), e o fator de necrose tumoral alfa (*TNF $\alpha$* ) por células (COPPÉ et al., 2010).

#### **h) Exaustão de células-tronco**

As células-tronco estão presentes nos estágios embrionários, fetal e adultos, são células indiferenciadas que dão origem a células diferenciadas que estão presentes na formação de tecidos e órgãos. Tanto na fase pós-natal como na fase adulta da vida, as células-tronco específicas do tecido são presentes em órgãos diferenciados e elas são fundamentais no reparo após algum estímulo de lesão no órgão. Suas principais características das células-tronco são: a capacidade de proliferar extensivamente (auto-renovação, clonalidade (geralmente decorrente de uma única célula) e a capacidade de diferenciar-se em diferentes tipos de células (potência) (KOLIOS; MOODLEY, 2013). A exaustão das células-tronco teciduais, que causam a perda da capacidade de regeneração em tecidos e órgãos, é uma outra característica do envelhecimento. Com o avanço da idade, a atividade das células-tronco hematopoiéticas diminui, e isso pode levar a diversas manifestações patológicas, como por exemplo a resposta imune adaptativa reduzida, risco aumentado de anemia e redução de células linfoides (GOODELL; RANDO, 2015). Estudos em camundongos TERT ou TERC-*null* de geração tardia, demonstram que a degradação progressiva do telômero culmina na eliminação apoptótica dependente de p53 de células-tronco teciduais, contribuindo para a atrofia de órgãos, principalmente em tecidos altamente proliferativos com altas taxas de auto-renovação, este inclui a pele, intestino, fígado e sangue (BLASCO et al., 1997; JASKELIOFF et al., 2011; SAHIN et al., 2011b; COLLA et al., 2015). O TERT além da manutenção do telômeros pode impactar na biologia de células-tronco através de suas funções não clássicas e que envolvem a ativação da via WNT, via principal dos reguladores da homeostase das células-tronco (PARK et al., 2009).

#### **i) Comunicação intracelular alterada**

A comunicação celular envolve os processos intracelulares que contribuem para manutenção da homeostase e funções biológicas nos indivíduos, e produzem nos espaços extracelulares sinais químicos que são detectados por células específicas que ativam ou inibem importantes cascatas químicas (SONG et al., 2019). No envelhecimento a comunicação celular desempenha um importante papel, através da regulação de níveis endócrinos, neuronais e neuroendócrinos (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2017). O envelhecimento tende a ser mediado pelas sinalizações neuro-hormonais (como a sinalização de renina-angiotensina, de insulina e adrenérgicos), quando há aumento das reações inflamatórias e alterações que

envolvem imunodeficiências (SALMINEN et al., 2016). O acúmulo de secreção de citocinas pró-inflamatórias em células senescentes podem causar a inflamação, como resposta de alteração de autofagia e aumento de sinalização de *NF-κB* (GREEN; GALLUZZI; KROEMER, 2011; SENOVILLA et al., 2012; SALMINEN; KAUPPINEN; KAARNIRANTA, 2016). Outra alteração implicada no envelhecimento corresponde à presença de um processo inflamatório crônico causado pela produção de citocinas, tais como IL-6, TNF- $\alpha$ , dentre outras. Essa imunossenescência pode agravar o fenótipo de envelhecimento em nível sistêmico, devido à falha do sistema imunológico em eliminar agentes infecciosos, células infectadas e células à beira da transformação maligna. Além disso, uma das funções do sistema imunológico é reconhecer e eliminar células senescentes, por meio da ativação de mecanismos relativos à apoptose e autofagia, induzindo a renovação celular e tecidual, e consequente conservação dessas estruturas (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013). A sinalização inflamatória de células genômica danificadas ou senescentes, estão envolvidos nos processos de envelhecimento. O telômero disfuncional pode dar início e manter a inflamação em vários níveis. Primeiramente a disfunção do telômero causa senescência celular, estimulando a síntese e secreção da *IL-6* e do *TNF $\alpha$* , entre outros fatores inflamatórios (COPPÉ et al., 2010b). Em sequência, a disfunção do telômero favorece a produção de fragmentos extracromossômicos que se precipitados podem levar a morte celular autofágica através da ativação da via cGAS-STING (NASSOUR et al., 2019).

### **1.3. Doenças associadas ao envelhecimento**

O envelhecimento à nível biológico é relacionado à um acúmulo de diversos danos celulares e moleculares, esse acúmulo ao longo do tempo resulta em uma perda gradual de funções fisiológicas, aumentando o risco de desenvolvimento de doenças e comprometimento na capacidade intrínseca do indivíduo (CHAN, 2015). Desse modo o envelhecimento é um fator condutor para o desenvolvimento de doenças relacionadas a idade. O estudo da Carga Global da Doença em 2017, aponta que das 293 doenças apontadas, 92 delas foram determinadas como doenças relacionadas a idade (LUBLÓY, 2020). Entre as doenças mais comuns relacionadas ao envelhecimento estão as doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, doenças metabólicas, doenças relacionadas a desordens musculares, entre outras.

### **a) Doenças neurodegenerativas**

O envelhecimento é um importante fator de risco associado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Desse modo o surgimento da maioria dos distúrbios neurodegenerativos é observado em idosos. Assim, à medida que a população envelhece, se torna mais comum o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas relacionadas à idade, como a Doença de Alzheimer (DA) e a Doença de Parkinson (DP) (JOHNSON, 2015). Foi observado que desenvolvimento da DA tem um aumento significativo com o avanço da idade (ROCCA et al., 2011). E a segunda condição neurodegenerativa mais comum relacionada a idade é o desenvolvimento da DP) (BLIN et al., 2015; DUNCAN et al., 2014). Tanto DA quanto DP apesar de apresentarem diferentes aspectos patológicos, são neurodegenerativas e tipicamente sua caracterização se dá pela perda crônica progressiva de neurônios e conexões sinápticas, resultando em uma perda funcional gradual (NUSSBAUM; ELLIS, 2003). Outro fator de risco relacionado ao avanço da idade são as condições inflamatórias que resultam em desmielinização neuronal, um condutor neurodegenerativo, como um exemplo a esclerose múltipla (TRAPP; NAVE, 2008; SCALFARI et al., 2011).

### **b) Doenças cardiovasculares**

As doenças cardiovasculares são caracterizadas pelas alterações funcionais e estruturais dos vasos, que são cumulativos com o passar da idade, contribuindo para o aumento dos riscos de desenvolvimento de doenças, e apresenta como um fator preocupante tanto para os pacientes, como para o sistema de saúde e seus cuidadores (PANENI et al., 2017). O envelhecimento tem um efeito importante no sistema vascular e um efeito notável no coração, com o passar da idade o peso cardíaco é aumentado, enquanto o número de miócitos cardíacos é reduzido progressivamente. A perda contínua de células cardíacas é relacionada ao declínio de atividades regenerativas correspondente a 1% ano aos 20 anos de idade e a 0,4% aos 75 (HEIDENREICH et al., 2011; PANENI; COSENTINO, 2016). Um dos principais causadores de muitas das doenças cardiovasculares é o estresse oxidativo, e incluem hipertensão, diabetes, isquemia/reperfusão, essas doenças apresentam níveis elevados de fatores endógenos, ou seja, de citocinas que induzem a inflamação, levando ao aumento das vias de sinalização oxidativa, aumento das espécies reativas de oxigênio (EROS), como NADPH-oxidases, resultando em

estresse proteico por proteínas mal dobradas e mitocôndrias comprometidas (PAPACONSTANTINO, 2019).

### c) Doenças metabólicas

A homeostase de energia celular e metabólica, é regulada por um condutor chave o *AMPK* e é considerado como o sensor principal de monofosfato de adenosina (AMP) para adenina trifostato (ATP), e adenina difosfato (ADP) para ATP. O *AMPK* tem um papel central para regular o metabolismo celular e a sua atividade está diretamente ligada a função mitocondrial. Estudos realizados em camundongos apontaram uma relação reduzida entre ATP/AMP no músculo, e a indução das vias *AMPK* e da expressão de *PGC1 $\alpha$*  aumentaram a biogênese mitocondrial (AMORIM et al., 2022). Com o avanço da idade a uma redução gradual da atividade autofágica, sabe-se que a autofagia é essencial para manter a homeostase celular em situação de estresse intracelular, podendo interferir na eficiência do processo autofágico. Nesse sentido os desarranjos metabólicos e o estresse intracelular, resultam em condições como o diabetes mellitus do tipo 2, resistência à insulina e obesidade sarcopênica, que são prevalentes no envelhecimento populacional. A sarcopenia por exemplo é relacionada a perda de massa muscular esquelética, e está envolvida na patogênese da resistência à insulina e do diabetes mellitus do tipo 2, diretamente relacionada ao avanço da idade. A perda da atividade autofágica culmina em um agravamento de distúrbios metabólicos relacionados ao diabetes em tecidos que são alvos de insulina, e inclui o fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, bem como em células  $\beta$  pancreáticas (KITADA; KOYA, 2021).

### d) Desordens musculares

Dados do *Global Burden of Disease* (GBD) 2019, em uma análise recente mostrou que aproximadamente 1,71 bilhão de pessoas em todo mundo vivem com condições relacionadas a desordens musculoesqueléticas, e inclui dor lombar, dor no pescoço, fraturas, outras lesões, osteoartrite, amputação e reumatoide artrite (CIEZA et al., 2020). Com o avanço da idade, a pessoa idosa se torna propensa a lesões e aos distúrbios musculoesqueléticos degenerativos. Entre os distúrbios musculoesquelético mais comuns relacionados ao envelhecimento e com impacto econômico significativo estão a sarcopenia e a osteoartrite (GROTE et al., 2019). Durante o processo de envelhecimento a função mitocondrial é comprometida e as atividades

antioxidantes reduzidas, contribuindo dessa forma para o desenvolvimento da sarcopenia (GAFFNEY et al., 2018). Diversos estudos tem relacionado à atrofia muscular a remodelagem neuromuscular, e apontam que ocorre uma redução no número de unidades motoras antes da perda da função muscular, consequente da redução de massa muscular (SHETH et al., 2018). A sarcopenia é uma condição relacionada a idade, definida como a perda gradual de massa muscular e de função no envelhecimento. Com o avanço da idade a massa muscular e a função muscular é reduzida entre 30 e 50% aos 80 anos, que pode ser pior em idosos inativos (MUSI et al., 2018). A osteoartrite (OA) é associada a uma das causas de incapacidade crônica mais comum em idosos, o desenvolvimento da OA é relacionado a um conjunto de fatores de risco e não somente ao envelhecimento em si. A disfunção mitocondrial está relacionada ao desenvolvimento de doenças relacionadas a idade, pois as mitocôndrias têm um papel importante para as fontes de EROS nas células, os danos em DNA mitocondrial podem ser promovidos por citocinas inflamatórias como *IL-1 $\beta$*  e *TNF- $\alpha$*  e pode contribuir para a morte do condrócito. O aumento da produção de EROS que pode vir de fonte mitocondrial contribui para a lesão mecânica na cartilagem e pode promover a morte do condrócito (LOESER, 2011).

#### **1.4. Sarcopenia**

A sarcopenia, apontada como uma das condições associadas ao processo de envelhecimento, destaca-se como uma alteração funcional importante e figura como um dos principais problemas relacionados a idade, e é culminada pela perda gradativa de massa muscular esquelética, força muscular e funcionalidade. O processo de deterioração que leva à perda de massa muscular esquelética é multifatorial, e pode ser ocasionado por remodelamento da unidade motora, inatividade física, níveis hormonais diminuídos e redução da síntese proteica (DALLE; ROSSMEISLOVA; KOPPO, 2017). A massa muscular começa reduzir gradualmente a partir dos 30 anos de idade e acelera à medida que as idades individuais estejam acompanhadas de baixa força muscular ou baixo desempenho físico (WILKINSON et al., 2018).

Os critérios de diagnóstico e definição de sarcopenia foram propostos pelo Grupo de Trabalho Europeu sobre Sarcopenia em Idosos (EWGSOP) em 2010, para o diagnóstico o grupo avaliou a força e desempenho através da mensuração da baixa massa muscular, acompanhado da baixa força muscular. Os pacientes foram avaliados quanto a capacidade de realizar atividades diárias, dificuldades de mobilidade, aumento do risco de quedas e fraturas, perda da

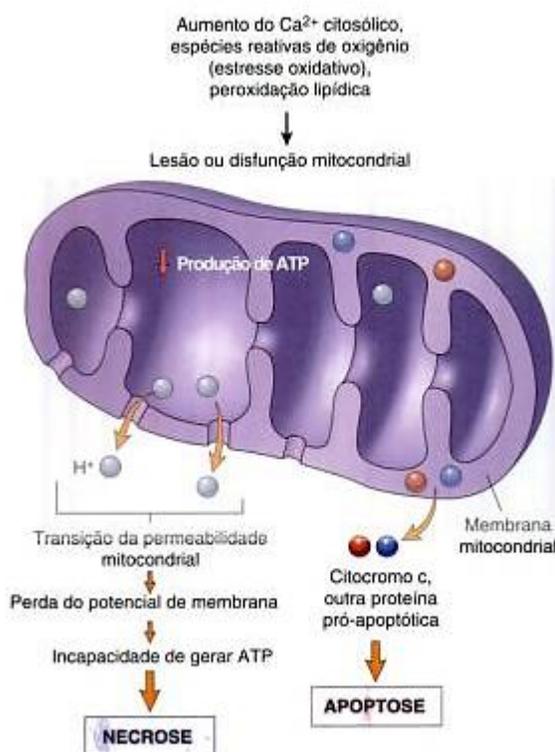
independência, aumento da predisposição a depressão e risco de morte. Em 2019 o EWGSOP, atualizou as diretrizes, priorizando como padrão de diagnóstico de sarcopenia mais importante a diminuição de força muscular (CRUZ-JENTOFT et al., 2010, 2014, 2019). Estudo de Cláudia et al., 2022, aponta que pode haver discrepância na prevalência de sarcopenia que varia de 11 a 27,7% quando o EWGSOP (2010) é aplicado, e quando o EWGSOP (2019) é aplicado varia de 4,6 a 13,6% (CLAUDIA et al., 2022).

Há uma alta prevalência de sarcopenia na população idosa, e é comum no envelhecimento normal e natural que se observe uma perda gradual e progressiva da massa muscular esquelética, e pode ser acompanhando por um aumento da deposição de gordura no tecido muscular, levando a um aumento da morbidade e mortalidade na população idosa, e em paralelo pode ser observado que esses fatores podem contribuir para um aumento da pré-disposição ao desenvolvimento de doenças como por exemplo o Diabetes Mellitus tipo II. Estudos apontam que o músculo esquelético compreende cerca de 40 a 50% de tecido em mamíferos, sendo um dos locais de extrema importância para o controle metabólico. Vale ressaltar que levando em consideração, em que a população idosa está cada vez mais crescente, é provável que a nos próximos anos a sarcopenia seja mais prevalente (WIEDMER et al., 2021).

Durante o envelhecimento acontecem algumas alterações na composição corporal, aumento de massa gorda (adiposidade) e redução da massa magra, em particular a massa muscular esquelética. Sabe-se que a massa muscular esquelética, também é relacionada a homeostase metabólica do fornecimento de aminoácidos aos tecidos, capacidade aeróbia, homeostase dos níveis glicêmicos, gasto energético de repouso e oxidação de lipídeos. A massa muscular esquelética é produto do equilíbrio entre a produção e catabolismo proteico, já os fatores anabólicos são físicos (responsáveis pela tensão e contração) e químicos (que incluem secreção de hormônios: insulina, testosterona, IGF-1) (BAUMGARTNER et al., 1998; DESCHENES, 2004; SEOK et al., 2007; TREVISAN et al., 2007).

No processo de envelhecimento tem sido demonstrado que a perda muscular pode se dar tanto pelos componentes neurais como também pela disfunção mitocondrial, porém a saúde mitocondrial é apontada como chave central para dar início e perpetuar a sinalização de sarcopenia. Acredita-se que a disfunção mitocondrial promove o aumento da abertura do poro de transição das mitocôndrias e dá início a sinalização apoptótica em neurônios motores e células musculares (**Figura 4**), porém no processo de envelhecimento isso não é corrigido porque há

uma inibição de mitofagia. Os conteúdos celulares próximos ao local das mitocôndrias disfuncionais são removidos através da ativação proteossômica, esse desequilíbrio celular aumenta proporcionalmente com o acúmulo de mitocôndrias disfuncionais. Embora o envelhecimento induza a disfunção mitocondrial, acredita-se que o acúmulo de EROS, ou de danos de DNAm, possa dificultar a comunicação de neurônios musculares e motores, levando ao aceleração da morte de ambos (ALWAY; MOHAMED; MYERS, 2017).



**FIGURA 4.** A disfunção mitocondrial promove o aumento da abertura do poro de transição das mitocôndrias e promove a sinalização apoptótica em neurônios motores e células musculares. Retirado de: <https://edisdisciplinas.usp.br/>.

A perda de massa muscular na sarcopenia induzida pela disfunção mitocondrial é mediada pela incapacidade da mitocôndria em gerar ATP suficiente, através da fosforilação oxidativa (OXPHOS), em resposta às demandas energéticas que são prejudicadas com o avanço da idade (BRAND; NICHOLLS, 2011; DAVINELLI et al., 2013). Estudos têm sido direcionados a fim de observar mecanismos compensatórios que induzem a produção de energia pelas mitocôndrias, mesmo sob condições de stress mitocondrial. Dentre esses mecanismos descritos, como mais importante deles se destaca o processo de biogênese

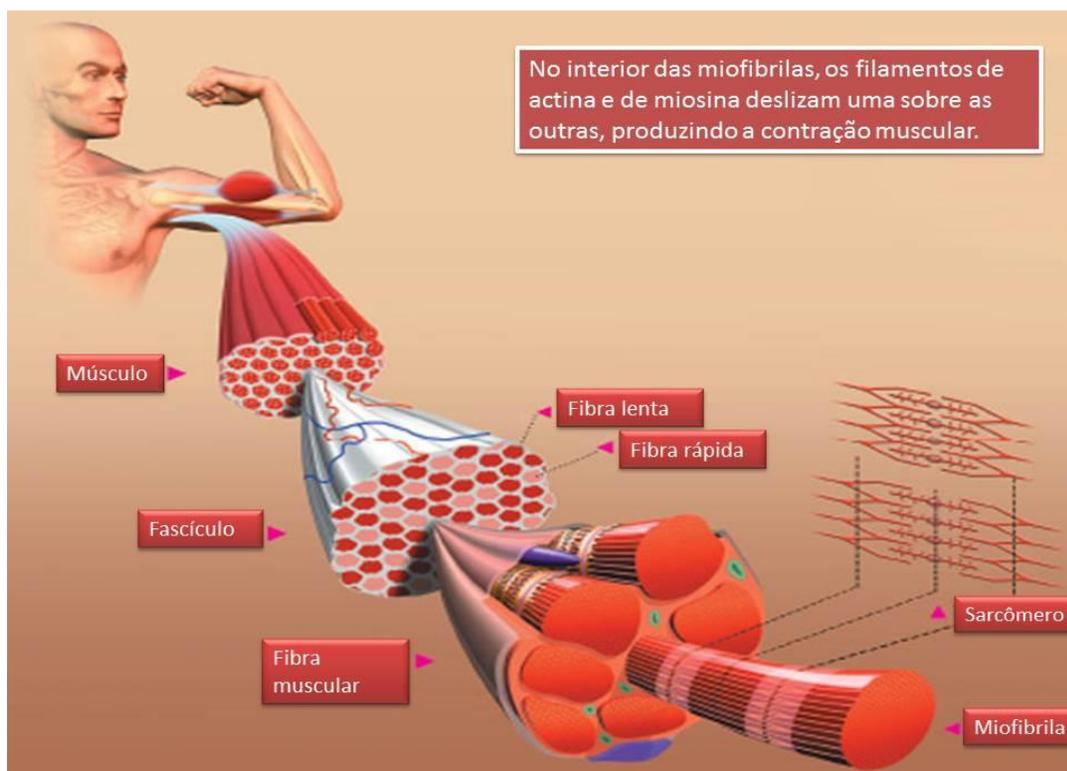
mitocondrial. *PGC-1 $\alpha$* , são proteínas co-ativadoras que pertencem a uma classe de reguladores de transcrição. *Sirts*, são proteínas que atuam como sensor metabólico e *AMPK*, uma proteína quinase que quando ativada atua na homeostase energética. Essas proteínas se destacam entre as vias descritas que podem estar relacionadas à biogênese mitocondrial indicando que pode haver uma adaptação compensatória aos déficits energéticos em desequilíbrios mitocondriais (CANTÓ; AUWERX, 2009; VALERO, 2014; SALT; HARDIE, 2017; SINGH et al., 2018).

