

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA

MARCELLE ALMEIDA DE SOUSA NOGUEIRA

Avaliação clínica, histológica e laboratorial do envelhecimento cutâneo na  
suplementação oral de coenzima Q10 em idosas

São Paulo

2022

Marcelle Almeida de Sousa Nogueira

Avaliação clínica, histológica e laboratorial do envelhecimento cutâneo na  
suplementação oral de coenzima Q10 em idosas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Edileia Bagatin

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Notomi  
Sato

São Paulo

2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nogueira, Marcelle Almeida de Sousa  
Avaliação clínica, histológica e laboratorial do  
envelhecimento cutâneo na suplementação oral de  
coenzima Q10 em idosas / Marcelle Almeida de Sousa  
Nogueira. -- São Paulo, 2022.  
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Dermatologia.  
Orientadora: Edileia Bagatin.  
Coorientadora: Maria Notomi Sato.

Descritores: 1.Coenzimas 2.Envelhecimento  
3.Envelhecimento da pele 4.Colágeno 5.Oxidantes  
6.Antioxidantes 7.Suplementos nutricionais

USP/FM/DBD-312/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*À minha amada família, em especial Vera, Nogueira, Tom e Ju.*

*O amor por vocês é um combustível diário.*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor **Dr. José Antonio Sanches Junior**, toda minha imensurável admiração e respeito. Obrigada não apenas por ser exemplo de pesquisador reconhecido internacionalmente, mas por todos os sábios conselhos, por cada valioso ensinamento de vida e de Dermatologia, por estar sempre perto mesmo com uma agenda atribulada, por ter acreditado na importância do desenvolvimento desta linha de pesquisa e por toda confiança depositada. Seu sólido suporte e seu espírito inovador foram essenciais para o estudo do envelhecimento na Dermatologia da USP. Minha eterna gratidão por iluminar este caminho.

À professora **Dra. Edileia Bagatin**, minha orientadora, de ética e otimismo inabaláveis, que desde meu primeiro ano como residente em dermatologia na USP ganhou minha grande admiração pelo fiel comprometimento com a ciência nas aulas do Congresso Brasileiro de Dermatologia. Muito obrigada por ser eterna fonte de inspiração e força na Dermatologia brasileira e mundial, por acreditar em nosso trabalho, pela dedicação, pelo acolhimento, pelo incentivo aos estudos multicêntricos, pelas palavras de apoio, por todo carinho e por revisar cada palavra do texto desta tese. Sinto-me muito honrada em ter o privilégio de ser sua orientanda.

À professora **Dra. Maria Notomi Sato**, minha co-orientadora, por tanta sabedoria e dedicação à ciência. Obrigada por ser inspiração como pesquisadora e como pessoa, por toda disponibilidade para ricas discussões desde o princípio do nosso trabalho, com sugestões e ideias sempre muito assertivas, por todo o sólido apoio na execução de cada etapa do nosso estudo, por ensinar o raciocínio crítico e por todo carinho. Seu suporte diário e sua confiança foram fundamentais para concretização do nosso estudo.

Ao professor **Dr. Cyro Festa Neto**, por sempre incentivar e abrir espaços aos jovens dermatologistas. Pelo estímulo e exemplo como médico, pesquisador e professor, desde o início da minha carreira na Dermatologia. Obrigada pela confiança e por cada oportunidade concedida.

A professora **Dra. Mirian Nacagami Sotto**, por tanta sabedoria e generosidade em dividir conhecimentos, desde a época das checagens de lâminas histológicas na residência de Dermatologia. Muito obrigada por ter sido grande incentivadora deste estudo e por tanta disponibilidade, especialmente durante o auge da pandemia por COVID-19, ao discutir metodologias e análises histológicas em reuniões remotas.

Ao professor **Burns, Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva**, por colaborar em toda orientação tecnológica para coletar dados histológicos das 2 mil imagens digitalizadas neste estudo. Seus preciosos ensinamentos foram essenciais para a precisão dos dados obtidos.

À professora **Dra. Neusa Yuriko Sakai Valente**, por sempre ensinar brilhantes correlações clínico-histopatológicas, por pensar nas escolhas dos métodos deste estudo desde o início e por todo acolhimento e prestatividade no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Dermatologia da USP.

Aos membros da banca de qualificação do doutorado, **Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto, Prof. Dr. Luis Antonio Ribeiro Torezan, Dr. Fábio Seiti Yamada Yoshikawa, Profa. Dra. Celina Wakisaka Maruta, Dra. Luanda Mara da Silva Oliveira**, pelas relevantes contribuições e ricas discussões científicas, que engrandeceram nosso trabalho.

Aos professores, colegas e amigos do LIM-53, especialmente aos professores **Dr. Gil Bernard e Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro** e também à **Dra. Vivane Mazo**, por todo apoio, incentivo e por contribuírem imensamente de forma estrutural para a realização deste estudo.

Aos queridos amigos do LIM-56, especialmente à **Nátalli Pereira, Luanda Oliveira, Yasmim Leuzzi, Iara Grigoletto, Naiura Vieira, Celeste Romano, Daniel Lopes e Adriana Rocha**, que se dedicaram, dividiram angústias e muito contribuíram diretamente para a concretização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) e aos professores **Manoel Odorico de Moraes Filho, Cláudia do Ó Pessoa, Leticia**

**Veras Costa Lotufo e Paula Christine Jimenez** que há 20 anos me abriram as portas da iniciação científica, obrigada por permitirem e incentivarem o início desta trajetória de amor pela pesquisa. Este ano, completamos 16 anos da publicação internacional dos nossos primeiros artigos científicos.

Ao professor **Dr. Francisco Carlos Barboza Nogueira** pela amizade que atravessou gerações e pelas ricas discussões estatísticas, por vezes adentrando a noite, extremamente engrandecedoras para os resultados da nossa pesquisa.

Ao **Dr. João Paulo Silva Pinheiro**, pela amizade e pelas enriquecedoras e brilhantes discussões sobre método científico, na USP.