### **1.5. Alterações no músculo esquelético relacionados a idade**

O tecido muscular compõe cerca de 40 e 45% do peso corporal humano, e se divide em músculo esquelético, músculo liso e músculo cardíaco, ao todo somam cerca 660 músculos que possuem diferentes localização e função. O tecido muscular esquelético é constituído por um grupamento de fibras musculares que são envoltas pelo endomísio, um tecido conjuntivo fibroso, esses grupamentos se formam em feixes podendo conter até 150 fibras, na qual formam um fascículo, que é envolto por uma estrutura chamada perimísio, o musculo ao todo é formado pela união de vários fascículos que são envoltos pelo epimísio. No contexto histológico as fibras são envoltas pelo sarcolema (membrana plasmática), na qual é formada por uma camada dupla de lipídeos, e sua função é condução da onda de despolarização através da fibra. Sob o sarcolema existe um grupamento de proteínas e filamentos de colágeno denominado membrana basal. É entre o sarcolema e a membrana basal onde se encontra as células satélites. A estrutura muscular é constituída por um conjunto de fibras musculares que formam unidades iguais e repetidas, os sarcômeros, que são delimitadas pelas linhas Z, onde se localizam filamentos proteicos finos e grossos, esse complexo estrutural além de conferir a organização estrutural permite a contração muscular (SCHIAFFINO& REGGIANI, 1996; FLUCK et al., 2003).

Com o avanço progressivo da idade, é observado que há uma alteração estrutural, no potencial de ação celulares e alterações moleculares no músculo esquelético, notado principalmente após os 60 anos em humanos. Observações feitas em atletas, observou que a força muscular começa a reduzir a partir dos 30 anos de idade e contínua de modo gradual conforme o avanço da idade (LARSSON et al., 2019b). Essas alterações promovem estímulos que atuam sobre o tecido muscular esquelético, estímulo elétrico, atividade neuromuscular, síntese de hormônios, a idade e o estímulo ou a ausência de exercício. Isso contribui para que haja

modificações na atividade contrátil do músculo, e com tudo o músculo esquelético necessita de uma série de adaptações levando a uma reorganização de eventos e atividades celulares que envolvem respostas funcionais das fibras musculares, como exemplo a quantidade de mitocôndrias, de capilares, nervos periféricos, atividades enzimáticas. Desse modo os estímulos aplicados sobre o músculo, favorece a transição de fibras lentas, também conhecidas como fibras do tipo I, para fibras rápidas, ou chamadas tipo II (**Figura 5**). As fibras apresentam isoformas, essa transição também ocorre quanto as isoformas, onde há uma mudança do tipo IIA para IID e I para IIA (BODINE et al., 1988; PORTER; VANDERVOORT; LEXELL, 1995). O desempenho da força muscular e a potência de trabalho muscular e sarcoplasmático é conferido pelas proteínas miofibrilares, através do desempenho de aerobiose e da resitência ao esforço. Esses desempenhos são associados aos tipos miofibrilares mais característico, em que o tipo IIB, que são chamadas de miofibras brancas, glicolíticas ou de contração rápida, e o tipo I, que são as vermelhas, oxidativas ou de contração lenta. As mitocôndrias e o núcleo são comprimidos contra o sarcolema (membrana) pela massa miofibrilar, e externamente ao sarcolema são localizadas as células satélites, que tem um papel importante na regeneração do tecido muscular (NAIR, 2005).



**FIGURA 5:** A composição muscular é organizada por um conjunto de miofibras que formam as fibras musculares, o conjunto de fibras constituído pelas fibras de contração rápida e lentas formam o fascículo muscular. As fibras do tipo II também chamadas de brancas ou glicolíticas são de

contração rápida, e o tipo I, que são as vermelhas, oxidativas ou de contração lenta. Retirado de: [fisiologiafantastica.blogspot.com](http://fisiologiafantastica.blogspot.com).

A força muscular e o desempenho físico podem ser afetados pelas diversas alterações morfológicas sofridas pelo músculo envelhecido, essas alterações podem estar ligadas as mudanças relacionadas a idade nos sistemas nervosos central e periférico, e inclui a perda gradual de motoneurons e a degeneração das junções neuromusculares (GONZALEZ-FREIRE et al., 2014) A perda de massa muscular relacionada a idade é seguida de uma desorganização da micro e macro arquitetura de toda estrutura muscular. A conversão de fibras do tipo II (rápidas) para I (lentas), e posteriormente a infiltração lipídica, resultam na redução da força muscular, aumentando o risco de quedas em idosos (BANO et al., 2017). Durante o processo de envelhecimento, há uma denervação das fibras musculares que pertencem a uma única unidade motora, geralmente rápida (LEXELL et al., 1983). A denervação é seguida consequentemente pela reinervação mediada pelos demais motoneurons, geralmente lentos. Essa reinervação mediada por um tipo diferente de motoneurons tem como resultado a conversão do tipo de fibras e do agrupamento do tipo de fibra (LEXELL; DOWNHAM; SJÖSTRÖM, 1986). A capacidade de regeneração dos motoneurons é perdida com o avanço do processo de envelhecimento, desse modo algumas fibras musculares continuam denervadas, o que resulta na sua morte definitiva. É observado que a atrofia das miofibras do tipo II, é seguida de um acúmulo de componentes não contratados, que incluem adipócitos e tecidos conjuntivos (GOLDSPINK, 1984; LEXELL; TAYLOR, 1991; KENT-BRAUN; NG; YOUNG, 2000; ALNAQEEB; ZAID; JOSEPH et al., 2012). Os idosos também apresentam prejuízos no sistema vascular, que inclui o comprometimento da atividade arterial, da função da parede endotelial e uma redução da densidade capilar muscular, esse comprometimento pode afetar ainda mais a saúde muscular, pois interfere na distribuição de oxigênio, nutrientes, proteínas, fatores de crescimento e hormônios (TANAKA et al., 2000; GROEN et al., 2014).

Nesse sentido ocorre a ativação de fatores de transcrição, como a miogenina, que quando ativada estimula a determinação de fibras do tipo I e *MyoD*, para as fibras do tipo II, que é mediada pela atividade neuromuscular, na qual pode alterar o fenótipo muscular, desse modo a adaptação muscular pode ser alterada, nesse sentido as mudanças de fibras que promovem a transição de fibras lentas do tipo I para as rápidas do tipo II, dependem da atividade nervosa

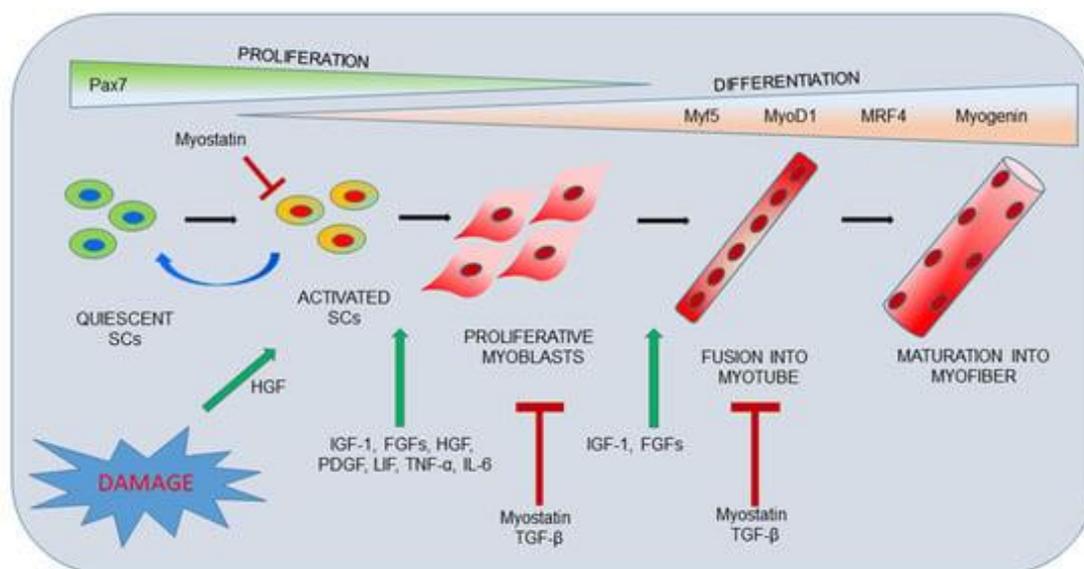
(HÄMÄLÄINEN&PETTE, 1995; FLUCK et al., 2003; GREGORY et al., 2005; LARSSON et al., 2019c).

MHC é a proteína motora que alimenta a contração muscular, e a velocidade, eficiência e produção de energia depende do tipo específico da molécula. Na grande maioria dos animais o musculo esquelético apresentam múltiplas isoformas de MHC, e geralmente são codificados por genes distintos, são comumente encontrados dentro dos músculos dos membros: I, IIA, IIX e IIB. Essas isoformas alternativas apresentam diferentes taxas de hidrólise de ATP e encurtamento muscular, dessa forma transmite fibras musculares individuais com propriedades fisiológicas específicas (ZHANG; ZHANG; MEDLER, 2010).

### **1.6. Alterações na função molecular do músculo esquelético relacionados a idade**

Há uma infinidade de genes e fatores de transcrição específicos que formam um processo complexo no desenvolvimento muscular esquelético (LIU et al., 2010). A regulação gênica da síntese de músculos em organismos vertebrados é mediada pela ação da família do fator regulador miogênico (*MRF*) fatores determinantes de mioblastos (*MyoD*), fatores miogênicos (*Myf5*), miogenina (*MyoG*) e *MRF4*, a família dos MRFs são importantes para os fatores de determinação miogênica e auxiliam no controle do destino da proliferação e diferenciação celular das células derivadas de células precursoras miogênicas (AASE-REMEDIOS; COLL-LLADÓ; FERRIER, 2020).

O crescimento e o reparo muscular são mediados por células-tronco musculares que são as células primárias (YIN; PRICE; RUDNICKI, 2013). Sob condições basais, as células primárias permanecem sob a lâmina basal em um estado quiescente. Quando ocorre danos musculares, as células primárias saem de seu estado quiescente, ou seja, quando está em estabilidade, e, após a ativação sofrem diferenciação e se proliferam através do sarcolema onde se fundem com fibras musculares existentes, esse processo é controlado pela expressão dos genes *Pax* e seguido da expressão de fatores regulatórios miogênicos: *MyoD*, *Myf5*, *Myogenin* e *MRF4*. Células musculares adultas expressam *Pax7*, enquanto a expressão *Myf5* e/ou *MyoD* é rapidamente regulada após a ativação de células primárias, ambas reguladas por *Pax7*. Após a ativação de células satélites, ocorre proliferação, diferenciação e posterior fusão geram outras células multinucleadas (miotubos) com características semelhantes às fibras que compõe o tecido de origem (**Figura 6**) (CORNELISON&WOLD, 1997; MANCINELLI et al., 2021).



**Figura 6:** Regeneração do músculo esquelético. As etapas desde a regeneração do músculo esquelético até a formação de novas fibras são conduzidas pelos processos de ativação e diferenciação de células satélites e são controlados por uma cascata genética que envolve Pax7 e os fatores reguladores miogênicos (Myf5, MyoD1, MRF4 e Miogenina). Fonte: (ROMAGNOLI; IANTOMASI; BRANDI, 2021).

O fator nuclear das proteínas ativadas de células T (*NFAT*), é uma família composta por 5 elementos (*NFATc1-4*, *NFAT5*), regulados pela calcineurina fosfates (HOGAN et al., 2003). Estudos demonstram que o *NFATc1* é um regulador essencial da expressão gênica específica do tipo de fibra e da troca de fibras em resposta ao exercício e estabelecem o *NFATc1* como um inibidor da expressão de *MyoD*, e foi visto que a transativação dependente de *MyoD* foi fortemente reprimida pelo *NFATc1*, mas não por outros fatores de transcrição da mesma família, sugerindo um papel específico para *NFATc1* na inibição da transativação de *MyoD* (EHLERS; CELONA; BLACK, 2014). Sabe-se que *MyoD* é um alvo transcricional direto do gene *Mef2c*, através de um promotor específico do músculo esquelético (WANG et al., 2001; DODOU; XU; BLACK, 2003).

No processo de diferenciação das células progenitoras do músculo esquelético adulto o *CREB* regulador transcricional de ligação de DNA, desempenha papéis-chave. A sinalização de tecidos esqueléticos danificados induz a fosforilação do *CREB*, e quando ativado sinaliza tanto para células precursoras miogênicas quanto para miofibras recém-regenerados dentro de áreas regeneradoras. Um estudo mostrou que pode haver uma interação entre *CREB* e *MyoD* pela

interferência em sua dimerização que pode ser induzida por sua transativação (A. E. CHEN et al., 2004; KIM et al., 2005; STEWART et al., 2011).

Um trabalho recente realizado em modelo animal apontou que fator neurotrófico derivado do cérebro (*bDNF*) e membro da família mioquina, pode ter influência na diferenciação, plasticidade e sobrevivência dos neurônios centrais, e de modo semelhante pode afetar o desenvolvimento do sistema neuromuscular. A exclusão do *bDNF* pode promover a redução do volume da placa final do motor sem prejudicar a integridade da junção neuromuscular. Desse modo acredita-se que as alterações causadas por essa exclusão podem estar associadas estão associadas a uma lentidão na função muscular, aumentando a resistência à fadiga induzida pela contração. Já na super expressão de *bDNF* favorece um rápido programa genético do tipo músculo, elevando o número de fibras glicolíticas (DELEZIE et al., 2019).

Durante o envelhecimento pode ocorrer um impacto na função celular satélite, pois as células satélites musculares são sensíveis a fatores solúveis, processos inflamatórios e o crescimento local, que sofrem mudança no envelhecimento, resultando em prejuízo no envelhecimento ou ocasionando em retardamento no processo de reparo e regeneração em resposta aos estímulos que causam danos no tecido muscular. A neutralização da via *WNT* e a transformação do fator de crescimento  $\beta$  (*TGF $\beta$* ) sinalizam vias que antagonizam e promovem a sinalização de células satélites, e podem apresentar melhorias no mecanismo de reparação muscular na velhice. Estudos sugerem que o aumento dos níveis de *TGF $\beta$*  no processo de envelhecimento pode ter um impacto negativo na função celular satélite, através da promoção de tipos de células-tronco residentes em músculos profibróticos conhecidos por conversarem cruzadamente com células satélites (BRACK & MUÑOZ-CÁNOVES, 2016).

Há uma superfamília seletiva que compreende 30 ligantes diferentes para subtipos específicos de receptores, que é conhecida como superfamília *TGF $\beta$* . A sinalização *TGF $\beta$*  é uma rede complexa que está relacionada à diferentes ações biológicas que ocorrem dentro de uma célula, na qual depende da combinação de ligantes e receptores que são utilizados. No sentido desses ligantes, duas grandes vias de sinalização são ativadas que implicam em duas classes de fatores de transcrição pertencentes à família *Smad*. Fatores de crescimento e diferenciação (*GDF*) como a miostatina/*GDF8* e *GDF11*, e as proteínas *TGF $\beta$*  promovem a atividade de *Smad2* e *3* culminando em perda muscular. Esses ligantes interagem com receptores do tipo I e tipo II, e as

diferentes combinações ligantes-receptores, determina o modo como as duas subfamílias de ligantes recrutam diferentes proteínas *Smad* (SARTORI et al., 2014).

Nesse sentido, o complexo *activin/myostatin/TGF $\beta$*  interagem com a membrana plasmática associada aos receptores tipo IIB e tipo IIA (*ActRIIB/IIA*) e receptores *TGF $\beta$* . Além disso, ligantes associados ao receptor *ActRIIB/IIA/TGF $\beta$*  levam ao recrutamento e ativação da quinase semelhante ao receptor de ativação (*ALK*), tais como *ALK-4* (SARTORI et al., 2009; TRENDELENBURG et al., 2009).

Pratt et al., 2019, destacou o envolvimento de genes importantes para identificar o evento de sarcopenia, tais como genes de regulação hormonal, de vias proliferativas, de produção de citocinas, genes de modulação estrutural e metabólica. Dentre eles os mais pesquisados foram *ACTN3* (alpha-actina 3), que forma uma parte integrante da linha Z do sarcômero em fibras de contração rápida e ajuda na coordenação de contrações de miofibras; *ACE* (enzima conversora de angiotensina) estando mais relacionado a populações atléticas, o gene *ACE* apesar de obter pesquisas limitadas, tem mostrado caminhos que sugerem sua importância às mudanças relacionadas a idade nos fenótipos musculares (PRATT et al., 2019).

### **1.7. Compostos naturais**

Devido ao percentual da população idosa estar cada vez mais em crescimento, diversas estratégias têm sido exploradas para auxiliar no controle da sarcopenia associada ao envelhecimento, dentre estas, a abordagem nutricional enfatizando o uso de alimentos ricos em compostos bioativos, tais como os polifenóis, tem chamado atenção por suas propriedades biológicas na modulação desse evento. Devido ao seu consagrado potencial antioxidante largamente reportado na literatura, diversos estudos mostraram seu potencial terapêutico na modulação do stress oxidativo envolvido no processo da sarcopenia (ROBINSON &SHALIT, 1964; DAMIANO et al., 2019; CESARE et al., 2020; GANAPATHY&NIEVES, 2020). Além disso, alguns ácidos fenólicos representativos foram relatados para exercer efeitos benéficos nos músculos, promovendo seu crescimento e/ou reduzindo seu desperdício, melhorando a qualidade mitocondrial e prevenindo inflamação e estresse oxidativo (SAIBABU et al., 2015). O ácido gálico (GA) em combinação com epicatequina (EC) e epigallocatequina (EGC) aumentou a diferenciação muscular ao induzir os fatores reguladores miogênicos miogenina, *Myf5* e *MyoD* nos miotubos C2C12 (HONG et al., 2020).