À **Dra. Juliana Soares Dias**, pelas produtivas interações e por compartilhar e apoiar todo o início deste estudo, na UNIFESP.

À **Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD)**, presidida nos últimos anos pelo **Dr. José Antonio Sanches Junior, Dr. Sérgio Palma e Dr. Mauro Enokihara**, que sempre tomaram o estudo do envelhecimento com seriedade e atenção, promovendo debates e conscientização sobre este relevante tema, dentro e fora da comunidade científica.

Aos **colegas dermatologistas de todo o Brasil**, que sempre foram um grande estímulo para seguirmos com os estudos, ao buscarem respostas em cada uma das aulas que tive a honra de ministrar nos congressos de dermatologia nacionais e internacionais. Vocês me fizeram voltar ao laboratório com mais empenho, ao final de cada evento.

À bióloga **Joyce Kawakami**, por toda parceria, amizade e apoio na etapa histológica deste estudo, sobretudo durante as restrições de funcionamento dos laboratórios do complexo HC-FMUSP, durante a pandemia por COVID-19.

À **Maria Cristina Galhardo, Jacqueline Meneghin e Antônio Marques dos Santos Filho**, do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Dermatologia da USP, por todo cuidado e esmero durante a confecção das muitas lâminas histológicas deste estudo.

Aos queridos **Marcelo Alves** e **Ruth Meneses**, da Secretaria do Departamento de Dermatologia da USP, por toda atenção, prestatividade e rapidez de resposta em todas as etapas documentais deste estudo.

Ao **Alexandre Vargas**, **Rosângela Sousa** e **Amadeu Ferreira**, que muito nos ajudaram na organização das agendas de consultas dermatológicas no ambulatório de Dermatologia do HCFMUSP, além de toda imensa colaboração na etapa desenvolvida no estúdio de fotografia.

À equipe da biblioteca da FMUSP, em especial à bibliotecária **Isabel Figueiredo**, pelo apoio e prestatividade nas inúmeras solicitações.

A cada uma das **idosas participantes deste estudo**, que acreditaram na ciência, colaboraram em todas as etapas e, literalmente, contribuíram com a própria pele.

Aos meus queridos **pacientes**, muito obrigada pelo carinho, incentivo e pela flexibilização de horários quando precisei dedicar horas à esta obra.

Ao **Fundo de Apoio à Dermatologia do Estado de São Paulo (FUNADERSP)**, pelo apoio financeiro fundamental para a concretização deste estudo e pelo fomento à pesquisa científica.

Aos meus queridos **amigos** por tanto carinho e por compreenderem inúmeros momentos de ausência em prol da ciência, especialmente **Osmar Teixeira**, **Marcílio Magalhães** e **Andrine Nunes** por, além de preencherem minha vida com tanto amor e alegria desde a infância, terem me assessorado em etapas logísticas, tecnológicas e legais fundamentais desta tese.

A todos os médicos da minha família, que desde 1810 perpetuaram e cuidadosamente transmitiram por todas as gerações o delicado caminho iluminado por Hipócrates, em especial à amada tia cardiologista, **Dra. Maria Agnela Almeida de Sousa Jucá**, por ser meu grande exemplo e inspiração, desde a infância, como médica e como pessoa.

Aos meus amados pais, **Vera e Nogueira**, os idosos que acompanharam e apoiaram incondicionalmente cada passo do desenvolvimento deste trabalho. A incansável vontade de vê-los envelhecer com muita energia e saúde tornou-se uma grande inspiração para estudar e contribuir com a pesquisa científica no envelhecimento saudável. Obrigada por estarem presentes em todos os momentos, pela generosidade, suporte, compreensão e amor incondicionais em todos os dias de minha vida. Aqui temos a realização de mais um passo que sonhamos juntos.

A toda minha amada família, em especial **Tom e Ju**, que me ensinam diariamente sobre o valor das pequenas coisas. Tom, muito obrigada por insistir em estar perto, mesmo nos momentos em que precisei do isolamento para concluir toda complexa análise de dados deste longo estudo, por todas as risadas e por ser um porto seguro desde o meu primeiro dia de vida. Ju, muito obrigada por toda compreensão, por todo cuidado, por estar presente em todas as etapas e por tornar esta jornada sempre mais leve, com muito carinho. O amor por vocês foi um estímulo diário. Que sorte a minha em ter a chance de envelhecer ao lado de vocês.

Concluo estes sinceros agradecimentos com uma lembrança especial dos meus amados padrinhos e avós, **desembargador Joaquim Jorge De Sousa Filho e Profa. Francisca Almeida de Sousa**, por me ensinarem desde cedo que nosso bem mais valioso, jamais passível de subtração, é a educação. Se hoje aqui estivessem, citariam Isaac Newton, como tantas vezes fizemos juntos, em unísono: **“se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”**.

Obrigada, de todo coração, a cada um dos gigantes acima destacados.

“– Quem estará nas trincheiras ao teu lado?  
– E isso importa?  
– Mais do que a própria guerra.”

Ernest Hemingway

## RESUMO

Nogueira MAS. Avaliação clínica, histológica e laboratorial do envelhecimento cutâneo na suplementação oral de coenzima Q10 em idosas [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2022.

O presente estudo avaliou a ação antioxidante da coenzima Q10 (CoQ10) via oral no envelhecimento cutâneo de idosas através de um ensaio clínico triplo cego, randomizado, placebo controlado. Das 50 participantes triadas, 45 foram alocadas em 3 grupos (placebo, CoQ10 100mg/dia e CoQ10 200mg/dia) e acompanhadas por 12 semanas. As avaliações foram realizadas antes e após a suplementação e incluíram: análises clínicas de autopercepção da melhora estética global, estereofotogrametria para vasos sanguíneos e hiperpigmentações cutâneas, elasticidade, hidratação, perda de água transepidermica, do inglês transepidermal water loss (TEWL), espessura e densidade dérmica através de ultrassonografia (USG) de 20MHz, análises histológicas com colorações para evidenciar epiderme (hematoxilina-eosina), fibras colágenas (picosirius) e elásticas (Weigert), expressão das proteínas Nrf2 e p53 por imuno-histoquímica (IHQ), parâmetros laboratoriais de função renal, hepática e hematológica, citocinas séricas por citometria de fluxo, dosagem de CoQ10 sérica, expressão de genes por PCR em tempo real (RT-qPCR) para metaloproteinases e fatores oxidantes e antioxidantes na pele. Houve melhora da autopercepção estética global em todos os grupos, sem diferenças. A redução de eritema facial foi significativa nos grupos CoQ10 100mg e CoQ10 200mg, sendo mais pronunciada neste último. A redução da área e intensidade das hiperpigmentações cutâneas aconteceu em todos os grupos, sendo mais pronunciada no CoQ10 200mg. Na viscoelasticidade, houve redução dos parâmetros da curva de sucção R5 e R6 apenas no grupo CoQ10 100mg e aumento de R9 nos grupos CoQ10 100mg e CoQ10 200mg, sendo R0, R2 e R7 sem alterações. Na hidratação cutânea, todos os grupos apresentaram melhora. A área de epiderme celular aumentou no grupo CoQ10 100mg e CoQ10 200mg. A relação entre a área de epiderme celular e a extensão total da superfície epidérmica reduziu no grupo placebo e aumentou nos grupos CoQ10 100mg e, principalmente, no CoQ10 200mg. Na derme profunda, a área de colágeno novo aumentou no grupo CoQ10 100mg, enquanto a área de colágeno antigo reduziu. Na derme

superficial, houve redução de fibras elásticas no grupo placebo e CoQ10 100mg. Na derme profunda, a diminuição de fibras elásticas ocorreu no grupo placebo e CoQ10 100mg. Na derme superficial e profunda, o grupo CoQ10 200mg a área de fibra elástica permaneceu inalterada. A expressão de Nrf2 por IHQ na epiderme e derme papilar reduziu no grupo CoQ10 100mg. Na derme reticular, houve diminuição de Nrf2 nos grupos placebo e CoQ10 100mg. O grupo CoQ10 200mg apresentou valores mais altos de Nrf2 na epiderme, derme papilar e reticular, comparados aos grupos placebo e CoQ10 100mg. A expressão da p53 epidérmica por IHQ calculada pelo escore de Liang mostrou redução nos grupos CoQ10 100mg e CoQ10 200mg. Entre os grupos, não houve diferença na autopercepção de melhora estética global, na hidratação, na TEWL, na espessura e densidade dérmica ao USG, na extensão da junção dermo-epidérmica (JDE), na área histológica marcada por picosirius sem polarização, na função renal, hepática e hematológica, nas citocinas séricas (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10), na dosagem sérica de CoQ10 nem na expressão de genes por RT-qPCR para metaloproteinases, fatores oxidantes e antioxidantes. As correlações de Spearman não evidenciaram correlações independentes fortes. A suplementação oral de CoQ10 demonstrou, portanto, benefícios cutâneos em idosas, relacionados a eritema facial, hiperpigmentação, viscoelasticidade, área de epiderme celular, síntese de colágeno, preservação de fibras elásticas, manutenção do fator antioxidante Nrf2 e redução de p53, sobretudo na dose diária de 200mg, sem efeitos adversos ou toxicidade evidentes no período analisado. Os resultados encontrados contribuem para a saúde da pele no envelhecimento, tornando a CoQ10 um suplemento a ser considerado para a população idosa.

**Palavras-chave:** Coenzimas. Envelhecimento. Envelhecimento da pele. Colágeno. Oxidantes. Antioxidantes. Suplementos nutricionais.

## ABSTRACT

Nogueira MAS. Clinical, histological and laboratory evaluation of skin aging in the oral supplementation of coenzyme Q10 in elderly women [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2022.

The present study evaluated the antioxidant action of oral coenzyme Q10 (CoQ10) on skin aging in elderly women through a triple-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. Of the 50 screened participants, 45 were allocated into 3 groups (placebo, CoQ10 100mg/day and CoQ10 200mg/day) and followed up for 12 weeks. Assessments were performed before and after supplementation and included: clinical analysis of self-perception of overall aesthetic improvement, stereophotogrammetry for blood vessels and skin hyperpigmentation, elasticity, hydration, transepidermal water loss (TEWL), thickness and echo density of the dermis by 20-MHz ultrasound (US), histological analysis with stains to highlight epidermis (hematoxylin-eosin), collagen (picrosirius) and elastic fibers (Weigert), expression of Nrf2 and p53 proteins by immunohistochemistry (IHC), laboratory parameters of renal, hepatic, and hematological function, serum cytokines by flow cytometry, serum CoQ10 measurement, gene expression by real-time PCR (RT-qPCR) for metalloproteinases, and oxidant and antioxidant factors in the skin. There was an improvement in global aesthetic self-perception in all groups, with no differences. The reduction in facial erythema was significant in the CoQ10 100mg and CoQ10 200mg groups, being more pronounced in the latter. The reduction in the area and intensity of cutaneous hyperpigmentation occurred in all groups, being more pronounced in the CoQ10 200mg. In viscoelasticity, there was a reduction in the parameters of the suction curve R5 and R6 only in the CoQ10 100mg group and an increase in R9 in the CoQ10 100mg and CoQ10 200mg groups, with R0, R2 and R7 unchanged. In skin hydration, all groups showed improvement. The cell epidermis area increased in the CoQ10 100mg and CoQ10 200mg groups. The relationship between the cell epidermis area and the total extent of the epidermal surface decreased in the placebo group and increased in the CoQ10 100mg and, mainly, in the CoQ10 200mg group. In the deep dermis, the area of new collagen increased in the CoQ10 100mg group, while the area of old collagen decreased. In the superficial dermis, there was a reduction in elastic fibers in the placebo group