Entre os vários ácidos hidroxicinâmicos, o ácido ferúlico (FA), o ácido clorogênico e o ácido cafeico têm efeitos positivos no músculo (CHEN et al., 2019c). Foi relatado que o ácido clorogênico aumenta a força muscular, melhorando a função mitocondrial e o metabolismo da energia celular em ratos induzidos pelo treinamento de resistência. O ácido cafeico, encontrado em frutas, vinho e café, por sua vez, apresenta alguns efeitos interessantes contra lesões musculares, como a melhora da função muscular através da regulação da função mitocondrial e do metabolismo de energia celular (SHEN; YEN; LIOU, 2013; OMMATI et al., 2020). Além disso, em um modelo de estudos comportamentais (*Zebrafish*), observou que a administração de FA por 30 dias causou o crescimento hipertrófico do músculo esquelético do tipo rápido, bem como foi capaz de aumentar os níveis de *MyoD* (WEN; USHIO, 2017).

### **1.8. Erva mate (*Ilex paraguariensis*)**

A *Ilex paraguariensis*, cujo nome comum é erva mate, é amplamente consumida no sul do Brasil sob a forma de chimarrão, na região centro-oeste na forma de tererê e no restante do país como chás ou infusões. Estudos sobre composição química da erva mate apontam para a presença de alcaloides (metilxantinas), flavonoides, vitaminas como A, complexo B, vitaminas C e E, bem como taninos, ácidos clorogênicos e seus derivados, além de numerosas saponinas triterpênicas derivadas do ácido ursólico, conhecidas como saponinas (GUGLIUCCI, 1996).

Diversos trabalhos demonstram que os compostos detectados na EM possuem uma série de funções biológicas que tem se mostrado benéficas no tratamento de desequilíbrios metabólicos associados a obesidade, tais como: ação antioxidante, anti-inflamatória, imunomodulatória, anticancerígena, modificação do metabolismo de glicose, redução do risco cardiovascular, modificação do metabolismo do colesterol, redução do peso corpóreo e reversão do quadro de resistência à insulina (GUGLIUCCI, 1996; SCHINELLA et al., 2000; FILIP et al., 2001; BRACESCO et al., 2003, 2011; ; CHANDRA & DE MEJIA, 2004; MIRANDA et al., 2008; ARÇARI et al., 2009, 2011; KLEIN et al., 2013).

Um artigo recente publicado por nosso grupo já demonstrou potencial da EM na modulação de alvos moleculares de tecido muscular relacionados à biogênese mitocondrial, foram observados que a EM estimulou o metabolismo energético mitocondrial em células C2C12, através do aumento da expressão de genes envolvidos na biogênese mitocondrial (*Ampk*, *Mttfa*, *Nrf1*) e relacionados a termogênese (*Ucp-1* e *Ucp-3*). E em modelo de obesidade *in vivo* induzido

por dieta hiperlipídica, o tratamento com EM reduziu o peso corpóreo. Além disso, os dados respirométricos sugeriram que a EM foi capaz de estimular o gasto energético. Adicionalmente dados de expressão gênica em TAM e músculo esquelético mostraram aumento da expressão de *Ucp-1* e *Ucp-3* em animais tratados com EM, sugerindo efeito termogênico. Além disso, houve indicativos de estímulo de biogênese mitocondrial bem como melhora da atividade de fosforilação oxidativa, conforme evidenciados pelo aumento da expressão de genes de *Nrf-1*, *mtTFA*, *Pgc-1 $\alpha$*  e *Sirt-1* e proteica de *SIRT-1*, *p-AMPK*, *UCP-1*, *UCP-3* e *OXPHOS* (DOS SANTOS et al., 2018a). No entanto, atividade da EM na modulação de eventos relacionado às desordens musculares no processo de envelhecimento ainda não foram exploradas. Tendo em vista o substancial aumento da população idosa e considerando as debilitações metabólicas e funcionais nesta fase da vida ocasionadas tanto por fatores genéticos quanto ambientais (os quais incluem estilo de vida e hábitos dietéticos), estudos que visem a prevenção de danos adicionais ao organismo se mostram importantes. Diversos estudos demonstram que grande parte destes efeitos deletérios à saúde podem ser controlados com uma dieta rica em compostos antioxidantes. Diante disso, estudos que exploraram as propriedades funcionais da erva-mate demonstraram efeitos benéficos na modulação de stress oxidativo, inflamação, resistência à insulina, entre outros benefícios, aspectos comumente evidenciados no envelhecimento. O uso de um alimento como Erva Mate, pode ser uma proposta efetiva, uma vez que é uma estratégia não invasiva, de alta tolerabilidade e baixa toxicidade, além de ser acessível ao consumo.

## 2. OBJETIVOS

### I. Objetivo Geral

Avaliar as propriedades da suplementação com erva mate na modulação do processo de sarcopenia relacionada ao envelhecimento em camundongos.

### II. Objetivos Específicos

1. Avaliar a evolução do peso corpóreo e consumo de ração;
2. Avaliar composição corporal;
3. Avaliar qualidade de força muscular pelo Rope Grip Test;
4. Avaliar o conteúdo de DNA mitocondrial através da expressão gênica por PCR em tempo real;
5. Avaliar por PCR em tempo real a expressão de genes envolvidos no processo de Biogênese Mitocondrial como: *Ampk2*, *mtTFA*, *NRF1*, *PGC1 $\alpha$* , *Sirt1*, *UCP3*.
6. Avaliar por PCR em tempo real a expressão de genes envolvidos no mecanismo de regeneração e reparo muscular como: *CREB*, *PAX7*, *SIX1*, *MYF5*, *MyoD*, *MEF2C*;
7. Avaliar por PCR em tempo real os genes envolvidos no crescimento e diferenciação: *GDF8*, *TGF $\beta$* , *ACTRIIB*;
8. Avaliar por PCR em tempo real os genes envolvidos na troca de fibras: *bDNF*, *NFATC1*;
9. Avaliar por PCR em tempo real o gene *ACTN3* envolvido no processo de coordenação de contração muscular, e *ALK4* gene envolvido na comunicação celular.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais e desenho experimental

Camundongos machos C57Bl6 com 4 semanas de idade foram adquiridos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB-Unicamp, Campinas, Brasil). Todos os animais foram alojados em gaiolas de micro isolamento em ambiente com temperatura controlada (22°C) em ciclo noite/dia de 12 horas com acesso ad libitum à água potável e dieta. Os animais foram divididos em 2 grupos com 5 animais cada, conforme a dieta oferecida a composição da dieta é apresentada na **TABELA 1**, nos quais um deles foi alimentado com ração AIN-93m suplementada com extrato de erva mate liofilizado (1,2 g/Kg de dieta-grupo CT+MT), o teor dos fitoquímicos presentes na EM utilizada é apresentado na **TABELA 2**, enquanto o outro com a ração AIN-93m (Rhoster®) padrão (CT), durante um período de 20 meses. Os camundongos foram pesados mensalmente e a ingestão alimentar foi registrada. A dose de EM acrescentada na ração, foi escolhida baseado no consumo diário de EM por pessoa na região Sul do Brasil, onde é amplamente consumida, e foi considerado a quantidade de ração consumida por camundongo, que corresponde a mais ou menos 5g/dia, chegando à dose escolhida de 1,2g/Kg de ração. A ração suplementada com EM foi produzida industrialmente (Rhoster® Indústria e Comércio Ltda, Araçoiaba da Serra-SP). Além disso, adicionalmente um outro grupo de camundongos foi alimentado apenas com AIN-93m, para comparação, e foram submetidos aos mesmos testes que os grupos CT e CT+MT, a eutanásia foi realizada após 8 semanas e esse grupo (N=5) foi considerado o grupo controle jovem (CTJ) (**Figura 7**).

Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP, Brasil (Protocolo 002.10.2014).

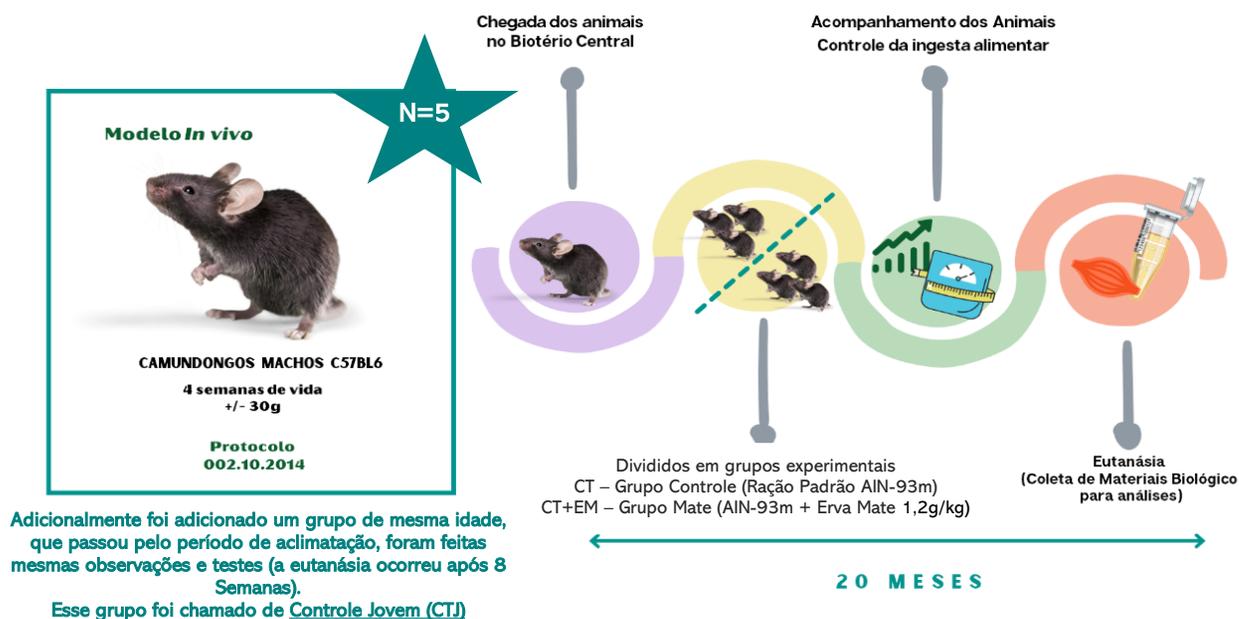
**TABELA 1:** Composição das dietas utilizadas.

	Dieta Padrão		Dieta enriquecida com Erva Mate	
	g.kg-1	kcal.kg-1	g.kg-1	kcal.kg-1
Amido de milho	397.5	1590	397,5	<b>1590</b>
Caseína	200	800	200	<b>800</b>
Sacarose	100	400	100	<b>400</b>
Amido dextrinado	132	528	132	<b>528</b>
Erva Mate (liofilizada)	-	-	1,2	<b>0</b>
Óleo de Soja	70	630	70	<b>630</b>
Celulose	50	-	50	-
Minerais	35	-	35	-
Vitaminas	10	-	10	-
L-Cistina	3	-	3	-
Colina	2.5	-	2.5	-
<b>Total</b>	<b>1000</b>	<b>3948</b>	<b>1000</b>	<b>3948</b>

**TABELA 2:** Concentração (mg/g) dos principais fitoquímicos presentes no chá-mate utilizado.

Cafeína	Teobromina	Ácido 5-O- cafeoilquinico (5-CQA)	Ácido cafeico	Total de polifenóis*
5,82 ±0,17	3,30 ±0,35	32,25 ±0,50	0,58 ±0,01	348,80 ±16,35

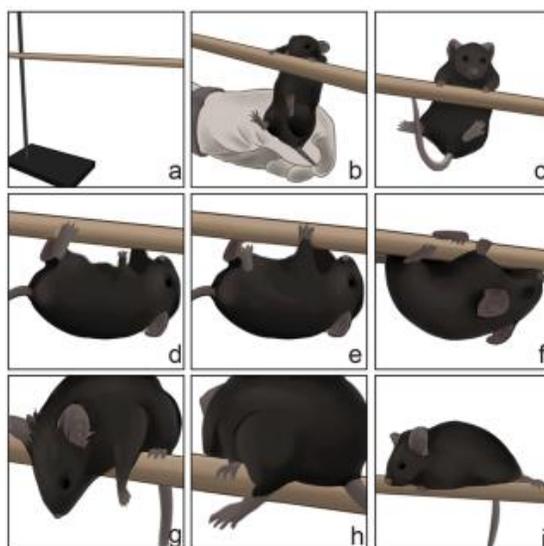
\* Determinado por cada pico cromatográfico identificado como ácido clorogênico, baseado na comparação por UV com o 5-CQA puro. Os valores representam a média e o desvio padrão dos fitoquímicos avaliados.



**FIGURA 7:** Desenho experimental do modelo utilizado. 2 grupos experimentais foram avaliados ao longo de 20 meses, foram divididos em Grupo Controle-Velho (CT), que recebeu ração padrão comercial AIN-93m, e Grupo Mate (CT+EM), grupo de mesma idade que recebeu a ração AIN-93m suplementada com 1,2g/Kg de Erva Mate. Adicionalmente 1 outro grupo que foi chamado de Controle Jovem (CTJ) também foi avaliado passando pelas mesmas observações e testes e foram eutanasiados após 8 semanas. Amostras biológicas foram coletadas para posteriores análises.

### 3.2. RopeGrip Test

Aos 16 meses de idade os animais de ambos os grupos descritos, foram submetidos à um teste conhecido com *Rope Grip Test*. Neste, os camundongos foram induzidos a se segurar com as patas dianteiras em uma corda horizontal de 2 mm de espessura suspensa a 80 cm acima do solo, colocada sobre uma caixa de observação, e o tempo decorrido até que os animais levantassem as patas traseiras para agarrar a corda foi medido (**Figura 8**). Camundongos que conseguiram agarrar a corda com ambas as patas traseiras dentro de 60 segundos e se manter nessa condição durante pelo menos 10 segundos, foram considerados bem-sucedidos nesse ensaio. Cada grupo foi constituído de 5 animais, e o teste foi realizado por duas vezes em dois dias diferentes, cada vez em duas repetições com intervalos de 30 min. A análise estatística incluiu o tempo real registrado até ocorrer uma pegada bem-sucedida. Os indivíduos que não conseguiram agarrar com as patas traseiras foram pontuados como 60 s (CHEN et al., 2019).



**FIGURA 8:** Exemplificação do *Rope Grip Test*, onde os camundongos foram induzidos a se segurar com as patas dianteiras em uma corda horizontal de 2 mm de espessura suspensa a 80 cm acima do solo, que colocada sobre uma caixa de observação, foi observado e medido o tempo decorrido em que os animais levantassem as patas traseiras para agarrar a corda. Fonte: CHEN et al., 2019.

### 3.3. Análise do gasto energético por calorimetria indireta

A calorimetria indireta foi realizada utilizando o sistema Oxylet/Physiocage (Panlab, Barcelona, Espanha). Os animais foram colocados individualmente em câmaras respiratórias (temperatura: 22–23 °C, umidade: 45–55% ciclo claro escuro 12/12 h) com fluxo de ar de 0,5 L/min. Os animais são colocados previamente 24h antes do experimento para aclimação. Durante as 24 h de análise, O<sub>2</sub> (%) e CO<sub>2</sub> (%) foram medidos a cada 9 min. O Software Metabolism (Panlab) calculou o consumo de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e gasto energético (kCal/h/kg<sup>0,75</sup>).

### 3.4. Eutanásia e avaliação da composição corporal

Após 6 h de jejum, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de 1:1 de Cetamina 100 mg/mL e Xilazina a 2% no volume de 0,1 mL para cada 100 g de peso corpóreo. Amostras de depósitos de tecido adiposo, fígado e músculo gastrocnemio foram cuidadosamente dissecados, pesados e armazenados para posteriores análises.

### 3.5. Análise de conteúdo do DNA mitocondrial (DNAMt)

A quantificação relativa do DNAMt foi desenvolvida por PCR em tempo real. Para tanto, a extração do DNA total das amostras foi realizada utilizando o protocolo fenol/clorofórmio. Basicamente, as amostras foram incubadas à 37°C overnight em 300 uL de tampão de digestão (Tris-HCL 1M; EDTA 0,5M; TWEEN20 0,5%), com adição de 10 uL de proteinase K 20mg/mL. Posteriormente as amostras foram homogeneizadas em 400 uL de PCI (25 Fenol:24 Clorofórmio:1 álcool isoamílico) gelado, em seguida foi centrifugado por 10 min à 12000 rpm em temperatura ambiente, o sobrenadante (DNA) foi coletado e homogeneizados em 400 uL de CI (24 clorofórmio:1 álcool isoamílico) gelado, e na sequência foi centrifugado por 10 min a 12000 rpm em temperatura ambiente, o sobrenadante foi coletado e novamente homogeneizados em 400 uL de CI (24clorofórmio:1 álcool isoamílico) gelado, e na sequência foi centrifugado por 10 min a 12000 rpm em temperatura ambiente, o sobrenadante foi coletado e adicionado 100 uL de acetato de sódio 3M (NaAc 3M) e mais 600 uL de etanol gelado, e foram homogeneizados cuidadosamente até que foi observado a precipitação do pellet, na sequência foi centrifugado a 10 min por 12000 rpm em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado. Posteriormente lavou-se o pellet (DNA) com 250 uL de etanol 70% gelado (-20°C), centrifugado por 3 min a 12000 rpm, e descartado o sobrenadante, após foi incubado à 37°C por 10 min mantendo a tampa do tubo aberta, após foi adicionado 100-200 uL de água ultrapura e ressuscitado com a pipeta, em seguida foi mantido em temperatura ambiente por 15 min, a concentração e pureza da amostra foi quantificada no Nano Drop 2000 (Thermo Scientific™, MA, USA). A reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando o Platinum® SYBR GREEN® qPCR Supermix UDG (Invitrogen®, Waltham, Massachusetts, EUA), seguindo as especificações do fabricante e em triplicata. Para quantificação do DNAMt foi utilizado o gene do Cox1 (*Cytochrome c oxidase subunit I*) e como controle interno o gene 18S rRNA (**TABELA 3**).

**TABELA 3:** Sequência dos *primers* utilizados na análise do conteúdo de DNAm

Gene	Sense	Antisense
<b>18S RNA</b>	5'- TAGAGGGACAAGTGGCGTTC- 3'	5'-CGCTGAGCCAGTCAGTGT- 3'
<b>COX 1</b>	5'- GCCCCATATATAGCATTCCC- 3'	5'- GTTTCATCCTGTTCCCTGCTCC-3'

### 3.6. Extração de RNA e qPCR em Tempo Real

A extração de RNA total das biópsias foi realizada utilizando o protocolo de extração com Trizol™ Reagent (Invitrogen™). Basicamente, as amostras foram homogeneizadas com 1000µL de Trizol™ Reagent (Invitrogen™) para cada 50-100 mg de tecido, adicionando 200 µL para cada 1000 µL de clorofórmio aos homogenatos, seguido de incubação a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12000 g, 4°C por 10 minutos e a fase aquosa coletada e homogeneizada com 1000 µL de álcool isoamílico, adicionando uma mistura de 20 µL de AcNa 3M, 1 µL de Glicógeno (GenElute LPA-Sigma Aldrich, MO, Estados Unidos) (10 µg/µL), foram homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos na sequência foi centrifugada (10 minutos, 12000 g, 4°C). Após as etapas relatadas o sobrenadante foi descartado. Subsequentemente, 500 µL de álcool 75% foram adicionados ao pellet resultante e após nova centrifugação a 12000 g, 4°C por 5 minutos o solvente será descartado. Após evaporação completa do solvente (10-15 minutos) os pellets foram ressuspensos em um volume apropriado de H<sub>2</sub>O nuclease *free* (cerca de 100- 200 µL para as biópsias) e a concentração de RNA total das amostras foram mensuradas por espectrofotometria com auxílio do equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™, MA, USA). A reação de PCR em tempo real foi desenvolvida utilizando-se o SYBR® (Go-Taq Master Mix, Promega, Madison, Wisconsin, EUA) conforme especificações do fabricante. Os experimentos foram feitos em duplicata de 5 amostras distintas por grupo experimental, e as amostras foram normalizadas com os valores do gene constitutivo. Todas as

reações de PCR em tempo real foram cicladas no equipamento 7300 Real-Time PCR System, foram avaliados genes envolvidos na biogênese mitocondrial (Invitrogen®, Waltham, Massachusetts, EUA) e no processo de sarcopenia (Exxtend® Soluções em Oligos, Paulínia, São Paulo, BR) (TABELA 4).