and CoQ10 100mg. In the deep dermis, the decrease in elastic fibers occurred in the placebo group and CoQ10 100mg. In the superficial and deep dermis, in the CoQ10 200mg group, the elastic fiber area remained unchanged. The expression of Nrf2 by IHC in the epidermis and papillary dermis reduced in the CoQ10 100mg group. In the reticular dermis, there was a decrease in Nrf2 in the placebo and CoQ10 100mg groups. The CoQ10 200mg group had higher values of Nrf2 in the epidermis, papillary and reticular dermis, compared to the placebo and CoQ10 100mg groups. The expression of epidermal p53 by IHC calculated by the Liang score showed a reduction in the CoQ10 100mg and CoQ10 200mg groups. Between the groups, there was no difference in the self-perception of global aesthetic improvement, in hydration, in TEWL, in dermal thickness and density at US, in the extension of the dermal-epidermal junction (DEJ), in the histological area marked by picosirius without polarization, in renal, hepatic and hematological function, in serum cytokines (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10), in the serum level of CoQ10 or in the expression of genes by RT-qPCR for metalloproteinases, oxidant and antioxidant factors. Spearman correlations did not show strong independent correlations. Therefore, oral CoQ10 supplementation has shown cutaneous benefits in elderly women, related to facial erythema, hyperpigmentation, viscoelasticity, cellular epidermis area, collagen synthesis, preservation of elastic fibers, maintenance of the antioxidant factor Nrf2 and reduction of p53, especially at the daily dose of 200mg, without evident adverse effects or toxicity in the analyzed period. The results found contribute to skin health in aging, making CoQ10 a supplement to consider for the elderly population.

**Keywords:** Coenzymes. Aging. Skin aging. Collagen. Oxidants. Antioxidants. Dietary supplements.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da Coenzima Q10 .....	50
Figura 2 - Diagrama de fluxo das voluntárias do ensaio clínico .....	78
Figura 3 - Gráfico de barras evidenciando a autopercepção das participantes da pesquisa sobre melhora estética global, após suplementação oral nos grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14).....	82
Figura 4 - <i>Boxplot</i> evidenciando o percentual de área da face marcada por vasos sanguíneos, através da estereofotogrametria, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=8), CoQ10 100mg (n=9) e CoQ10 200mg (n=10) .....	83
Figura 5 - <i>Boxplot</i> evidenciando a intensidade da marcação, por estereofotogrametria, na área da face marcada por vasos sanguíneos, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=8), CoQ10 100mg (n=9) e CoQ10 200mg (n=10).....	84
Figura 6 - <i>Boxplot</i> evidenciando o percentual de área da face marcada por hiperpigmentações cutâneas, através da estereofotogrametria, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=8), CoQ10 100mg (n=9) e CoQ10 200mg (n=10) .....	86
Figura 7 - <i>Boxplot</i> evidenciando a intensidade da marcação de hiperpigmentações cutâneas, por estereofotogrametria, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=8), CoQ10 100mg (n=9) e CoQ10 200mg (n=10).....	87
Figura 8 - <i>Boxplot</i> evidenciando o parâmetro de viscoelasticidade R5, que representa elasticidade líquida em percentual, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14) .....	89
Figura 9 - <i>Boxplot</i> evidenciando o parâmetro de viscoelasticidade R6, que representa a porção de viscoelasticidade durante a curva de sucção, em	

percentual, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14).....	90
Figura 10 - <i>Boxplot</i> evidenciando o parâmetro de viscoelasticidade R9, que representa fadiga após repetidas sucções, em milímetros, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14).....	91
Figura 11 - <i>Boxplot</i> evidenciando o conteúdo hídrico da camada córnea, em unidades arbitrárias (U.A.), nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=14), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14).....	93
Figura 12 - <i>Boxplot</i> evidenciando a área de epiderme celular, em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ), nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14).....	95
Figura 13 - Espessura da epiderme. Imagens de campos de aumento (20x) das lâminas de amostras cutâneas do antebraço, coradas por hematoxilina-eosina..	96
Figura 14 - <i>Boxplot</i> evidenciando a razão entre a área de epiderme celular, em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ), e o comprimento total de superfície epidérmica, em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14).....	97
Figura 15 - <i>Boxplot</i> evidenciando percentual da área da derme profunda marcada por colágeno novo pela coloração de picrosirius vermelho com polarização, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14).....	100
Figura 16 - <i>Boxplot</i> evidenciando percentual da área da derme profunda marcada por colágeno antigo pela coloração de picrosirius vermelho com polarização, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14).....	101
Figura 17 - <i>Boxplot</i> evidenciando percentual da área da derme superficial marcada por fibras elásticas, pela coloração de Weigert, nos tempos pré e pós	

suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14) ..... 103

Figura 18 - *Boxplot* evidenciando percentual da área da derme superficial marcada por fibras elásticas, pela coloração de Weigert, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14) ..... 104

Figura 19 - *Boxplot* evidenciando percentual da área da epiderme e derme superficial marcada por Nrf2, pela imuno-histoquímica, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14) ..... 106

Figura 20 - *Boxplot* evidenciando a intensidade da marcação de Nrf2 na epiderme e derme superficial, por imuno-histoquímica, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14) 108

Figura 21 - *Boxplot* evidenciando percentual da área da derme profunda marcada por Nrf2, pela imuno-histoquímica, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)..... 110

Figura 22 - *Boxplot* evidenciando a intensidade da marcação de Nrf2 na derme profunda, por imuno-histoquímica, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)..... 112

Figura 23 - *Boxplot* evidenciando o percentual de núcleos epidérmicos com expressão da proteína p53, pela imuno-histoquímica, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14) ..... 113

Figura 24 - *Boxplot* evidenciando a classificação da expressão da proteína p53 nos núcleos epidérmicos, pela imuno-histoquímica, estabelecida em 4 graus, de 0 a 3, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14) ..... 114

Figura 25 - *Boxplot* evidenciando a classificação de Liang para expressão da proteína p53 nos núcleos epidérmicos, pela imuno-histoquímica, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)..... 115