**TABELA 4:** Sequência dos *primers* utilizados

Gene	Sense	Antisense
<b>Ampka2</b>	5'-ACAGGCCATAAAGTGGCAGT-3'	5'-GTCGGAGTGCTGATCACCTG-3'
<b>mtTFA</b>	5'-CAAAGGATGATTCGGCTCAG-3'	5'-CCATCTGCTCTTCCCAAGAC-3'
<b>Nrf1</b>	5'-CAACAGGGAAGAAACGGAAA- 3'	5'-CACTCGCGTCGTGTACTCAT-3'
<b>Nrf2</b>	5'-AGGACATGGAGCAAGTTTGG-3'	5'-TCTGTCAGTGTGGCTTCTGG-3'
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	5'-TTTCTGTGGGTTTGGTGTGA-3'	5'-CCGAGAATTCATGGAGCAAT-3'
<b>Sirt1</b>	5'-AGTGGCACATGCCAGAGTC-3'	5'-TCCAGTCCTCCAGCACAT-3'
<b>Ucp3</b>	5'-CTCACTTTTCCCCTGGACAC-3'	5'-GTCAGGATGGTACCCAGCAC-3'
<b>18s</b>	5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'	5'-CAATTACAGGGCCTCGAAAG-3'
<b>Myf5</b>	5'-TGAGGGAACAGGTGGAGAA-3'	5'-GACAGGGCTGTTACATTCAGG- 3'
<b>MyoD</b>	5'-AGCACTACAGTGGCGACTCA-3'	5'-GGTGTCTAGCCATTCTGC-3'
<b>Pax7</b>	5'-CTTACTGCCACCCACCTAC-3'	5'-CACGTTTTTGGCCAGGTAAT-3'
<b>Six1</b>	5'-TTAAGAACCGGAGGCAAAGA- 3'	5'-TGCTTGTTGGAGGAGGAGTT-3'
<b>NFATc1</b>	5'-TCTCACCACAGGGCTCACTA-3'	5'-GCGTGAGAGGTTTATTCTCC-3'
<b>Mef2C</b>	5'-AGCCTAAGTCCTGCAAGCTG-3'	5'-CCAGGCTTTCACCTTGTTCT-3'
<b>ACTN3</b>	5'-AGGACCTGCAGGATGTGTG-3'	5'-TTGCCTTGAAGTGTTCGTGT-3'
<b>GDF8</b>	5'-TGACAGCAGTGATGGCTCTT-3'	5'-AGCAACATTTGGGCTTGC-3'
<b>ACTR IIB</b>	5'-ATGCCCAAGTTCTTTTGTGG-3'	5'-TCCTGATCTCACTGCAAACG-3'
<b>ALK4</b>	5'-TCTACTGGGAGATTGCACGA-3'	5'-AACCTTTCGCATCTCCTCAA-3'
<b>bDNF</b>	5'-TGGCCTAACAGTGTTCGACAG-3'	5'-CAGGGCCATTCACTCCTATT-3'
<b>Creb</b>	5'-TTTGTCTTGGCTTTCCGAAT-3'	5'-CACTTTGGCTGGACATCTTG-3'
<b>TGFb</b>	5'-TAATGGTGGACCGCAACA-3'	5'-CTGCTTCCCGAATGTCTGA-3'

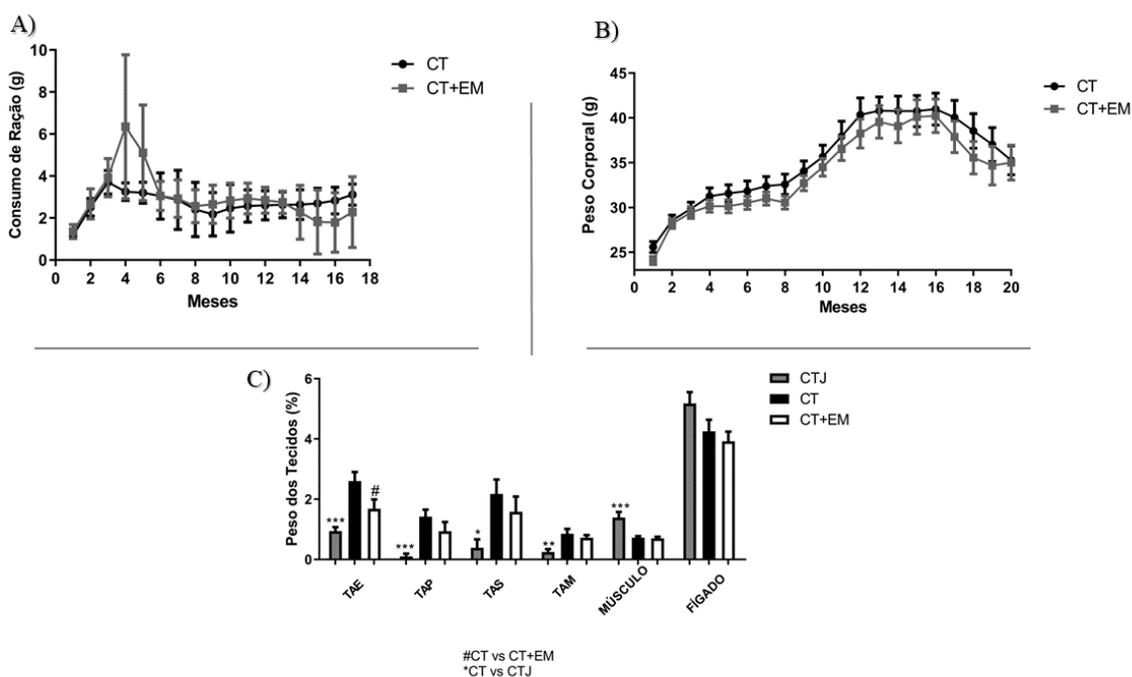
### **3.7. Forma de análise dos resultados - Análise estatística.**

Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média. Diferenças entre os tratamentos experimentais foram verificadas através de Análise de Variância de Uma Via (ANOVA) seguida pelo teste *a posteriori* de Tukey ou *teste t*. Um valor de  $p < 0.05$  foi considerado como estatisticamente significativo. Todos os testes foram realizados com auxílio do Software Graph Pad Prism (La Jolla, CA, USA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Avaliação da composição corporal

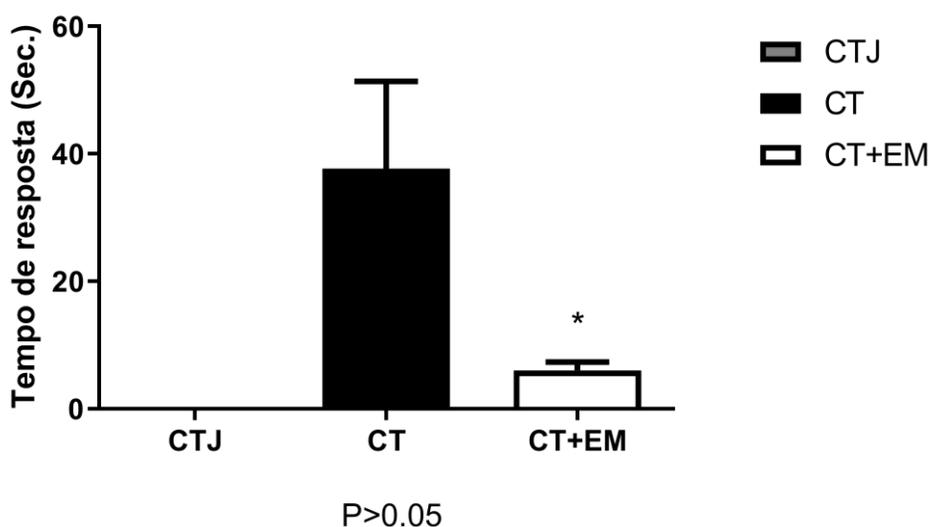
Segundo os dados obtidos foi possível observar que houve um aumento no consumo de EM (**Figura 9A**) apenas entre as semanas 4 e 6, depois se mantiveram estáveis em relação ao grupo que recebeu dieta padrão, o consumo de EM foi eficiente para a manutenção do peso corporal (**Figura 9B**) do grupo tratado, bem como promoveu melhorias na composição corporal, através da redução do peso de gordura visceral e manteve massa muscular (**Figura 9C**), favorecendo a prevenção da sarcopenia, que é característica do processo do envelhecimento. O tempo de acompanhamento dos animais dos grupos CT e CT+EM foram de 20 meses, enquanto o grupo jovem (CTJ) foram apenas de 8 semanas, nesse sentido não foi possível realizar a comparação do consumo de ração e da evolução corporal.



**FIGURA 9: Dados da avaliação da evolução corporal. 9A)** Evolução do consumo de ração; **9B)** Evolução do peso corporal; **9C)** Avaliação do Peso dos Tecidos. Os valores significativos foram entre  $p < 0,05$  e  $p < 0,0001$  (dados estatisticamente significativos obtidos através do teste One-way ANOVA).

## 4.2. Rope Grip Test

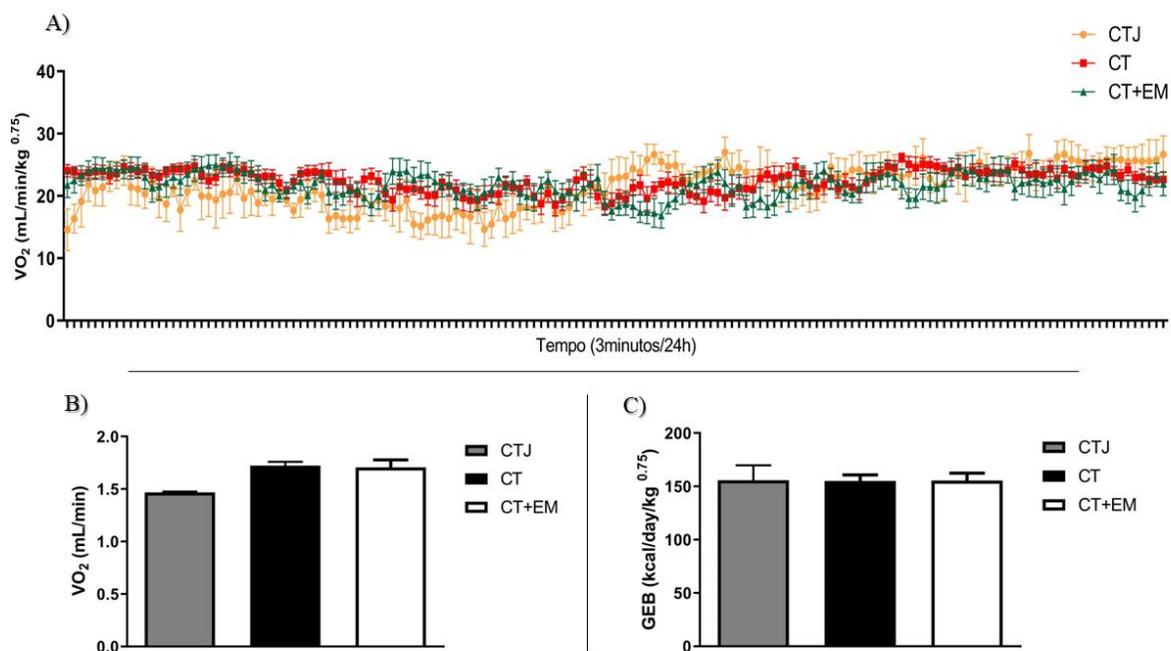
Os dados obtidos por meio do *Rope Grip Test* demonstraram que os animais do grupo tratado com EM (CT+EM) conseguiram concluir o movimento de agarramento da corda com ambas as patas traseiras mais rapidamente, mostrando-se bem-sucedidos, quando comparado ao grupo da mesma idade (CT) que não recebeu o tratamento. Em relação aos resultados obtidos com o grupo jovem (CTJ), esse movimento de fixação na corda foi realizado de maneira imediata, a partir do momento em que as patas dianteiras dos animais tocavam o objeto, inviabilizando a contagem do tempo. Diante disso, os dados indicam que o tratamento com EM induziu o aumento da força muscular nos animais idosos (**Figura 10**).



**FIGURA 10: Avaliação de força pelo *Rope Grip Test*.** Tempo de resposta pontuados em 60 segundos. Os valores significativos foram de  $p < 0,0315$  (dados estatisticamente significativos obtidos através do teste One-way ANOVA).

## 4.3. Análise do gasto energético por calorimetria indireta

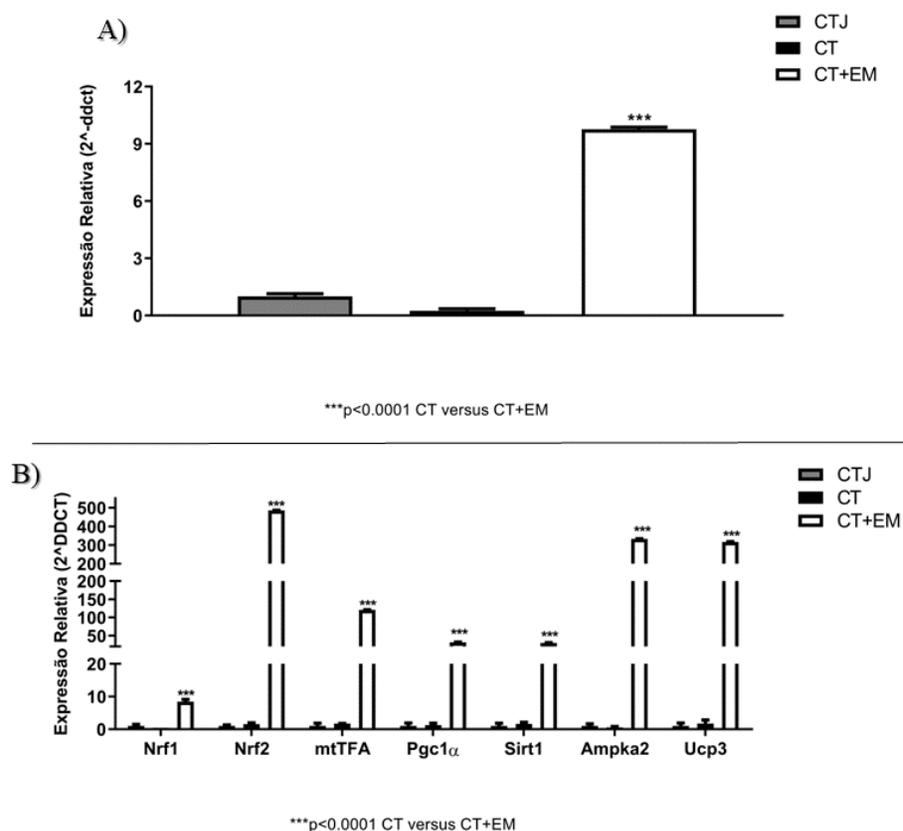
Com base nos resultados, dados referentes ao consumo de O<sub>2</sub> (**Figuras 11A e B**) e do gasto energético (EE) ao longo de 24h (**Figura 11C**) não apresentaram diferenças significativas nos grupos comparados.



**FIGURA 11: Dados da análise de gasto energético por calorimetria indireta. 10A)** Evolução do consumo de O<sub>2</sub>; **10B)** Consumo de O<sub>2</sub>; **10C)** Gasto energético (dados estatisticamente significativos obtidos através do teste One-way ANOVA).

#### 4.4. Avaliação do conteúdo de DNAm<sub>t</sub> e análise de expressão gênica envolvidas na biogênese mitocondrial e sarcopenia

Quanto aos dados referentes as investigações sobre o conteúdo de DNAm<sub>t</sub> também foram realizadas de modo a verificar os efeitos do tratamento com EM sobre a função mitocondrial em tecido muscular esquelético. Os resultados obtidos demonstram que tratamento com EM promoveu aumento do número de cópias de DNA mitocondrial (**Figura 12A**) bem como da expressão gênica de *Nrf1*, *Nrf2*, *mtTFaA*, *Pgc1a*, *Sirt1*, *Ampka2* e *UCP3* (**Figura 12B**), indicando estímulo de biogênese mitocondrial no grupo CT+EM em relação aos demais grupos, principalmente quando se compara CT+EM ao grupo CT. Os dados numéricos de expressão dos respectivos genes descritos bem como os valores de p real podem ser conferidos nas **TABELAS 5 e 6**.



**FIGURA 12: Dados da avaliação do conteúdo de DNA mitocondrial e avaliação da expressão gênica em tecido muscular (gastrocnêmio). A) Níveis de DNAm<sub>t</sub>; B) Expressão de genes envolvidos na biogênese mitocondrial. Os valores significativos foram de  $p < 0,0001$  (dados estatisticamente significativos obtidos através do teste One-way ANOVA).**

**TABELA 5: Dados da avaliação do conteúdo de DNA mitocondrial**

Gene	CTJ	CT	CT+EM	Valor p
COX1	0,02±0,15	2,05±0,11	-1,23±0,12	p 0,0003

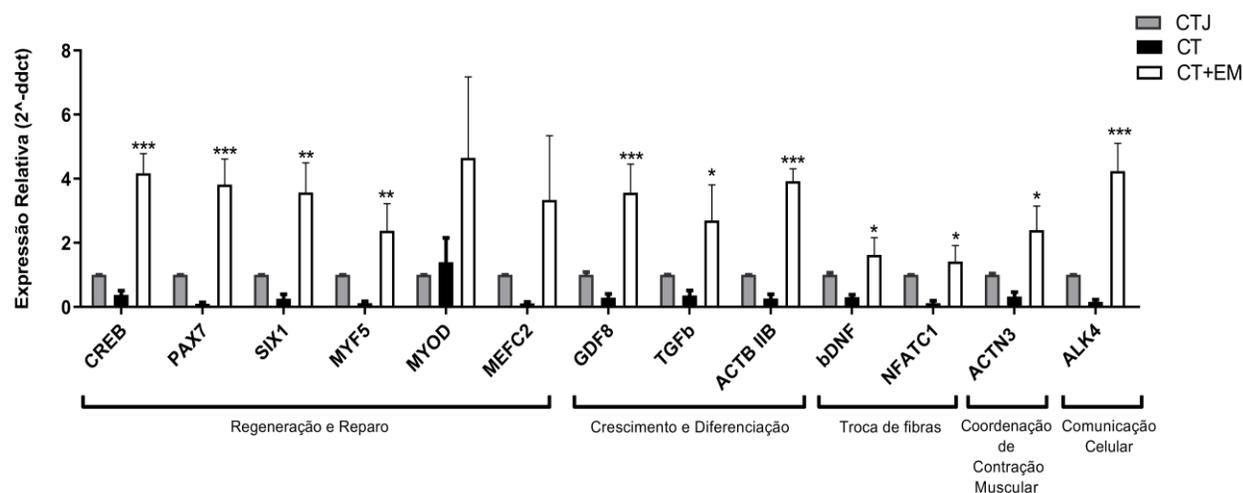
Os valores representam a média da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta ct}$ ) e o erro padrão dos grupos avaliados, e o valor de p obtidos através do teste One-way ANOVA.