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas da população estudada .....	79
Tabela 2 - Diferença entre médias do percentual de área da face marcada por vasos sanguíneos, através da estereofotogrametria, pré e pós suplementação, nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg .....	83
Tabela 3 - Diferença entre médias da intensidade de marcação, por estereofotogrametria, em unidades arbitrárias (U.A.), na área da face marcada por vasos sanguíneos, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg .....	85
Tabela 4 - Diferença entre médias do percentual de área da face marcada por hiperpigmentações cutâneas, através da estereofotogrametria, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg .....	86
Tabela 5 - Diferença entre médias da intensidade de marcação, por estereofotogrametria, em unidades arbitrárias (U.A.), na área da face marcada por hiperpigmentações cutâneas, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg .....	88
Tabela 6 - Diferença entre médias do percentual de viscoelasticidade líquida, representada pelo parâmetro R5, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg .....	89
Tabela 7 - Diferença entre médias do percentual de viscoelasticidade na sucção, representada pelo parâmetro R6, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg .....	90
Tabela 8 - Diferença entre médias do parâmetro de viscoelasticidade R9, que representa fadiga após repetidas sucções, em milímetros, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg .....	92

Tabela 9 - Diferença entre médias do conteúdo hídrico da camada córnea, em unidades arbitrárias (U.A.), pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg .....	93
Tabela 10 - Diferença entre médias da área de epiderme celular, em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ), pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg.....	95
Tabela 11 - Diferença entre médias da razão entre área de epiderme celular, em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ), e comprimento total de superfície epidérmica, em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg.....	98
Tabela 12 - Diferença entre médias dos percentuais da área da derme profunda marcada por colágeno novo, pela coloração de picrosirius vermelho com polarização, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg .....	100
Tabela 13 - Diferença entre médias dos percentuais da área da derme profunda marcada por colágeno antigo pela coloração de picrosirius vermelho com polarização, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg .....	102
Tabela 14 - Diferença entre médias dos percentuais da área da derme superficial marcada por fibras elásticas, pela coloração de Weigert, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg .....	103
Tabela 15 - Diferença entre médias dos percentuais da área da derme superficial marcada por fibras elásticas, pela coloração de Weigert, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg .....	105
Tabela 16 - Diferença entre médias dos percentuais da área da epiderme e derme superficial marcada por Nrf2, pela imuno-histoquímica, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg .....	106

Tabela 17 - Diferença entre médias dos percentuais da área da epiderme e derme superficial marcada por Nrf2, pela imuno-histoquímica, nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg, comparada nos períodos pré e pós suplementação ..	107
Tabela 18 - Diferença entre médias da intensidade da marcação de Nrf2 na epiderme e derme superficial, pela imuno-histoquímica, pré e pós suplementação, comparada entre os grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg .....	108
Tabela 19 - Diferença entre médias da intensidade da marcação de Nrf2 na epiderme e derme superficial, pela imuno-histoquímica, nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg, comparada nos períodos pré e pós suplementação .....	109
Tabela 20 - Diferença entre médias dos percentuais da área da derme profunda marcada por Nrf2, pela imuno-histoquímica, pré e pós suplementação, comparada entre os grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg .....	110
Tabela 21 – Diferença entre médias dos percentuais da área da derme profunda marcada por Nrf2, pela imuno-histoquímica, nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg, comparada nos períodos pré e pós suplementação .....	111
Tabela 22 - Diferença entre médias da intensidade da marcação de Nrf2 na derme profunda, pela imuno-histoquímica, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg .....	112
Tabela 23 - Diferença entre médias dos percentuais de núcleos epidérmicos com expressão da proteína p53, pela imuno-histoquímica, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg .....	114
Tabela 24 - Diferença entre médias da classificação da expressão da proteína p53 nos núcleos epidérmicos, pela imuno-histoquímica, estabelecida em 4 graus, de 0 a 3, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg .....	115
Tabela 25 - Diferença entre médias da classificação de Liang para expressão da proteína p53 nos núcleos epidérmicos, pela imuno-histoquímica, pré e pós	

suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg  
..... 116

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>28</b>
1.1	ENVELHECIMENTO .....	28
1.1.1	Definição de idoso .....	28
1.1.2	Definição de envelhecimento .....	29
1.1.3	Contextualização .....	32
1.1.4	Fatores intrínsecos .....	34
1.1.4.1	Etnia .....	34
1.1.4.2	Variações anatômicas .....	35
1.1.5	Fatores extrínsecos .....	35
1.1.5.1	Estilo de vida .....	36
1.1.5.2	Tabagismo .....	36
1.1.5.3	Radiação UV .....	37
1.1.6	Fisiologia do envelhecimento .....	38
1.1.6.1	Estresse oxidativo .....	39
1.1.6.2	Inflamação .....	41
1.1.6.3	Metaloproteinases .....	42
1.1.6.4	Via de antioxidação do Nrf2 .....	43
1.1.6.5	Via sinalizadora da senescência celular relacionada ao TGF- $\beta$ .....	45
1.1.6.6	Via de citoproteção e senescência celular relacionada à p53.....	46
1.1.7	Manifestações clínicas .....	47
1.1.8	Evidências histológicas .....	47
1.2	ANTIOXIDANTES ORAIS .....	49
1.2.1	Coenzima Q10.....	50
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>56</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>57</b>

3.1	OBJETIVO PRINCIPAL.....	57
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	57
<b>4</b>	<b>MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
4.1	DELINEAMENTO .....	59
4.2	POPULAÇÃO .....	59
4.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	60
4.4	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	60
4.5	INTERVENÇÃO.....	61
4.6	PARÂMETROS CLÍNICOS .....	61
4.6.1	Observações de eventos adversos, sinais e sintomas clínicos.....	61
4.6.2	Autopercepção da melhora estética global .....	62
4.6.3	Imagens faciais por estereofotogrametria .....	62
4.6.4	Viscoelasticidade da pele .....	62
4.6.5	Hidratação da pele .....	63
4.6.6	Perda de água transepidérmica ou <i>Transepidermal Water Loss</i> (TEWL) .....	64
4.6.7	Exame ultrassonográfico da pele .....	64
4.7	PARÂMETROS HISTOLÓGICOS.....	65
4.7.1	Hematoxilina-eosina (HE).....	66
4.7.2	Picrosirius vermelho .....	66
4.7.2.1	Picrosirius vermelho sem polarização .....	66
4.7.2.2	Picrosirius vermelho com polarização .....	67
4.7.3	Weigert .....	67
4.7.4	Expressão de proteínas por imuno-histoquímica (IHQ) .....	68
4.8	PARÂMETROS LABORATORIAIS .....	70
4.8.1	Exames bioquímicos .....	70

4.8.2	Dosagem de citocinas séricas por <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA).....	71
4.8.3	Dosagem de coenzima q10 no sangue (ELISA) .....	71
4.8.4	Expressão dos genes por PCR em tempo real (q-RT-PCR) para metaloproteinases, proto-oncogenes e fatores antioxidantes na pele .	72
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	75
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>76</b>
5.1	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO .....	76
5.2	PARÂMETROS CLÍNICOS .....	80
5.2.1	Relatos e observações de eventos adversos, sinais e sintomas clínicos .....	80
5.2.2	Autopercepção de melhora estética global .....	81
5.2.3.	Imagens faciais por estereofotogrametria .....	82
5.2.3.1	Vasos sanguíneos .....	82
5.2.3.2.	Hiperpigmentações cutâneas .....	85
5.2.4	Viscoelasticidade da pele .....	88
5.2.5.	Hidratação da pele .....	92
5.2.6	Perda de água transepidérmica ou Trans-Epidermal Water Loss ( <i>TEWL</i> ) .....	94
5.2.7	Exame ultrassonográfico da pele .....	94
5.2.7.1	Espessura total da pele (micrômetros).....	94
5. 2.7.2	Densidade da derme .....	94
5.3	PARÂMETROS HISTOLÓGICOS .....	94
5.3. 1	Hematoxilina-eosina (HE).....	94
5.3.1.1	Área de epiderme celular .....	94
5.3.1.2	Razão entre área total de epiderme celular e extensão total da superfície epidérmica .....	97
5.3.1.3	Extensão da junção dermo-epidérmica (JDE).....	98

5.3.1.4	Razão entre extensão da junção dermo-epidérmica (JDE) e superfície da epiderme.....	98
5.3.2	Picrosirius vermelho .....	99
5.3.2.1	Picrosirius vermelho sem polarização .....	99
5.3.2.2	Picrosirius vermelho com polarização .....	99
5.3.3	Weigert .....	102
5.3.4	Expressão das proteínas por imuno-histoquímica (IHQ).....	105
<b>5.3.4.1</b>	Nrf2.....	105
5.3.4.2.	p53.....	113
5.4	<b>PARÂMETROS LABORATORIAIS</b> .....	116
5.4.1	Exames bioquímicos .....	116
5.4.2	Dosagem de citocinas séricas por Cytometric Bead Array (CBA).....	116
5.4.3	Dosagem de coenzima Q10 sérica (ELISA).....	117
5.4.4	Expressão dos genes por PCR em tempo real (q-RT-PCR) para metaloproteinases, proto-oncogenes e fatores antioxidantes na pele	117
5.5	<b>CORRELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS</b> .....	117
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>119</b>
6.1	<b>PARÂMETROS CLÍNICOS</b> .....	119
6.1.1	Observações de eventos adversos, sinais e sintomas clínicos.....	119
6.1.2	Autopercepção da melhora estética global .....	120
6.1.3	Imagens faciais por estereofotogrametria .....	121
6.1.3.1	Vasos sanguíneos .....	121
6.1.3.2	Hiperpigmentações cutâneas .....	122
6.1.4	Viscoelasticidade da pele .....	124
6.1.5	Hidratação da pele .....	126

6.1.6	Perda de água transepidérmica ou <i>Transepidermal Water Loss</i> (TEWL) .....	127
6.1.7	Exame ultrassonográfico da pele .....	127
6.2	PARÂMETROS HISTOLÓGICOS .....	128
6.2.1	Hematoxilina-eosina (HE).....	128
6.2.1.1	Área de epiderme celular e razão entre área total de epiderme celular e extensão total da superfície epidérmica .....	128
6.2.1.2	Extensão da junção dermo-epidérmica (JDE) e razão entre JDE e superfície da epiderme .....	130
6.2.2	Picrosirius vermelho .....	130
6.2.2.1	Picrosirius vermelho sem polarização .....	130
6.2.2.2	Picrosirius vermelho com polarização .....	132
6.2.3	Weigert .....	134
6.2.4	EXPRESSÃO DE PROTÉINAS POR IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ) .... .....	136
6.2.4.1	Nrf2.....	136
6.2.4.2	p53.....	141
6.3	PARÂMETROS LABORATORIAIS .....	144
6.3.1	Exames bioquímicos .....	144
6.3.2	Dosagem de citocinas séricas por <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA).....	144
6.3.3	Dosagem de coenzima Q10 sérica (ELISA).....	145
6.3.4	Expressão dos genes por PCR em tempo real (q-RT-PCR) para metaloproteinases, proto-oncogenes e fatores antioxidantes na pele	147
6.4	CORRELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS .....	149
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>150</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>151</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>175</b>

<b>ANEXOS .....</b>	<b>215</b>
---------------------	------------

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 ENVELHECIMENTO**

### **1.1.1 Definição de idoso**

A definição de envelhecimento e o limite de idade para se considerar uma pessoa idosa são motivos de inúmeros debates internacionais. Em relação à idade, o cerne da discussão está no fato de um indivíduo de 65 anos, atualmente, possuir capacidade física e cognitiva compatível com 40 a 45 anos de idade, 30 anos atrás (Lima; Mendes, 2019).