**TABELA 6:** Dados da expressão gênica da avaliação da Biogênese Mitocondrial

Gene	CTJ	CT	CT+EM	Valor p
<b>NRF1</b>	21,46±0,48	22,60±0,01	19,52±0,65	p 0,0002
<b>NRF2</b>	27,11±0,35	26,45±0,01	17,22±0,82	p 0,00001
<b>mtTFA</b>	25,42±0,83	24,63±0,07	17,71±0,38	p < 0,00001
<b>PGC1a</b>	21,13±0,90	20,80±0,63	15,86±0,95	p < 0,00001
<b>Sirt1</b>	26,35±0,87	25,67±0,55	20,77±1,14	p < 0,00001
<b>AMPK2</b>	21,74±0,67	22,63±0,32	13,23±1,30	p < 0,00001
<b>UCP3</b>	23,99±0,91	23,10±1,08	14,87±1,62	p < 0,00001

Os valores representam a média da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) e o erro padrão dos grupos avaliados, e o valor de p obtidos através do teste One-way ANOVA.

A fim de avaliar o efeito da EM sobre os mecanismos de reparo de danos musculares causados pela sarcopenia no processo de envelhecimento, pode se verificar que a EM tem um efeito positivo, ao se observar o aumento expressão de genes responsáveis pela regeneração e reparo de danos musculares como *Creb*, *Pax7*, *Six1*, *Myf5*, ao observar o gráfico pode-se observar uma tendência no aumento de expressão de *MyoD* e *Mef2C*, que também fazem parte da via de reparo, porém não foram estatisticamente significativos, também houve aumento de expressão genes que influenciam no crescimento e diferenciação através da ativação da quinase, como *GDF8*, *TGF $\beta$* , *ActRIIB*, gene envolvido na coordenação de contração de miofibras *ACTN3*, e de genes que podem estar envolvidos na troca de fibras *bDNF* e *NFATc1*, também foi observado o aumento de expressão do *ALK4* gene envolvido nos mecanismos de comunicação celular, nos grupos tratados com EM (CT+EM) quando comparados ao grupo da mesma idade (CT) (**Figura 13**), indicando que a EM auxilia na regeneração do tecido muscular esquelético através da ativação de genes importantes na sinalização de reparo. Os dados numéricos de expressão dos respectivos genes descritos bem como os valores de p real podem ser conferidos na **TABELA 7**.



**FIGURA 13: Dados da avaliação de expressão gênica** dos genes envolvidos na sarcopenia em tecido muscular (gastrocnêmio), em que os valores de p foram de  $p < 0,05$  e  $p < 0,0001$  (dados estatisticamente significativos obtidos através do teste One-way ANOVA).

**TABELA 7: Dados da expressão gênica da avaliação de Sarcopenia**

Gene	CTJ	CT	CT+EM	Valor p
<b>CREB</b>	0,0004±0,0003	0,37±0,12	4,16±0,61	p < 0,00001
<b>PAX7</b>	9,73±0,00011	0,09±0,04	3,81±0,80	p 0,0001
<b>SIX1</b>	0,01±0,004	0,25±0,14	3,57±0,92	p 0,0011
<b>MYF5</b>	2,58±0,002	0,11±0,05	2,37±0,85	p 0,0096
<b>MYOD</b>	8,18±5,25	1,39±0,76	4,65±2,52	p 0,1824
<b>MEFC2</b>	0,004±0,01	0,107±0,04	3,33±2,0	p 0,1085
<b>GDF8</b>	0,009±0,08	0,29±0,12	3,56±0,88	p 0,0009
<b>TGFb</b>	0,0006±0,01	0,35±0,16	2,69±1,11	p 0,0153
<b>ACTR IIB</b>	0,001±0,0006	0,26±0,13	3,92±0,38	p < 0,00001
<b>bDNF</b>	0,00015±0,06	0,30±0,07	1,62±0,53	p 0,0187
<b>NFATC1</b>	0,0003±0,0001	0,11±0,07	1,41±0,5	p 0,0104
<b>ACTN3</b>	0,11±0,04	0,32±0,14	2,39±0,75	p 0,0179
<b>ALK4</b>	0,004±0,003	0,26±0,13	4,23±0,86	p 0,0002

Os valores representam a média da expressão relativa ( $2^{-ddct}$ ) e o erro padrão dos grupos avaliados, e o valor de p obtidos através do teste One-way ANOVA.

## 5. DISCUSSÃO

Os compostos naturais, como os polifenóis têm sido explorados para auxiliar no controle dos processos envolvidos pela sarcopenia, esses compostos têm chamado atenção por suas propriedades biológicas na modulação desse evento. Devido ao seu consagrado potencial antioxidante largamente reportado na literatura, diversos estudos mostraram seu potencial terapêutico na modulação do stress oxidativo envolvido no processo da sarcopenia (ROBINSON; SHALIT, 1964; DAMIANO et al., 2019; CESARE et al., 2020; GANAPATHY; NIEVES, 2020).

Diversas atividades biológicas têm sido atribuídas a erva mate, principalmente por conta de seu alto teor de polifenóis, como o ácido clorogênico que é seu o principal polifenol, metilxantinas, saponinas, taninos, e tem atribuído a ela as propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladoras, além de benefícios ao músculo esquelético, através da melhora da atividade mitocondrial (MIRANDA et al., 2008; GOSMANN et al., 2012; ARÇARI et al., 2013a, 2013b; DOS SANTOS et al., 2018<sup>a</sup>).

Ao avaliar o conteúdo de DNAm de modo a verificar os efeitos do tratamento com EM sobre a função mitocondrial em tecido muscular esquelético, os dados obtidos no neste estudo demonstraram que o tratamento com EM promoveu um aumento do número de cópias conteúdo de DNAm, e modulou a expressão gênica de marcadores envolvidos no metabolismo energético mitocondrial como *Ampka2*, *mtTFA*, *Nrf1* e *Ucp3*, assim como visto em estudos anteriores realizados por nosso grupo com estudos de obesidade, onde essa mesma atividade foi investigada em tecido muscular e tecido adiposo marrom (DOS SANTOS et al., 2018). No processo de envelhecimento tem sido demonstrando que a perda muscular pode se dar tanto pelos componentes neurais como também pela disfunção mitocondrial, porém a saúde mitocondrial é apontada como chave central para dar início e perpetuar a sinalização de sarcopenia. Acredita-se que a disfunção mitocondrial promove o aumento da abertura do poro de transição das mitocôndrias e dá início a sinalização apoptótica em neurônios motores e células musculares, porém no processo de envelhecimento isso não é corrigido porque há uma inibição de mitofagia. Os conteúdos celulares próximos ao local das mitocôndrias disfuncionais são removidos através da ativação proteossômica, esse desequilíbrio celular aumenta proporcionalmente com o acúmulo de mitocôndrias disfuncionais. Embora o envelhecimento induza a disfunção mitocondrial, acredita-se que o acúmulo de EROS, ou de danos de DNAm, possa dificultar a comunicação de neurônios

musculares e motores, levando a indução da morte de ambos (ALWAY; MOHAMED; MYERS, 2017).

A perda de massa muscular na sarcopenia induzida pela disfunção mitocondrial é mediada pela incapacidade da mitocôndria em gerar ATP suficiente, através da fosforilação oxidativa (OXPHOS), em resposta às demandas energéticas que são prejudicadas com o avanço da idade (BRAND; NICHOLLS, 2011; DAVINELLI et al., 2013). Estudos têm sido direcionados a fim de observar mecanismos compensatórios que induzem a produção de energia pelas mitocôndrias, mesmo sob condições de estresse mitocondrial. Dentre esses mecanismos se destaca o processo de biogênese mitocondrial. *PGC-1 $\alpha$* , *Sirts* e *AMPK* se destacam entre as vias descritas que podem estar relacionadas à biogênese mitocondrial indicando que pode haver uma adaptação compensatória aos déficits energéticos em desequilíbrios mitocondriais (VALERO, 2014).

Dentro do contexto do envelhecimento, a biogênese mitocondrial tem um papel fundamental para manter a saúde dos músculos e das mitocôndrias. Há indícios de que o acúmulo de danos oxidativos no DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) durante o envelhecimento natural é um fator de risco para o desenvolvimento de distúrbios neurodegenerativos associados à idade (JEPPESEN; BOHR; STEVNSNER, 2011). É estimado que a frequência de mutações pontuais no DNAm<sub>t</sub> aumenta cerca de 5 vezes durante uma vida útil de 80 anos, indicando que a senescência é responsável por promover profundas modificações metabólicas e bioenergéticas (QUIJANO et al., 2012; KENNEDY et al., 2013; KUDRYAVTSEVA et al., 2016). Portanto, a remoção de mitocôndrias disfuncionais por meio de mecanismos como a mitofagia, é fundamental para a sobrevivência e saúde celular, sobretudo para as células do sistema nervoso, uma vez que estas são particularmente susceptíveis aos desequilíbrios decorrentes do envelhecimento (EVANS, 2002; BAKULA; SCHEIBYE-KNUDSEN, 2020). As principais características do envelhecimento são caracterizadas pela existência de eventos moleculares que se desregulam com o avanço da idade, e estão diretamente associados à fenótipos característicos do envelhecimento celular. Isso significa que o bom funcionamento desses eventos é fundamental para a viabilidade da célula e a disfunção que ocorre com a idade leva a danos celulares. A disfunção mitocondrial interage com cada uma das nove marcas do envelhecimento, contribuindo assim para à progressão do processo de envelhecimento. Nesse sentido a disfunção mitocondrial e a instabilidade genômica tem um encontro direto através da mutação dos genes DNAm<sub>t</sub>. Essas suas mutações em sua maioria são 10 vezes maiores do que no DNA nuclear, que podem

acarretar várias consequências relacionadas ao envelhecimento, como por exemplo os danos nos neurônios, levando ao aumento do risco de doenças neurodegenerativas, como a DA (WANG et al., 2005). Os danos que levam ao encurtamento dos telômeros, são causados por danos no DNA devido a produção de EROS, como resultado da disfunção mitocondrial, as mitocôndrias podem contribuir diretamente para uma aceleração do curto-circuito dos telômeros (LIU et al., 2002). Outro papel associado a disfunção mitocondrial, são as alterações epigenéticas durante o envelhecimento, o aumento da produção de EROs culmina em alterações no metiloma, levando a indução de aspectos do processo de envelhecimento epigenético (KIETZMANN et al., 2017). Evidências apontam que tanto a proteostase mitocondrial quanto a citosólica, que podem ter uma ligação via equilíbrio translacional mitocitosólico, e são importantes para um envelhecimento saudável (MOLENAARS et al., 2020). Sabe-se que existe uma associação entre a disfunção mitocondrial e a detecção de nutrientes, em resposta à diminuição de energia a biogênese mitocondrial regula o metabolismo energético intracelular. A *AMPK* é um dos reguladores da biogênese mitocondrial, a sua ativação induz o início da mitofagia (EGAN et al., 2011; LAKER et al., 2017). Estudos indicam que atividades defeituosas do OXPHOS levam à senescência celular, compreendendo assim que a função mitocondrial também desempenha um papel na senescência celular (LEE et al., 2007). Foi visto em camundongos que a disfunção mitocondrial também pode causar a exaustão de células tronco, pois a produção de EROs aumentada em células-tronco reduz a renovação das células-tronco, que foi revertida pelo tratamento com antioxidantes (JANG; SHARKIS, 2007). Um outro papel importante desempenhado pelas mitocôndrias é na comunicação intercelular alterada. Em situação de estímulos inflamatórios, as células secretam sinais para desencadear uma resposta imune. São sinais perigosos os padrões moleculares associados a danos liberados pelas células em situação de estresse, apoptose ou necrose, pois as mitocôndrias também secretam padrões moleculares associados a danos que inclui moléculas como ATP, DNAm e ROS (MCGUIRE, 2019).

Dados da literatura referentes ao potencial antienvelhecimento da erva mate ainda são escassos, no entanto trabalhos utilizando-se de polifenóis no contexto do envelhecimento, muitos dos quais podem ser encontrados na EM podem explicar os benefícios constatados em nosso estudo. Nesse sentido, os polifenóis têm sido repostados por apresentarem benefícios na modulação da função mitocondrial, estudos apontam para as habilidades positivas de compostos como o resveratrol, no estímulo de mecanismos envolvidos na mitofagia, favorecendo o controle

de qualidade e depuração das mitocôndrias, nesse sentido, é demonstrado que polifenóis como o resveratrol tem a capacidade de induzir a expressão de *PGC-1 $\alpha$*  e do fator de transcrição mitocondrial A (*mtTFA*), estimular a biogênese mitocondrial, além de aumentar a expressão de proteínas envolvidas no controle da fissão/fusão mitocondrial, preservando assim a homeostase mitocondrial (PENG et al., 2016; AUTHOR; FERRARA; JOKSIMOVIC, 2021). Esses compostos polifenólicos também possuem habilidades antioxidantes, conferindo a estas moléculas um papel biológico muito importante, uma vez que o estresse oxidativo é considerado um dos principais mediadores de danos mitocondriais e comprometimento da mitofagia que ocorre durante o envelhecimento (FIVENSON et al., 2017). A eliminação eficiente de organelas não funcionais e proteínas agregadas é, portanto, fundamental para evitar o aumento do estresse e degeneração celular. A ação protetora de antioxidantes, sequestradores de EROs e estimuladores da mitofagia parecem ser o mecanismo central para a longevidade e redução do risco de doenças degenerativas (ZOLE; RANKA, 2018; BAKULA; SCHEIBYE-KNUDSEN, 2020). Em uma avaliação sobre os efeitos diretos da epicatequina e procianidina B2 nas funções mitocondriais, foi sugerido que os efeitos benéficos da epicatequina e seus derivados podem ser devidos à modulação direta das funções mitocondriais, pois os resultados demonstraram o desacoplamento da oxidação da fosforilação, a estimulação da fosforilação em concentrações mais baixas e a inibição da cadeia respiratória em concentrações mais altas, bem como a liberação reduzida de epicatequina do citocromo c das mitocôndrias (BERNATONIENE; KOPUSTINSKIENE, 2018). Outra classe de polifenóis encontrados na literatura são os ácidos hidroxibenzóicos, e incluem ácido gálico e ácido elágico. Em um estudo recente, Chang et al. (2021) relataram que os efeitos do ácido gálico melhoraram as funções mitocondriais nos miotubos de células C2C12 favorecendo a ativação da *SIRT-1*, que por sua vez ativa os fatores de transcrição *PGC-1 $\alpha$* , *NRF1* e *mtTFA*, favorecendo a promoção da biogênese mitocondrial. Também foi apontado que o ácido gálico regulou positivamente a biogênese mitocondrial, a fosforilação oxidativa, o conteúdo de cadeia pesada de miosina (MyHC), a autofagia e/ou mitofagia e o índice de fusão e/ou fissão das mitocôndrias em miotubos C2C12 (CHANG et al., 2021). Um outro composto desta classe, é o ácido elágico, que exerce efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, anticancerígenos, hipolipidêmicos e neuroprotetores (RÍOS et al., 2018). Em tecido muscular em ratos contra danos musculares induzidos por CCL4, o tratamento com ácido elágico favoreceu proteção, reduzindo o estresse oxidativo e a inflamação, e regulou negativamente o malondialdeído, *NF- $\kappa$ B*, *TNF- $\alpha$*  e a

*COX-2* e as enzimas antioxidantes reguladas positivamente (catalase e glutatona), juntamente com o *NRF2*, além disso, a supressão do linfoma de células B 2 (*bcl-2*) e a indução da caspase-3 levaram os tecidos danificados à apoptose (ASLAN et al., 2020). Também foi demonstrado que o ácido elegeálico melhora a disfunção muscular em camundongos desmielinizados induzidos por cuprizona, favorecendo a proteção mitocondrial, a prevenção do estresse oxidativo e a superexpressão de *Sirt3* (KHODAEI et al., 2019). Entre os vários ácidos hidroxicinâmicos, o ácido ferúlico (FA), induziu a expressão de RNAm de *Sirt1*, *PGC-1 $\alpha$*  e fator potenciador de miócitos 2C (*Mef2C*), esses efeitos foram mediados através da fosforilação da *AMPK*, seguida pela ativação do *Sirt1*, pois a inibição da *AMPK* ou do *Sirt-1* aboliu os efeitos do AF (CHEN et al., 2019b).

É evidente que a biogênese mitocondrial é um processo importante, visto que as mitocôndrias são grande relevância para a síntese de ATP, e desempenham uma alta demanda energética da maioria das células. A biogênese mitocondrial regulada por um grande número de co-ativadores e fatores de transcrição, o *PGC-1*, uma família composta por três membros *PGC-1 $\alpha$* , *PGC-1 $\beta$*  e *RPC* (coativador relacionado ao *PGC-1*) desempenha um papel regulatório fundamental nesse processo, essa família compartilha características estruturais e modos de ação, bem como a capacidade de regular a biogênese mitocondrial em uma grande variedade de tecidos e estimulam a atividade dos fatores respiratórios nucleares 1 e 2 (*NRF1/2*) e dos receptores nucleares *ERRs* (receptores relacionados ao estrogênio) que são fundamentais fatores envolvidos no controle da biogênese mitocondrial. Além disso, os co-ativadores *pgc-1* regulam a expressão do fator de transcrição mitocondrial (*mtTFA*), que é um fator-chave para regulação da replicação e transcrição do DNA mitocondrial. Em nível pós-translacional a atividade *PGC-1 $\alpha$*  é regulada por fosforilação, metilação e acetilação. A atividade transcricional é modificada de forma significativa pela acetilação reversível de *PGC-1 $\alpha$* , e é controlada principalmente pelo *SIRT1*, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Diversos polifenóis demonstraram a capacidade de ativar *SIRT1 in vitro*, e, portanto, são investigados como potenciais estimuladores de biogênese mitocondrial através da ativação *PGC-1 $\alpha$*  mediada pela desacetilação (FERNANDEZ-MARCOS; AUWERX, 2011; LI et al., 2011; VILLENA, 2015).

Pertencente à família de histonas desacetilases de classe mamífero III, o *Sirt-1* é o membro mais estudado das sirtuinas, e está fortemente associado na vida e longevidade. O *Sirt-1* tem sido atribuído a um papel fundamental no controle metabólico e na biogênese mitocondrial, e parece

ser importante para o volume de negócios de mitocôndrias defeituosas pela mitofagia (TANG, 2016). A fosforilação da proteína *Pgc-1 $\alpha$*  por *Ampk* tem como resultado o aumento da sua estabilidade bem como sua atividade. Através da fosforilação a *Ampk*, melhora a atividade de *Pgc-1 $\alpha$*  e atua indiretamente para melhorar a atividade de *Pgc-1 $\alpha$*  através do *Sirt-1* em resposta aos níveis de NAD + aumentados e a níveis de energia baixa, em períodos de jejum ou exercício físico. Para que a desacetilação pelo *Sirt-1* aconteça a fosforilação de *Pgc-1 $\alpha$*  pela *Ampk* é uma etapa necessária, uma vez que a proteína *Pgc-1 $\alpha$*  não possui sítios de fosforilação para *Ampk*, ela não é desacetilada pelo *Sirt-1*. Desse modo, a fosforilação e acetilação podem funcionar sequencialmente para ativar o *Pgc-1 $\alpha$*  favorecendo o aumento da transcrição dos genes alvo responsáveis pela regulação da função mitocondrial no músculo esquelético (STOHS; BADMAEV, 2016; TANG, 2016; DOS SANTOS et al., 2018a, 2018b).

Os dados obtidos neste trabalho indicam que a EM modulou a expressão de *UCP3*, favorecendo a termogênese, favoreceu a manutenção do peso do tecido muscular, o que auxilia na prevenção de danos causados pela perda de massa muscular pelo processo de envelhecimento. Em estudos já publicados por nosso grupo foi demonstrado que o tratamento com EM favoreceu a termogênese através da ativação de *UCP3* em músculo esquelético e tecido adiposo marrom, culminando na redução de peso em animais obesos, porém ainda não se tem trabalhos relacionando a atividade em envelhecimento (DOS SANTOS et al., 2018a). *UCP1*, *UCP2* e *UCP3* (homólogos da proteína de desacoplamento 1) são capazes de desacoplar a produção de ATP da respiração mitocondrial, favorecendo a dissipação da energia como calor e afeta a eficiência do metabolismo energético. A *UCP1*, desempenha um papel importante na termogênese adaptativa, quanto a *UCP2* e a *UCP3*, elas não têm um papel primário na regulação do metabolismo energético. Sabe-se que a *UCP2*, é expressa em uma ampla variedade de tecidos, incluindo tecido adiposo branco, músculo esquelético e tecidos do sistema imunológico, e é sugerida para afetar a produção de espécies reativas de oxigênio. A *UCP3*, é expressa predominantemente no músculo esquelético e tem sido associada ao metabolismo energético de todo o corpo, porém acredita-se que a principal função da *UCP3* não é a regulação do metabolismo energético. Por exemplo, em situação de jejum, que é uma condição que atenua o gasto energético, a expressão da *UCP3* é regulada positivamente, além disso, os camundongos *knockout UCP3* têm uma taxa metabólica normal, nesse sentido a função exata da *UCP3*, portanto, continua a ser explorada, porém os papéis associados a *UCP3* incluem o envolvimento

na regulação das EROs, no transporte de ácidos graxos mitocondriais e na regulação do metabolismo da glicose no músculo esquelético (SCHRAUWEN; HESSELINK, 2002).

Outro dado interessante encontrado nesse estudo com a suplementação da EM foi o aumento da expressão de *CREB*, *PAX7*, *Six1*, e *Myf5*, esses alvos estão relacionados à modulação mecanismos de reparo e regeneração muscular que podem ser alteradas na sarcopenia devido ao envelhecimento, ocasionando em perdas de funções importantes para a manutenção da qualidade do tecido muscular (CORNELISON; WOLD, 1997; STEWART et al., 2011; NORD; SKALMAN; VON HOFSTEN, 2013; KIM et al., 2017; MANCINELLI et al., 2021b). Em estado quiescente as células musculares adultas expressam *Pax7*, em condições de lesão favorecem a ativação da expressão de *Myf5* e/ou *MyoD*. Após a ativação das células satélites, novamente entram no ciclo celular e se comprometem com a linhagem muscular. Após as etapas de proliferação, os mioblatos passam pela diferenciação e fundem um ao outro para formar novos miofibras ou se fundem as fibras danificadas pré-existentes. Durante o processo de reparação da miofibras, a piscina de células satélites quiescentes é renovada. *MyoD* é apontado com um alvo transcricional direto do gene *Mef2c*, através de um promotor específico do músculo esquelético (CORNELISON; WOLD, 1997; WANG et al., 2001; DODOU; XU; BLACK, 2003; YIN; PRICE; RUDNICKI, 2013). A regeneração do músculo esquelético adulto pode ser promovida pela ativação de células satélites, e novos estudos mostraram que o *Six1* (gene *sine oculis homeobox 1*, um homólogo do gene *Drosophila* *ineoculis* (So), pertence à família dos genes *Six*) é claramente expresso em células satélites ativadas, sugerindo que *Six1* não só desempenha um papel importante na biogênese esquelética embrionária, como também na regeneração muscular adulta (LE GRAND et al., 2012; LIU et al., 2013; NORD; SKALMAN; VON HOFSTEN, 2013). O desenvolvimento do músculo esquelético regulado por *Six1* é o resultado da ativação da miogenina e da expressão de *Myf5* mediados pela ligação aos sítios *MEF3* nos promotores desses genes (SPITZ et al., 1998; GIORDANI et al., 2007). Foi reportado que a ativação da miogenina é mais propícia à ligação do fator de transcrição *Six1* e *Mef2* e depende de um promotor desmetilado (PALACIOS et al., 2010). Além disso, foi demonstrado que o *Six1* favorece a regeneração do músculo adulto, aumentando e mantendo a expressão do *MyoD* nas células satélites musculares adultas (LIU et al., 2013).

Alguns ácidos fenólicos representativos foram relatados por exercer efeitos benéficos nos músculos, favorecendo seu crescimento e evitando danos que cause desperdício, desse modo contribuindo para melhora da qualidade mitocondrial e prevenindo a inflamação e estresse oxidativo (SAIBABU et al., 2015). Foi visto em modelo *in vitro* que o ácido gálico (GA) em combinação com epicatequina (EC) e epigallocatequina (EGC) aumentou a diferenciação muscular ao induzir os fatores reguladores miogênicos: miogenina, *Myf5* e *MyoD* nos miotubos C2C12 (HONG et al., 2020). O ECG e o EGCG podem favorecer a ativação das células-tronco musculares estimulando sua diferenciação, promovendo o aumento da expressão do determinante miogênico (*Myf5*), favorecendo a regeneração muscular. Além disso, o EGCG pode favorecer o retardamento da taxa de degradação de proteínas causada pela atrofia muscular, e levar ao aumento da expressão de fatores anabólicos e promover a área transversal das fibras musculares (LI et al., 2019). A EC, aumentou a regeneração muscular no músculo distrófico muscular de *Becker* regulando positivamente *Myf5*, *MyoD*, miogenina, *Mef2a* e folistatina e regulou negativamente a miostatina além de atuar como bioenergética mitocondrial, promovendo a biogênese mitocondrial através da *PGC1- $\alpha$*  (MCDONALD et al., 2021). Em modelo *in vitro* com células C2C12, o tratamento com EC aumentou o crescimento do miotubo e favoreceu a biogênese mitocondrial, ativando os fatores de transcrição *Nrf2*, *mtTFA* (MORENO-ULLOA et al., 2018). A EC também favoreceu o aumento a diferenciação miogênica através da ativação das vias de sinalização pro-miogênica *p38MAPK* e *Akt*, além disso, aumentou a atividade da *MyoD*, favoreceu a conversão miogênica e diferenciação de fibroblastos (LEE et al., 2017). Pertencente a classe dos flavonóis, as catequinas, induziram fator de transcrição *Myf5* em células satélites via fosforilação *Akt*, e em células C2C12 favoreceu a diferenciação miogênica induzindo os marcadores miogênicos miogenina e creatina quinase muscular para regeneração muscular. E nesse mesmo, que foi realizado utilizando modelo de camundongos, após o tratamento com EGCG, foi relatado o aumento do tamanho da fibra e regeneração muscular (KIM et al., 2017). Em um modelo agudo de dano muscular esquelético agudo que resulta em ruptura da fibra, estresse oxidativo e inflamação, foram investigados as contribuições específicas de células para o processo de regeneração após danos induzidos por contusão em músculo gastrocnêmio de ratos Wistar, que foram tratados com administração crônica de oligômero proantocianidolico, derivado de semente de uva, e foram avaliadas as respostas imunes e das células satélites, bem como a capacidade de absorção de radicais de oxigênio e a regeneração muscular, o tratamento

resultou em uma resposta rápida de células satélites com um pico mais precoce de ativação de Pax7 (MYBURGH; KRUGER; SMITH, 2012). Em um estudo, Qi et al., (2017), descreveu que os polifenóis do chá (TPs), flavonoides vegetais naturais encontrados nas folhas da planta do chá, são capazes de modular a translocação nuclear de *Nrf2* e a via de sinalização *TrkB/CREB/bDNF* provocando a via *PI3K/AKT* e, portanto, regulam transcricionalmente a expressão a jusante de enzimas antioxidantes, incluindo *bDNF* no tecido cerebral de camundongos, sugerindo que os TPs possuem efeitos protetores contra o comprometimento cognitivo desencadeado pelo estresse oxidativo (QI et al., 2017).

É observado que a regulação gênica responsável síntese de músculos em organismos vertebrados é mediada pela ação da família do fator regulador miogênico (*MRF*) fatores determinantes de *MyoD* e *Myf5* que são importantes para os fatores de determinação miogênica e auxiliam no controle do destino da proliferação e diferenciação celular das células derivadas de células precursoras miogênicas (TAPSCOTT, 2005). *CREB* desempenha um papel-chave no processo de diferenciação das células progenitoras do músculo esquelético adulto, e quando ocorre a sinalização de tecidos esqueléticos danificados induz a fosforilação do *CREB*, sinalizando tanto para células precursoras miogênicas quanto para miofibras. Uma hipótese que poderia explicar o resultado não significativo de *MyoD*, seria a interação de alguma outra via. Há indícios de que pode haver uma interação entre *CREB* e *MyoD* pela interferência em sua dimerização que pode ser induzida por sua transativação (CHEN; GINTY; FAN, 2004; KIM; XIONG; MEI, 2005; STEWART et al., 2011). As proteínas *Mef2* são reportadas como reguladores essenciais da transcrição específica do músculo esquelético e contribuem para a diferenciação miogênica 1 (*MyoD1*) e a outros fatores miogênicos, esses fatores de transcrição são fundamentais para a diferenciação, adaptação e regeneração (PIASECKA et al., 2021).

No tratamento com EM também pode-se observar o aumento de expressão de genes pertencentes a família de ligantes *TGF- $\beta$* , *ALK-4*, *GDF-8*, e *ActRIIB*. O *GDF8*, pertencente à família de ligantes *TGF- $\beta$*  é apontado como um regulador negativo do crescimento muscular esquelético, pois foi visto que a inibição da miostatina pode melhorar o crescimento muscular esquelético. A via de sinalização *TGF- $\beta$* , uma superfamília fator de crescimento transformador, desempenha um papel integral na manutenção da homeostase muscular esquelética. Esses ligantes podem sinalizar através do receptor de ativação tipo IIB (*ActRIIB*), que combina com os

receptores tipo I activin-like quinase 4 (*ALK4*) ou *ALK5* para ativar sinalização de Smad2/3 e inibir o crescimento muscular. O *ActRIIB-Fc* (proteína de fusão homodimerica) foi anteriormente mostrada para sequestrar ligantes superfamílias *TGF-β* para reduzir a ativação do Smad2 e 3 e aumentar a massa muscular (LI et al., 2021; SEMBA et al., 2019). Em um estudo realizado em pacientes críticos de UTI, Grunow et al., (2022), acredita que provavelmente a miostatina não é um dos principais impulsionadores da fraqueza muscular, atrofia muscular, resistência à insulina ou alterações eletrofisiológicas, que foram observadas durante a doença crítica. A inibição terapêutica da miostatina para melhorar a qualidade muscular a fim de prevenir ou tratar a fraqueza muscular, atrofia muscular ou resistência à insulina durante a doença crítica não parece ter uma lógica fisiopatológica robusta (GRUNOW et al., 2022). O Magnolol é outro composto importante na classe lignana, e faz parte dos polifenóis, que é extraído de *Magnolia officinalis* (LIN et al., 2021). Em um estudo realizado em camundongos sarcopênicos induzidos por cisplatina, foi visto que o Magnolol atenuou significativamente o peso corporal e a perda de peso muscular, o diâmetro do músculo foi melhorado pelo tratamento com magnolol, além disso, aumentou a expressão do fator de crescimento semelhante à insulina (*IGF-1*), levando ao aumento dos macrófagos M2c, que são descritos por estimularem a formação de miotubos expressando altos níveis de *IGF-1* e citocinas anti-inflamatórias, como *IL-10* e *TGF-β* (LEE et al., 2020). Em modelo *in vitro*, o tratamento com magnolol atenuou a atrofia do miotubo nos miotubos caquéticos C2C12, promovendo a síntese proteica e diminuindo a degradação proteica mediada pela ubiquitina-ligase, nesse sentido a expressão de miostatina e a fosforilação de *SMAD2/3* foram diminuídas, enquanto a fosforilação de Foxo3a, além disso, a expressão de *MyHC*, *MyoG* e *MyoD* foi regulada positivamente pela ativação da via regulada por *Akt/mTOR* (GE et al., 2020).

A EM promoveu o aumento da expressão de *bDNF*, *ACTN3* e *NFATc1*, favorecendo o aumento de força muscular, como também pode ser observado através do conforme através do teste de força. Sabe-se que a sarcopenia se configura pela redução da força muscular como resultado da perda de massa muscular durante o processo de envelhecimento, que culmina na dificuldade de marcha, incapacidade de realizar as atividades diárias, predis põe o individuo a depressão e risco de morte (CRUZ-JENTOFT et al., 2010; LARSSON et al., 2019c). Entre os vários ácidos hidroxicinâmicos, o ácido ferúlico (FA), o ácido clorogênico e o ácido cafeico têm efeitos positivos no músculo (CHEN et al., 2019c). Um trabalho recente realizado em modelo

animal apontou que fator neurotrófico derivado do cérebro (*bDNF*) e membro da família mioquina, pode ter influencia na diferenciação, plasticidade e sobrevivência dos neurônios centrais, e de modo semelhante pode afetar o desenvolvimento do sistema neuromuscular. A exclusão do *bDNF* pode promover a redução do volume da placa final do motor sempre judicar a integridade da junção neuromuscular. Desse modo acredita-se que as alterações causadas por essa exclusão podem estar associadas a uma lentidão na função muscular, aumentando a resistência à fadiga induzida pela contração. Já na superexpressão de *bDNF* favorece um rápido programa genético do tipo músculo, elevando o número de fibras glicolíticas (DELEZIE et al., 2019). *ACTN3* (alpha-actina 3), um gene de função estrutural, forma uma parte integrante da linha Z do sarcômero em fibras de contração rápida e ajuda na coordenação de contrações de miofibras (PRATT et al., 2019). A regulação de *NFATc1* é essencial na expressão gênica específica do tipo de fibra e da troca de fibras em resposta ao exercício e estabelecem o *NFATc1* como um inibidor da expressão de *MyoD*, um estudo apontou que a transativação dependente de *MyoD* foi fortemente reprimida pelo *NFATc1*, mas não por outros fatores de transcrição da mesma família, sugerindo um papel específico para *NFATc1* na inibição da transativação de *MyoD* (EHLERS; CELONA; BLACK, 2014). Em estudos realizados em atletas pode se observar que o tratamento com reveratrol sugerem reduzir a dor muscular, aumentar o desempenho do exercício e diminuir os indicadores de danos musculares causados pelo exercício pliométrico, que é um método de treinamento eficaz para aumentar a massa muscular e a força, nesse sentido em condições excessivas ou inadequadas podem causar danos musculares induzidos pelo exercício. Portanto, exercícios pliométricos combinados com suplementação adequada de resveratrol podem ser um candidato eficaz para controlar os danos musculares, melhorar a adaptação física e recuperar a capacidade anaeróbica (HUANG et al., 2021). Foi visto em camundongos caquéticos que a curcumina e o resveratrol provocaram efeitos benéficos nos fenótipos musculares dos membros de contração rápida e lenta através da ativação da sirtuína-1, atenuação das vias de sinalização da atrofia e proteólise em camundongos caquéticos com câncer (PENEDO-VÁZQUEZ et al., 2021). O resveratrol impediu a perda de massa e atrofia de fibras em um modelo de atrofia muscular induzida por denervação, suprimindo o acúmulo das ubiquitina ligases atrogin-1 e p62 nas fibras musculares, a p62/SQSTM1 é um marcador do defeito funcional que sinaliza a autofagia-lisossomo, e é regulado positivamente durante a atrofia (NIKAWA; ULLA; SAKAKIBARA, 2021). Já em ratos idosos, que foram suspensos nos

membros posteriores, o tratamento com resveratrol não impediu a perda de peso corporal ou muscular; no entanto, induziu alterações favoráveis na área transversal reduzida das fibras musculares tipo IIA e IIB e atenuou a sinalização apoptótica durante a recarga seguida de descarga (BENNETT; MOHAMED; ALWAY, 2013). Desse modo, acredita-se que pode ser modestamente benéfico para pacientes com sarcopenia, nos quais as fibras do tipo II são preferencialmente atrofiada, e além disso em outro modelo de atrofia muscular em desuso, o resveratrol preservou a massa muscular sóleo, a contração máxima da força e a capacidade mitocondrial e aumentou o teor de proteína de *Sirt-1* e *COX-IV* no músculo sóleo, com supressão do estresse oxidativo (MOMKEN et al., 2011).

Com os dados obtidos neste estudo, pode-se observar que a disfunção mitocondrial favorece a atrofia muscular e através das interações com os marcadores do envelhecimento como já mencionados neste trabalho, como as alterações epigenéticas, que favorecem o aumento da produção de EROS, redução da biogênese mitocondrial pela disfunção na detecção de nutrientes, atividades defeituosas na OXPHOS como resultado da senescência, bem como aumento na resposta inflamatória devido a alteração na comunicação celular, que favorecem as alterações moleculares culminando na degradação do tecido muscular, através da ineficiência dos mecanismos de reparo muscular, e a perda drástica de força. Nesse sentido, o tratamento com EM, promoveu a biogênese mitocondrial, favorecendo os mecanismos de crescimento, reparo e força muscular através da modulação de alvos moleculares importantes neste processo, se mostrando uma estratégia promissora como estratégia antienvelhecimento e favorecendo a prevenção da sarcopenia.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos pode se observar que o tratamento com Erva Mate:

- ✚ Favoreceu a manutenção do peso corporal;
- ✚ Promoveu melhorias na composição corporal através da redução dos depósitos de gordura;
- ✚ Promoveu o aumento de força muscular avaliado pelo *Rope Grip Test*;
- ✚ Promoveu a Biogênese Mitocondrial através ao aumento da expressão de DNAm, e de genes como *NRF1*, *NRF2*, *mtTFA*; *Sirt 1*; *Ampk2* e *UCP3* no músculo esquelético;
- ✚ Promove a ativação de mecanismos de reparo e regeneração mediados pelo aumento da expressão de *CREB*, *PAX7*, *SIX1*, *Myf5* no músculo esquelético;
- ✚ Promove a ativação de mecanismos de crescimento e diferenciação mediados pelo aumento da expressão de *GDF8*, *TGFb*, *ACTR IIB* no músculo esquelético;
- ✚ Ativa mecanismos de troca de fibras mediados pelo aumento da expressão de *bDNF* e *NFATC1*;
- ✚ Induz a ativação de mecanismos de contração muscular mediado por *ACTN3* e pelo mecanismo de comunicação celular mediado por *ALK4*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASE-REMEDIOS, M. E.; COLL-LLADÓ, C.; FERRIER, D. E. K. More Than One-to-Four via 2R: Evidence of an Independent Amphioxus Expansion and Two-Gene Ancestral Vertebrate State for MyoD-Related Myogenic Regulatory Factors (MRFs). **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 10, p. 2966, 1 out. 2020.