Em 2018, a Sociedade Italiana de Geriatria e Gerontologia adotou o limite de 75 anos ou mais para definir idosos naquele país. Este novo limite surgiu a partir da ideia de se considerar uma pessoa idosa quando estiver a 10 anos de atingir a média de idade compatível com a expectativa de vida, numa determinada região. Deste modo, o aumento da expectativa de vida elevaria proporcionalmente a idade para conceituar idosos. Assim, esta nova definição na Itália tomou por base a expectativa de vida de 83 anos para homens e de 86 anos para mulheres naquele ano. Seguindo a mesma tendência, o Reino Unido estuda a possibilidade de aumentar o limite de idade de idosos para 70 anos (Lima; Mendes, 2019).

No Brasil, a Lei número 10.741, de 1º de outubro de 2003, dispõe sobre o Estatuto do Idoso. O artigo 1º desta lei determina como idosa a pessoa com idade igual ou superior a 60 anos (Brasil, 2003). Considerando a projeção de expectativa de vida média brasileira em 2019 igual a 76,5 anos (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2021), surgiu o Projeto de Lei número 5383/19, que propõe alterar para 65 anos a idade de classificação para idosos. O projeto tramita na Câmara Legislativa brasileira e será analisado em caráter conclusivo pelas comissões de Defesa dos Direitos da Pessoa Idosa (CIDOSO), de Constituição e Justiça e de Cidadania (Campos, 2019).

### 1.1.2 Definição de envelhecimento

As definições de envelhecimento sofreram inúmeras lapidações ao longo dos anos, por biólogos evolucionistas (Libertini, 2019). Na década de 70, o principal conceito de envelhecimento era relacionado a qualquer mudança dependente do tempo, ocorrida após o alcance da maturidade de tamanho, forma e função de um organismo, excluídas as alterações sazonais e diárias compatíveis com ritmos biológicos (Rockstein; Chesky; Sussman, 1977). Em 1979, foi consolidado o conceito de envelhecimento como o aumento progressivo, ao longo da vida ou após uma determinada fase da vida, da probabilidade de um indivíduo morrer durante a próxima unidade de tempo, por causas aleatórias (Comfort, 1979).

Já na década de 80, a definição de maior respaldo postulou o envelhecimento como o aumento de mortalidade relacionado à progressão da idade cronológica (Libertini, 1988). Michael Rose (1991), por sua vez, descreveu envelhecimento como um declínio persistente nas características de aptidão relacionadas à idade de um organismo, decorrente da degeneração fisiológica interna. Posteriormente, surgiu o conciso conceito de senescência atuarial (Holmes; Austad, 1995).

Em 2007, Rose resgatou ideias publicadas 40 anos antes por William D. Hamilton, definidas pelas forças de seleção natural de Hamilton. De acordo com esta teoria, a redução de fecundidade relacionada à progressão da idade funcionaria como uma seleção natural, interrompendo a proliferação de linhagens reprodutivas danificadas. Assim, não seriam proliferadas células com acúmulo de mutações deletérias, de influências ambientais prejudiciais e de doenças contagiosas, capazes de levar à completa extinção das espécies. Portanto, permitiria a sobrevivência apenas das linhagens potencialmente imortais (Hamilton, 1966; Rose et al., 2007).

Em 2012, Thomas Flatt contestou a definição de Rose alegando que o declínio de função com o aumento da idade não ocorre de forma persistente até atingir o ponto nulo. Ao invés disto, defendeu a existência de um platô antes de chegar ao zero (Flatt, 2012). Em 2020, por sua vez, ganhou destaque o conceito

da perda funcional progressiva acompanhada pela diminuição da fertilidade e pelo aumento da mortalidade com o avançar da idade cronológica (Kirkwood; Austad, 2008). Mais recentemente, o envelhecimento foi sucintamente conceituado como o aumento, dependente da idade, do risco de morte (Lenart; Bienertová-Vaškú; Berec, 2018) ou ainda como a razão entre danos acumulados e a ação de mecanismos compensatórios (Thuault, 2021).

Outro conceito que voltou às discussões atuais é o de envelhecimento saudável, que está além da ausência de doenças, englobando também a manutenção de habilidades funcionais ao longo da vida (United Nations, 2020). O termo “envelhecimento bem sucedido” foi amplamente difundido por Rowe e Kahn, que utilizaram três fatores para avaliar um bom processo de envelhecimento: evitar doenças e incapacidades por elas geradas, conservar elevadas funções físicas e cognitivas e ter um engajamento ativo com a vida (Rowe; Kahn, 1997).

As diferenças culturais podem também modificar a autopercepção de saúde e o próprio conceito de envelhecer bem (Teixeira; Neri, 2008; Hung; Kempen; Vries, 2010). Assim, surgiram definições mais amplas de “envelhecimento harmônico”, englobando interpretações individuais de um processo adequado de envelhecimento (Liang; Luo, 2012). Apesar de amplas discussões e conceituações de um envelhecimento adequado, muitas das intervenções para melhorar a saúde da população idosa são promovidas tardiamente, quando alguma doença ou disfunção já está em curso (Berkman; Ertel; Glymour, 2011).

Do ponto de vista da Biogerontologia, o envelhecimento é classicamente visto como um processo estocástico que ocorre após o amadurecimento reprodutivo e resulta da redução da energia disponível para manter a fidelidade molecular. Após o sucesso reprodutivo, a energia para manter o bom funcionamento do organismo diminui e ocorre o aumento das desordens moleculares sistêmicas, apesar do funcionamento adequado dos processos reparativos (Hayflick, 2000).

Além de descrever o envelhecimento com base no indivíduo, algumas definições segmentam o conceito de acordo com fatores influenciadores. Neste

formato, o envelhecimento é visto como um processo no qual determinantes intrínsecos e extrínsecos levam, progressivamente, à perda da estrutura de integridade e função fisiológica (Friedman, 2005). Os fatores considerados intrínsecos são aqueles que ocorrem inevitavelmente como uma consequência natural das alterações fisiológicas ao longo do tempo, mediadas por padrões geneticamente determinados. Por outro lado, os fatores extrínsecos são controláveis em diferentes níveis e incluem exposição à radiação solar, poluição, tabagismo e diferentes componentes ligados ao estilo de vida, como dieta, qualidade do sono, atividade física e saúde global (Bergfeld, 1997).