AGUILANIU, H. et al. Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. **Science**, v. 299, n. 5613, p. 1751–1753, 14 mar. 2003.

ALNAQEEB, M. A.; ZAID, N. S. AL; GOLDSPIK, G. Connective tissue changes and physical properties of developing and ageing skeletal muscle. **Journal of Anatomy**, v. 139, n. Pt 4, p. 677, dez. 1984.

ALWAY, S. E.; MOHAMED, J. S.; MYERS, M. J. Mitochondria Initiate and Regulate Sarcopenia. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 45, n. 2, p. 58, 2017.

AMORIM, J. A. et al. Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 18, n. 4, p. 243, 1 abr. 2022.

ARÇARI, D. P. et al. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 17, n. 12, p. 2127–2133, dez. 2009.

ARÇARI, D. P. et al. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 335, n. 2, p. 110–115, 30 mar. 2011.

ARÇARI, D. P. et al. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. **Food chemistry**, v. 141, n. 2, p. 809–815, 2013a, b.

ARTANDL, S. E. et al. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. **Nature**, v. 406, n. 6796, p. 641–645, 10 ago. 2000.

ASLAN, A. et al. The effect of ellagic acid on caspase-3/bcl-2/Nrf-2/NF-kB/TNF- $\alpha$  /COX-2 gene expression product apoptosis pathway: a new approach for muscle damage therapy. **Molecular biology reports**, v. 47, n. 4, p. 2573–2582, 1 abr. 2020.

AUNAN, J. R. et al. Molecular and biological hallmarks of ageing. **British Journal of Surgery**, v. 103, n. 2, p. e29–e46, 1 jan. 2016.

AUTHOR, C.; FERRARA, L.; JOKSIMOVIC, M. Modulation of mitochondrial biogenesis: action of physical activity and phytochemicals. **Journal of Physical Education and Sport @ (JPES)**, v. 21, n. 1, p. 425–433, 2021.

BAI, P. et al. PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. **Cell metabolism**, v. 13, n. 4, p. 461, 4 abr. 2011.

BAKULA, D.; SCHEIBYE-KNUDSEN, M. MitophAging: Mitophagy in Aging and Disease. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 8, 15 abr. 2020.

BANO, G. et al. Inflammation and sarcopenia: A systematic review and meta-analysis. **Maturitas**, v. 96, p. 10–15, 1 fev. 2017.

BASISTY, N.; MEYER, J. G.; SCHILLING, B. Protein Turnover in Aging and Longevity. **Proteomics**, v. 18, n. 5–6, p. 1700108, 1 mar. 2018.

BAUMGARTNER, R. N. et al. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. **American journal of epidemiology**, v. 147, n. 8, p. 755–763, 15 abr. 1998.

BENNETT, B. T.; MOHAMED, J. S.; ALWAY, S. E. Effects of Resveratrol on the Recovery of Muscle Mass Following Disuse in the Plantaris Muscle of Aged Rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 83518, 12 dez. 2013.

BEN-PORATH, I.; WEINBERG, R. A. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 1, p. 8, 1 jan. 2004.

BEN-PORATH, I.; WEINBERG, R. A. The signals and pathways activating cellular senescence. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 5, p. 961–976, 2005.

BERNATONIENE, J.; KOPUSTINSKIENE, D. M. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. **Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 23, n. 4, 2018.

BLASCO, M. A. et al. Telomere Shortening and Tumor Formation by Mouse Cells Lacking Telomerase RNA. **Cell**, v. 91, n. 1, p. 25–34, 3 out. 1997.

BLIN, P. et al. Parkinson's disease incidence and prevalence assessment in France using the national healthcare insurance database. **European journal of neurology**, v. 22, n. 3, p. 464–471, 1 mar. 2015.

- BODINE, S. C. et al. Spatial distribution of motor unit fibers in the cat soleus and tibialis anterior muscles: Local interactions. **Journal of Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 2142–2152, 1988.
- BOTTAZZI, B.; RIBOLI, E.; MANTOVANI, A. Aging, inflammation and cancer. **Seminars in immunology**, v. 40, p. 74–82, 1 dez. 2018.
- BRACESCO, N. et al. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)**, v. 9, n. 3, p. 379–387, 2003.
- BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378–384, 14 jul. 2011.
- BRACK, A. S.; MUÑOZ-CÁNOVES, P. The ins and outs of muscle stem cell aging. **Skeletal Muscle**, v. 6, n. 1, 18 jan. 2016.
- BRAND, M. D.; NICHOLLS, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **Biochemical Journal**, v. 435, n. Pt 2, p. 297, 4 abr. 2011.
- BRUNET, A. et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5666, p. 2011–2015, 26 mar. 2004.
- CALADO, R. T.; YOUNG, N. S. Telomere Diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 24, p. 2353, 12 dez. 2009.
- CANTÓ, C.; AUWERX, J. PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. **Current opinion in lipidology**, v. 20, n. 2, p. 98, abr. 2009.
- CARRETTA, B. B. et al. Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste Universidade Federal do Ceará. Compreendendo O Significado Do Ser Idoso Vivenciando Sua Autonomia Na Hospitalização. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**. v. 14, n. 2, p. 331–340, 2013.
- CESARE, M. M. et al. Antioxidants in Sport Sarcopenia. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 1–20, 1 set. 2020.

CHAN, M. **Resumo - Relatório Mundial de Envelhecimento e Saúde**. Genebra: [s.n.]. Disponível em: <[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186468/WHO\\_FWC\\_ALC\\_15.01\\_por.pdf;jsessionid=4BC2CE3BB470B60D5D6CF648D1D286BD?sequence=6](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186468/WHO_FWC_ALC_15.01_por.pdf;jsessionid=4BC2CE3BB470B60D5D6CF648D1D286BD?sequence=6)>. Acesso em: 26 out. 2022.

CHANDRA, S.; DE MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3583–3589, 2 jun. 2004.

CHANG, A. Y. et al. Measuring population ageing: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet Public Health**, v. 4, n. 3, p. e159–e167, 1 mar. 2019.

CHANG, W. T. et al. Rutin and Gallic Acid Regulates Mitochondrial Functions via the SIRT1 Pathway in C2C12 Myotubes. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 1–16, 1 fev. 2021.

CHEN, A. E.; GINTY, D. D.; FAN, C. M. Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. **Nature**, v. 433, n. 7023, p. 317–322, 28 nov. 2004.

CHEN, W. et al. Modified behavioural tests to detect white matter injury- induced motor deficits after intracerebral haemorrhage in mice. **Scientific**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 18 nov. 2019a, b, c.

CIEZA, A. et al. Global estimates of the need for rehabilitation based on the Global Burden of Disease study 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **Lancet (London, England)**, v. 396, n. 10267, p. 2006, 12 dez. 2020.

CLAUDIA, M. et al. European Working Group on Sarcopenia in Older People 2010 (EWGSOP1) and 2019 (EWGSOP2) criteria or slowness: which is the best predictor of mortality risk in older adults? **Age and Ageing**, v. 51, n. 7, p. 1–10, 1 jul. 2022.

COLLA, S. et al. Telomere dysfunction drives aberrant hematopoietic differentiation and Myelodysplastic Syndrome. **Cancer cell**, v. 27, n. 5, p. 644, 5 maio 2015.

COPPÉ, J. P. et al. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. **Annual review of pathology**, v. 5, p. 99, 2 fev. 2010a, b.

CORNELISON, D. D. W.; WOLD, B. J. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. **Developmental biology**, v. 191, n. 2, p. 270–283, 15 nov. 1997.

COSTANTINO, S.; PANENI, F.; COSENTINO, F. Ageing, metabolism and cardiovascular disease. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 8, p. 2061, 4 abr. 2016.

CRUZ-JENTOFT, A. J. et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. **Age and Ageing**, v. 39, n. 4, p. 412, 13 abr. 2010.

CRUZ-JENTOFT, A. J. et al. Prevalence of and interventions for sarcopenia in ageing adults: a systematic review. Report of the International Sarcopenia Initiative (EWGSOP and IWGS). **Age and Ageing**, v. 43, n. 6, p. 748, 1 nov. 2014.

CRUZ-JENTOFT, A. J. et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis European Working Group On Sarcopenia In Older People 2 (Ewgsop2), And The Extended Group For Ewgsop2. **Age and Ageing**, v. 48, p. 16–31, 2019.

DALLE, S.; ROSSMEISLOVA, L.; KOPPO, K. The Role of Inflammation in Age-Related Sarcopenia. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. DEC, 12 dez. 2017.

DAMIANO, S. et al. Dual Role of Reactive Oxygen Species in Muscle Function: Can Antioxidant Dietary Supplements Counteract Age-Related Sarcopenia? **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 15, 1 ago. 2019.

DAVINELLI, S. et al. Enhancement of mitochondrial biogenesis with polyphenols: Combined effects of resveratrol and equol in human endothelial cells. **Immunity and Ageing**, v. 10, n. 1, p. 1–5, 11 jul. 2013.

DE MENDONÇA, J. M. B. et al. O sentido do envelhecer para o idoso dependente. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 26, n. 1, p. 57–65, 25 jan. 2021.

DELEZIE, J. et al. BDNF is a mediator of glycolytic fiber-type specification in mouse skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 32, p. 16111–16120, 6 ago. 2019.

DESCHENES, M. R. Effects of aging on muscle fibre type and size. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 34, n. 12, p. 809–824, 2004.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Aging and anti-aging: a Combo-Endocrinology overview. **European Journal of Endocrinology**, v. 176, n. 6, p. R283–R308, 1 jun. 2017.

DIKIC, I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 193–224, 20 jun. 2017.

DODOU, E.; XU, S. M.; BLACK, B. L. mef2c is activated directly by myogenic basic helix-loop-helix proteins during skeletal muscle development in vivo. **Mechanisms of development**, v. 120, n. 9, p. 1021–1032, 2003.

DOS SANTOS, T. W. et al. Yerba Mate Stimulates Mitochondrial Biogenesis and Thermogenesis in High-Fat-Diet-Induced Obese Mice. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 62, n. 15, 1 ago. 2018a, b.

DUNCAN, G. W. et al. The incidence of Parkinson's disease in the North-East of England. **Age and ageing**, v. 43, n. 2, p. 257–263, mar. 2014.

EGAN, D. F. et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. **Science (New York, N.Y.)**, v. 331, n. 6016, p. 456, 1 jan. 2011.

EHLERS, M. L.; CELONA, B.; BLACK, B. L. NFATc1 controls skeletal muscle fiber type and is a negative regulator of MyoD activity. **Cell reports**, v. 8, n. 6, p. 1639, 25 set. 2014.

EVANS, W. J. Effects of exercise on senescent muscle. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 403, n. SUPPL., 1 out. 2002.

FERNANDEZ-MARCOS, P. J.; AUWERX, J. Regulation of PGC-1 $\alpha$ , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 4, p. 884S, 1 abr. 2011.

FILIP, R. et al. Phenolic compounds in seven South American Ilex species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774–778, 2001.

FIVENSON, E. M. et al. Mitophagy in neurodegeneration and aging. **Neurochemistry international**, v. 109, p. 202–209, 1 out. 2017.

FLUCK, M. et al. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function BT - Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 146, p. 159–216, 2003.

FRAGA, M. F. et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 30, p. 10604–10609, 26 jul. 2005.

GAFFNEY, C. J. et al. Greater loss of mitochondrial function with ageing is associated with earlier onset of sarcopenia in *C. elegans*. **Aging**, v. 10, n. 11, p. 3382–3396, 19 nov. 2018.

GANAPATHY, A.; NIEVES, J. W. Nutrition and Sarcopenia-What Do We Know? **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1–25, 1 jun. 2020.

GE, Z. et al. Magnolol inhibits myotube atrophy induced by cancer cachexia through myostatin signaling pathway in vitro. **Journal of natural medicines**, v. 74, n. 4, p. 741–749, 1 set. 2020.

GIORDANI, J. et al. Six proteins regulate the activation of Myf5 expression in embryonic mouse limbs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 27, p. 11310, 7 jul. 2007.

GLADYSHEV, T. V.; GLADYSHEV, V. N. A Disease or not a Disease? Aging as a Pathology. **Trends in molecular medicine**, v. 22, n. 12, p. 995, 1 dez. 2016a, b.

GONZALEZ-FREIRE, M. et al. The Neuromuscular Junction: Aging at the Crossroad between Nerves and Muscle. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, n. AUG, 2014.

GOODELL, M. A.; RANDO, T. A. Stem cells and healthy aging. **Science**, v. 350, n. 6265, p. 1199–1204, 4 dez. 2015.

GOSMANN, G. et al. Phenolic compounds from maté (*Ilex paraguariensis*) inhibit adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. **Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)**, v. 67, n. 2, p. 156–161, jun. 2012.

GRAMMATIKAKIS, I. et al. Long noncoding RNAs (lncRNAs) and the molecular hallmarks of aging. **Aging (Albany NY)**, v. 6, n. 12, p. 992, 2014.

GREEN, D. R.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. **Science**, v. 333, n. 6046, p. 1109–1112, 26 ago. 2011.

GREGORY, C. M. et al. Metabolic and phenotypic characteristics of human skeletal muscle fibers as predictors of glycogen utilization during electrical stimulation. **European Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 4, p. 276–282, 12 ago. 2005.

GROEN, B. B. L. et al. Skeletal muscle capillary density and microvascular function are compromised with aging and type 2 diabetes. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 116, n. 8, p. 998–1005, 15 abr. 2014.

GROTE, C. et al. Regulatory mechanisms and clinical manifestations of musculoskeletal aging. **Journal of Orthopaedic Research®**, v. 37, n. 7, p. 1475–1488, 1 jul. 2019.

GRUNOW, J. J. et al. Muscular myostatin gene expression and plasma concentrations are decreased in critically ill patients. **Critical Care**, v. 26, n. 1, 1 dez. 2022.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, n. 2, p. 338–344, 16 jul. 1996.

GUILLAUMET-ADKINS, A. et al. Epigenetics and Oxidative Stress in Aging. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

HÄMÄLÄINEN, N.; PETTE, D. Patterns of myosin isoforms in mammalian skeletal muscle fibres. **Microscopy Research and Technique**, v. 30, n. 5, p. 381–389, 1995.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v. 25, n. 3, p. 585–621, 1 dez. 1961.

HEIDENREICH, P. A. et al. Forecasting the Future of Cardiovascular Disease in the United States. **Circulation**, v. 123, n. 8, p. 933–944, 1 mar. 2011.

HEKIMI, S.; LAPOINTE, J.; WEN, Y. Taking a “good” look at free radicals in the aging process. **Trends in Cell Biology**, v. 21, n. 10, p. 569–576, 1 out. 2011.

HERRMANN, M. et al. Telomere biology and age-related diseases. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 56, n. 8, p. 1210–1222, 26 jul. 2018.

- HIPP, M. S.; KASTURI, P.; HARTL, F. U. The proteostasis network and its decline in ageing. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 20, n. 7, p. 421–435, 1 jul. 2019.
- HOGAN, P. G. et al. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. **Genes & development**, v. 17, n. 18, p. 2205–2232, 15 set. 2003.
- HONG, K. B. et al. Effects of tannase-converted green tea extract on skeletal muscle development. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 47–47, 11 fev. 2020.
- HOOD, D. A. et al. Maintenance of Skeletal Muscle Mitochondria in Health, Exercise, and Aging. **Annual Review of Physiology**, v. 81, p. 19–41, 11 fev. 2019.
- HORNSBY, P. J. Telomerase and the aging process. **Experimental gerontology**, v. 42, n. 7, p. 575–581, jul. 2007.
- HUANG, C. C. et al. Protective and recovery effects of resveratrol supplementation on exercise performance and muscle damage following acute plyometric exercise. **Nutrients**, v. 13, n. 9, 1 set. 2021.
- IBGE. **Número de idosos cresce 18% em 5 anos e ultrapassa 30 milhões em 2017 | Agência de Notícias**. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/20980-numero-de-idosos-cresce-18-em-5-anos-e-ultrapassa-30-milhoes-em-2017>>. Acesso em: 24 maio. 2022.
- JANG, Y. Y.; SHARKIS, S. J. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. **Blood**, v. 110, n. 8, p. 3056, 10 out. 2007.
- JASKELIOFF, M. et al. Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase deficient mice. **Nature**, v. 469, n. 7328, p. 102, 1 jan. 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, 11 dez. 2017.
- JEPPESEN, D. K.; BOHR, V. A.; STEVNSNER, T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. **Progress in Neurobiology**, v. 94, n. 2, p. 166–200, 1 jul. 2011.
- JOHNSON, I. P. Age-related neurodegenerative disease research needs aging models. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 7, n. SEP, p. 168, 2015.

JOSEPH, A. M. et al. The Impact of Aging on Mitochondrial Function and Biogenesis Pathways in Skeletal Muscle of Sedentary High- and Low-Functioning Elderly Individuals. **Aging cell**, v. 11, n. 5, p. 801, out. 2012.

KAUPPILA, T. E. S. et al. Mutations of mitochondrial DNA are not major contributors to aging of fruit flies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 41, p. E9620–E9629, 9 out. 2018.

KENNEDY, B. K. et al. Aging: a common driver of chronic diseases and a target for novel interventions. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 709, 11 nov. 2014.

KENNEDY, S. R. et al. Ultra-Sensitive Sequencing Reveals an Age-Related Increase in Somatic Mitochondrial Mutations That Are Inconsistent with Oxidative Damage. **PLoS Genet**, v. 9, n. 9, p. 1003794, 2013.

KENT-BRAUN, J. A.; NG, A. V.; YOUNG, K. Skeletal muscle contractile and noncontractile components in young and older women and men. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 88, n. 2, p. 662–668, 2000.

KHODAEI, F. et al. Ellagic acid improves muscle dysfunction in cuprizone-induced demyelinated mice via mitochondrial Sirt3 regulation. **Life sciences**, v. 237, 15 nov. 2019.

KIETZMANN, T. et al. The epigenetic landscape related to reactive oxygen species formation in the cardiovascular system. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 12, p. 1533, 2017.

KIM, A. R. et al. Catechins activate muscle stem cells by Myf5 induction and stimulate muscle regeneration. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 489, n. 2, p. 142–148, 22 jul. 2017.

KIM, C.-H.; XIONG, W. C.; MEI, L. Inhibition of MuSK Expression by CREB Interacting with a CRE-Like Element and MyoD. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 13, p. 5329–5338, jul. 2005.

KITADA, M.; KOYA, D. Autophagy in metabolic disease and ageing. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 17, n. 11, p. 647–661, 10 set. 2021.

KLAIPS, C. L.; JAYARAJ, G. G.; HARTL, F. U. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. **The Journal of cell biology**, v. 217, n. 1, p. 51–63, 1 jan. 2018a, b.

KLEIN, G. A. et al. Mate Tea (*Ilex paraguariensis*) Improves Glycemic and Lipid Profiles of Type 2 Diabetes and Pre-Diabetes Individuals: A Pilot Study. **Journal of the American College Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 320–332, 1 out. 2013.

KLINGENBERG, M. Energetic aspects of transport of ADP and ATP through the mitochondrial membrane. **Ciba Foundation symposium**, n. 31, p. 105–124, 1975.

KOLIOS, G.; MOODLEY, Y. Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. **Respiration**, v. 85, n. 1, p. 3–10, dez. 2013.

KOROVILA, I. et al. Proteostasis, oxidative stress and aging. **Redox Biology**, v. 13, p. 550–567, 12 jul. 2017.

KUDRYAVTSEVA, A. V. et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 29, p. 44879–44905, 2016.

LAI, L. et al. Transcriptional coactivators PGC-1 $\alpha$  and PGC-1 $\beta$  control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart. **Genes & Development**, v. 22, n. 14, p. 1948, 7 jul. 2008.

LAKER, R. C. et al. Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2017.

LARSSON, L. et al. Sarcopenia: Aging-Related Loss of Muscle Mass and Function. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 1, p. 427, 1 jan. 2019a, b, c.

LE GRAND, F. et al. Six1 regulates stem cell repair potential and self-renewal during skeletal muscle regeneration. **The Journal of Cell Biology**, v. 198, n. 5, p. 815, 9 set. 2012.

LEE, C. et al. Magnolol Attenuates Cisplatin-Induced Muscle Wasting by M2c Macrophage Activation. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 77, 7 fev. 2020.

LEE, S. et al. Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 31, p. 22977–22983, 3 ago. 2007.

LEE, S. J. et al. Epicatechin elicits MyoD-dependent myoblast differentiation and myogenic conversion of fibroblasts. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, 1 abr. 2017.

LEXELL, J. et al. Distribution of different fiber types in human skeletal muscles: effects of aging studied in whole muscle cross sections. **Muscle & nerve**, v. 6, n. 8, p. 588–595, 1983.

LEXELL, J.; DOWNHAM, D.; SJÖSTRÖM, M. Distribution of different fibre types in human skeletal muscles. Fibre type arrangement in m. vastus lateralis from three groups of healthy men between 15 and 83 years. **Journal of the neurological sciences**, v. 72, n. 2–3, p. 211–222, 1986.

LEXELL, J.; TAYLOR, C. C. Variability in muscle fibre areas in whole human quadriceps muscle: effects of increasing age. **Journal of Anatomy**, v. 174, p. 239, fev. 1991.

LI, J. et al. ActRIIB:ALK4-Fc alleviates muscle dysfunction and comorbidities in murine models of neuromuscular disorders. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 4, 2 fev. 2021.

LI, L. et al. Mitochondrial Biogenesis and Peroxisome Proliferator–Activated Receptor- $\gamma$  Coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) Deacetylation by Physical Activity: Intact Adipocytokine Signaling Is Required. **Diabetes**, v. 60, n. 1, p. 157, jan. 2011.

LI, P. et al. Role and mechanism of catechin in skeletal muscle cell differentiation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 74, p. 108225, 1 dez. 2019.

LIN, Y. et al. Pharmacology, Toxicity, Bioavailability, and Formulation of Magnolol: An Update. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 17 mar. 2021.

LINHARES, J. E. et al. Capacidade para o trabalho e envelhecimento funcional: análise Sistêmica da Literatura utilizando o *PROKNOW-C (Knowledge Development Process - Constructivist)*. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, n. 1, p. 53–66, 2019.

LIU, L. et al. Mitochondrial dysfunction leads to telomere attrition and genomic instability. **Aging cell**, v. 1, n. 1, p. 40–46, 2002.

LIU, Y. et al. Cooperation between myogenic regulatory factors and SIX family transcription factors is important for myoblast differentiation. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 20, p. 6857–6871, nov. 2010.

LIU, Y. et al. Six1 Regulates MyoD Expression in Adult Muscle Progenitor Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 67762, 28 jun. 2013.

LOESER, R. F. Aging and Osteoarthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 23, n. 5, p. 492, set. 2011.

LÓPEZ-OTÍN, C. et al. The Hallmarks of Aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194, 6 jun. 2013.

LUBLÓY, Á. Medical crowdfunding in a healthcare system with universal coverage: an exploratory study. **BMC Public Health**, v. 20, n. 1, p. 1–20, 1 dez. 2020.

MACIEJOWSKI, J.; DE LANGE, T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, n. 3, p. 175–186, 18 jan. 2017.

MALEKI, M. et al. Stabilization of telomere by the antioxidant property of polyphenols: Anti-aging potential. **Life sciences**, v. 259, 15 out. 2020.

MANCINELLI, R. et al. Biological Aspects of Selected Myokines in Skeletal Muscle: Focus on Aging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8520, 7 ago. 2021a, b.

MAZAT, J. P. et al. Mitochondrial energetic metabolism—some general principles. **IUBMB Life**, v. 65, n. 3, p. 171–179, 1 mar. 2013.

MCDONALD, C. M. et al. (–)-Epicatechin induces mitochondrial biogenesis and markers of muscle regeneration in adults with Becker muscular dystrophy. **Muscle & Nerve**, v. 63, n. 2, p. 239, 1 fev. 2021.

MCGUIRE, P. J. Mitochondrial Dysfunction and the Aging Immune System. **Biology**, v. 8, n. 2, p. 26, 11 maio 2019.

MENSÀ, E. et al. The telomere world and aging: Analytical challenges and future perspectives. **Ageing Research Reviews**, v. 50, p. 27–42, 1 mar. 2019.

MIRANDA, D. D. C. et al. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, v. 23, n. 4, p. 261–265, jul. 2008.

MISSIOS, P. et al. Glucose substitution prolongs maintenance of energy homeostasis and lifespan of telomere dysfunctional mice. **Nature Communications**, v. 5, 2014.

MOLENAARS, M. et al. A conserved mito-cytosolic translational balance links two longevity pathways. **Cell metabolism**, v. 31, n. 3, p. 549, 3 mar. 2020.

MOMKEN, I. et al. Resveratrol prevents the wasting disorders of mechanical unloading by acting as a physical exercise mimetic in the rat. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 25, n. 10, p. 3646–3660, out. 2011.

MORENO-ULLOA, A. et al. (-)-Epicatechin stimulates mitochondrial biogenesis and cell growth in C2C12 myotubes via the G-protein coupled estrogen receptor. **European journal of pharmacology**, v. 822, p. 95, 3 mar. 2018.

MUSI, N. et al. Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain. **Aging Cell**, v. 17, n. 6, p. e12840, 1 dez. 2018.

MYBURGH, K. H.; KRUGER, M. J.; SMITH, C. Accelerated skeletal muscle recovery after in vivo polyphenol administration. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 9, p. 1072–1079, 1 set. 2012.

NAIR, K. S. Aging muscle. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 5, p. 953–963, 2005.

NASSOUR, J. et al. Autophagic cell death restricts chromosomal instability during replicative crisis. **Nature**, v. 565, n. 7741, p. 659, 31 jan. 2019.

NICCOLI, T.; PARTRIDGE, L.; ISAACS, A. M. Ageing as a risk factor for ALS/FTD. [s.d.].

NIKAWA, T.; ULLA, A.; SAKAKIBARA, I. Polyphenols and Their Effects on Muscle Atrophy and Muscle Health. **Molecules**, v. 26, n. 16, 2 ago. 2021.

NORD, H.; SKALMAN, L. N.; VON HOFSTEN, J. Six1 regulates proliferation of Pax7-positive muscle progenitors in zebrafish. **Journal of cell science**, v. 126, n. Pt 8, p. 1868–1880, 15 abr. 2013.

NUSSBAUM, R. L.; ELLIS, C. E. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **The New England journal of medicine**, v. 348, n. 14, p. 1356–1364, 3 abr. 2003.

OMMATI, M. M. et al. Chlorogenic acid supplementation improves skeletal muscle mitochondrial function in a rat model of resistance training. **Biologia**, v. 75, n. 8, p. 1221–1230, 17 fev. 2020.

OMS. **Envelhecimento e saúde**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>>. Acesso em: 24 maio. 2022.

ONG, A. L. C.; RAMASAMY, T. S. Role of Sirtuin1-p53 regulatory axis in aging, cancer and cellular reprogramming. **Ageing research reviews**, v. 43, p. 64–80, 1 maio 2018.

PAL, S.; TYLER, J. K. Epigenetics and aging. **Science Advances**, v. 2, n. 7, 2016.

PALACIOS, D. et al. Interplay between DNA Methylation and Transcription Factor Availability: Implications for Developmental Activation of the Mouse Myogenin Gene. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 15, p. 3805, ago. 2010.

PANENI, F. et al. The Aging Cardiovascular System: Understanding It at the Cellular and Clinical Levels. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 15, p. 1952–1967, 18 abr. 2017.

PAPACONSTANTINO, J. The Role of Signaling Pathways of Inflammation and Oxidative Stress in Development of Senescence and Aging Phenotypes in Cardiovascular Disease. **Cells**, v. 8, n. 11, 1 nov. 2019.

PARK, J. IL et al. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. **Nature**, v. 460, n. 7251, p. 66, 7 jul. 2009.

PARTRIDGE, L.; DEELEN, J.; SLAGBOOM, P. E. Facing up to the global challenges of ageing. **Nature**, v. 561, n. 7721, p. 45–56, 5 set. 2018.

PENEDO-VÁZQUEZ, A. et al. Curcumin and Resveratrol Improve Muscle Function and Structure through Attenuation of Proteolytic Markers in Experimental Cancer-Induced Cachexia. **Molecules**, v. 26, n. 16, 2 ago. 2021.

PENG, K. et al. Resveratrol Regulates Mitochondrial Biogenesis and Fission/Fusion to Attenuate Rotenone-Induced Neurotoxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

PIASECKA, A. et al. MEF2C shapes the microtranscriptome during differentiation of skeletal muscles. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 3476, 1 dez. 2021.

PIZENT, A. et al. Antioxidants, trace elements and metabolic syndrome in elderly subjects. **The journal of nutrition, health & aging**, v. 14, n. 10, p. 866–871, 2010.

**População cresce, mas número de pessoas com menos de 30 anos cai 5,4% de 2012 a 2021** | Agência de Notícias. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/34438-populacao-cresce-mas-numero-de-pessoas-com-menos-de-30-anos-cai-5-4-de-2012-a-2021>>. Acesso em: 5 out. 2022.

PORTER, M. M.; VANDERVOORT, A. A.; LEXELL, J. Aging of human muscle: structure, function and adaptability. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 5, n. 3, p. 129–142, 1995.

PRATT, J. et al. Genetic Associations with Aging Muscle: A Systematic Review. **Cells**, v. 9, n. 1, 19 dez. 2019.

QI, G. et al. Neuroprotective action of tea polyphenols on oxidative stress-induced apoptosis through the activation of the TrkB/CREB/BDNF pathway and Keap1/Nrf2 signaling pathway in SH-SY5Y cells and mice brain. **Food & Function**, v. 8, n. 12, p. 4421–4432, 13 dez. 2017.

QUIJANO, C. et al. Oncogene-induced senescence results in marked metabolic and bioenergetic alterations. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 11, n. 7, p. 1383–1392, 1 abr. 2012.

RÍOS, J. L. et al. A Pharmacological Update of Ellagic Acid. **Planta medica**, v. 84, n. 15, p. 1068–1093, 30 maio 2018.

ROBINSON, F. P. A.; SHALIT, M. The dezincification of brass. **Anti-Corrosion Methods and Materials**, v. 11, n. 4, p. 11–14, 1964.

ROCCA, W. A. et al. Trends in the incidence and prevalence of Alzheimer’s disease, dementia, and cognitive impairment in the United States. **Alzheimer’s & dementia : the journal of the Alzheimer’s Association**, v. 7, n. 1, p. 80, jan. 2011.

RODGERS, J. T. et al. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. **Nature**, v. 434, n. 7029, p. 113–118, 3 mar. 2005.

ROMAGNOLI, C.; IANTOMASI, T.; BRANDI, M. L. Available In Vitro Models for Human Satellite Cells from Skeletal Muscle. **International Journal of Molecular Sciences** 2021, v. 22, n. 24, p. 13221, 8 dez. 2021.

SAHIN, E. et al. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. **Nature**, v. 470, n. 7334, p. 359, 2 fev. 2011a.

SAHIN, E. et al. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. **Nature**, v. 470, n. 7334, p. 359, 2 fev. 2011b.

SAIBABU, V. et al. Therapeutic Potential of Dietary Phenolic Acids. 2015.

SALMINEN, A.; KAUPPINEN, A.; KAARNIRANTA, K. FGF21 activates AMPK signaling: impact on metabolic regulation and the aging process. **Journal of Molecular Medicine**, v. 95, n. 2, p. 123–131, 27 set. 2016.

SALT, I. P.; HARDIE, D. G. AMP-Activated Protein Kinase – A Ubiquitous Signalling Pathway with Key Roles in the Cardiovascular System. **Circulation research**, v. 120, n. 11, p. 1825, 5 maio 2017.

SARTORI, R. et al. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 296, n. 6, jun. 2009.

SARTORI, R.; GREGOREVIC, P.; SANDRI, M. TGF $\beta$  and BMP signaling in skeletal muscle: potential significance for muscle-related disease. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 25, n. 9, p. 464–471, 2014.

SAXTON, R. A.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. **Cell**, v. 169, n. 2, p. 361–371, 6 abr. 2017.

SCALFARI, A. et al. Age and disability accumulation in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 77, n. 13, p. 1246, 9 set. 2011.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. **Physiological Reviews**, v. 76, n. 2, p. 371–423, 1996.

SCHINELLA, G. R. et al. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 269, n. 2, p. 357–360, 16 mar. 2000.

SCHRAUWEN, P.; HESSELINK, M. UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. 15, p. 2275–2285, 1 ago. 2002.

SEMBA, R. D. et al. Relationship of Circulating Growth and Differentiation Factors 8 and 11 and Their Antagonists as Measured Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry With Age and Skeletal Muscle Strength in Healthy Adults. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 74, n. 1, p. 129, 1 jan. 2019.

SENOVILLA, L. et al. An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy. **Science**, v. 337, n. 6102, p. 1678–1684, 28 set. 2012.

SEOK, W. P. et al. Accelerated loss of skeletal muscle strength in older adults with type 2 diabetes: the health, aging, and body composition study. **Diabetes care**, v. 30, n. 6, p. 1507–1512, maio 2007.

SHARMA, G.; GOODWIN, J. Effect of aging on respiratory system physiology and immunology. **Clinical Interventions in Aging**, v. 1, n. 3, p. 253, 2006.

SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Hallmarks of telomeres in ageing research. **The Journal of pathology**, v. 211, n. 2, p. 114–123, jan. 2007.

SHEN, Y. C.; YEN, J. C.; LIOU, K. T. Ameliorative effects of caffeic acid phenethyl ester on an eccentric exercise-induced skeletal muscle injury by down-regulating NF- $\kappa$ B mediated inflammation. **Pharmacology**, v. 91, n. 3–4, p. 219–228, maio 2013.

SHETH, K. A. et al. Muscle strength and size are associated with motor unit connectivity in aged mice. **Neurobiology of Aging**, v. 67, p. 128–136, 1 jul. 2018.

SINGH, C. K. et al. The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 28, n. 8, p. 643, 3 mar. 2018.

SONG, D. et al. Cell–cell communication: old mystery and new opportunity. **Cell Biology and Toxicology** 2019 35:2, v. 35, n. 2, p. 89–93, 27 fev. 2019.

SORIA-VALLES, C.; LÓPEZ-OTÍN, C. iPSCs: On the Road to Reprogramming Aging. **Trends in molecular medicine**, v. 22, n. 8, p. 713–724, 1 ago. 2016.

SPITZ, F. et al. Expression of myogenin during embryogenesis is controlled by Six/sine oculis homeoproteins through a conserved MEF3 binding site. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 24, p. 14220, 11 nov. 1998.

STEWART, R. et al. CREB Is Activated by Muscle Injury and Promotes Muscle Regeneration. **PLOS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24714, 13 set. 2011.

STOHS, S. J.; BADMAEV, V. A Review of Natural Stimulant and Non-stimulant Thermogenic Agents. **Phytotherapy research : PTR**, v. 30, n. 5, p. 732–740, 1 maio 2016.

TANAKA, H. et al. Aging, habitual exercise, and dynamic arterial compliance. **Circulation**, v. 102, n. 11, p. 1270–1275, 12 set. 2000.

TANG, B. L. Sirt1 and the Mitochondria. **Molecules and Cells**, v. 39, n. 2, p. 87, 2 fev. 2016.

TAPSCOTT, S. J. The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. **Development**, v. 132, n. 12, p. 2685–2695, 15 jun. 2005.

TRAPP, B. D.; NAVE, K. A. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? **Annual review of neuroscience**, v. 31, p. 247–269, 2008.

TRENDELENBURG, A. U. et al. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 296, n. 6, jun. 2009.

TREVISAN, M. C. et al. Metabolismo de repouso de mulheres pós-menopausadas submetidas a programa de treinamento com pesos (hipertrofia). **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 2, p. 133–137, 2007.

TRIFUNOVIC, A. et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 417–423, 27 maio 2004.

TYNER, S. D. et al. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. **Nature**, v. 415, n. 6867, p. 45–53, 3 jan. 2002.

VALERO, T. Mitochondrial biogenesis: pharmacological approaches. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 35, p. 5507–5509, 15 set. 2014.

VILLENA, J. A. New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. **The FEBS journal**, v. 282, n. 4, p. 647–672, 2015.

WANG, D. Z. et al. The Mef2c gene is a direct transcriptional target of myogenic bHLH and MEF2 proteins during skeletal muscle development. **Development (Cambridge, England)**, v. 128, n. 22, p. 4623–4633, 2001.

WANG, J. et al. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 93, n. 4, p. 953–962, maio 2005.

WEN, Y.; USHIO, H. Ferulic Acid Promotes Hypertrophic Growth of Fast Skeletal Muscle in Zebrafish Model. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1066, 26 set. 2017.

WIEDMER, P. et al. Sarcopenia – Molecular mechanisms and open questions. **Ageing Research Reviews**, v. 65, p. 101200, 1 jan. 2021.

WILKINSON, D. J.; PIASECKI, M.; ATHERTON, P. J. The age-related loss of skeletal muscle mass and function: Measurement and physiology of muscle fibre atrophy and muscle fibre loss in humans. **Ageing research reviews**, v. 47, p. 123–132, 1 nov. 2018.

YIN, H.; PRICE, F.; RUDNICKI, M. A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. **Physiological reviews**, v. 93, n. 1, p. 23–67, 1 jan. 2013.

ZHANG, M. Y.; ZHANG, W. J.; MEDLER, S. The continuum of hybrid IIX/IIB fibers in normal mouse muscles: MHC isoform proportions and spatial distribution within single fibers. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 299, n. 6, p. R1582, dez. 2010.

ZHU, Y. et al. Telomere and its role in the aging pathways: telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction. **Biogerontology**, v. 20, n. 1, p. 1–16, 18 set. 2018.

ZOLE, E.; RANKA, R. Mitochondria, its DNA and telomeres in ageing and human population. **Biogerontology**, v. 19, n. 3–4, p. 189–208, 1 jul. 2018.

**ANEXO I: Aprovação do CEUA****COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL EM PESQUISA - CEUA**

Bragança Paulista, 30 de Outubro de 2014

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**Projeto de Pesquisa:** Efeitos da Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) na modulação do metabolismo energético mitocondrial associados a adipogênese e obesidade.

**ÁREA DE CONHECIMENTO:** Saúde e Biológicas

**Autor(es):** Profa. Dra. Alessandra Gambero

**Instituição:** UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

**Protocolo:** 002.10.2014

**IP. CIUCA:** 200.225.122.34

Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

O Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais de Pesquisa-CEUA, da Universidade São Francisco, analisou em reunião ordinária no dia 30/10/2014 o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

**Parecer:** Aprovado

**Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini**

**Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa  
Universidade São Francisco**