Holisticamente, o envelhecimento afeta absolutamente todas as células de um organismo, todos os diferentes sistemas fisiológicos, todas as especialidades médicas, além das diferentes estruturas de sociedades, com suas abordagens éticas e econômicas (Greengross, 1997). A pele humana, por sua vez, corresponde a um sexto do peso corpóreo total e constitui o indicador de envelhecimento mais visível (Farage et al., 2008), sendo um verdadeiro espelho do que ocorre nos demais órgãos do corpo humano (Makrantonaki; Zouboulis; German National Genome Research Network 2, 2007).

O envelhecimento não é, portanto, uma doença e esta diferenciação é crucial para compreender por que a resolução das principais causas de morte nos idosos, como doenças cardiovasculares, acidentes vasculares cerebrais e neoplasias malignas, contribui pouco para desvendarmos os fundamentos biológicos da senescência (Hayflick, 2000). Estima-se que se todas estas três principais causas de morte fossem resolvidas, a expectativa de vida humana aumentaria em apenas 15 anos, pois o envelhecimento lideraria as causas de mortalidade (Anderson, 1999).

O estudo das doenças associadas ao envelhecimento e à manipulação do desenvolvimento de formas de vida inferiores dominam o que equivocadamente é descrito como o campo de pesquisa do envelhecimento. Um bom exemplo disto é o fato de mais da metade do orçamento de envelhecimento do Instituto Nacional Americano ser investido em pesquisas sobre a doença de Alzheimer (Hayflick, 2000). Entretanto, é importante destacar que a completa resolução desta doença,

acrescentaria apenas 19 dias na expectativa global de vida humana (Anderson, 1999).

Devemos enfatizar que autênticas pesquisas em envelhecimento deveriam ter como objetivo principal não apenas aumentar a longevidade, mas fazê-lo com qualidade de vida adequada, sem doenças ou dependências funcionais (Hayflick, 2000).

### **1.1.3 Contextualização**

Mundialmente, a população acima de 65 anos alcançou a marca de 727 milhões de pessoas, em 2020. A previsão para 2050 é que a quantidade de idosos duplique globalmente, atingindo a marca de cerca de 1,5 bilhão de pessoas (United Nations, 2020). No Brasil, a transição demográfica ainda está acontecendo, com aumento significativo da proporção de indivíduos com 65 anos ou mais em relação ao total da população. Em 1991, os maiores de 65 anos de idade representavam 4,8% do contingente populacional, passando para 5,9% em 2000, até atingir 7,4% em 2010 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011).

Acompanhando esta tendência, em todas as regiões do nosso País, o número relativo de idosos com 65 anos ou mais na população aumentou, respectivamente de 2000 a 2010, passando de 3,6% para 4,6% na região Norte, de 6,3% para 8,1% na região Sul, de 6,4% para 8,1% na região Sudeste, de 5,8% para 7,2% na região Nordeste, de 4,3% a 5,8% na região Centro-Oeste (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2013).

Os principais motivos deste crescimento populacional de idosos estão relacionados a aspectos sociais e econômicos, como aumento da expectativa de vida e redução das taxas de natalidade. Globalmente, o aumento da expectativa de vida é mais significativo em mulheres. No Brasil, de acordo com o último censo demográfico realizado em 2010, a expectativa de vida ao nascer para homens era de 70,21 anos, enquanto para mulheres representava cerca de sete anos a mais, alcançando 77,60 anos (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2013). Em

2021, a estimativa de expectativa de vida para homens brasileiros aumentou para 73,50, enquanto para mulheres atingiu 80,46 anos (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2021).

Apesar desta maior longevidade, mundialmente, as mulheres idosas possuem maior risco de viver na pobreza, especialmente quando vivem sozinhas e não como parte de um casal (United Nations, 2019) e apresentam maior risco de doenças psiquiátricas, como depressão (United Nations, 2020). Em países desenvolvidos como os Estados Unidos, em 2014, cerca de 19% das idosas que viviam sozinhas estavam em situação de pobreza, enquanto esta mesma taxa era de 15% para homens idosos (United Nations, 2020). Já nos países em desenvolvimento, como o Brasil, o risco de pobreza em idosos é ainda mais preocupante, uma vez que as proteções sociais são inadequadas ou inexistentes e muitos idosos são inteiramente dependentes do apoio da família. (United Nations, 2020).

Além dos dados quantitativos, a forma como a população idosa vive, globalmente, também está se transformando, principalmente através de mudanças da qualidade de vida, do tamanho e composições das habitações e das relações interpessoais. Aspectos como diferentes perfis de casamentos, coabitações e divórcios, aumento dos níveis educacionais das populações mais jovens, crescente movimento migratório das áreas rurais para urbanas e rápido desenvolvimento econômico contribuem para este novo panorama, onde muitos idosos vivem sozinhos, precisando cada vez mais de independência física e mental (United Nations, 2020).

Aumentar a expectativa de vida e, conseqüentemente, viver mais que as gerações anteriores não definem, portanto, uma melhor forma de envelhecimento. Além de prolongar a vida humana em anos, é essencial promover qualidade de vida, saúde e independência aos idosos. A base da pirâmide etária global continua diminuindo, gerando proporcionalmente maior número de idosos que jovens. Portanto, é imprescindível o desenvolvimento de estudos e pesquisas que mantenham a população idosa cada vez mais saudável, atuando na prevenção e promoção de saúde, reduzindo a progressiva dependência dos familiares.

Apesar destes números populacionais crescentes, cerca de 90% das referências científicas relacionadas a mecanismos de envelhecimento utilizadas até hoje foram obtidas a partir de estudos em animais e, portanto, não podem ser extrapoladas para humanos (Thuault, 2021). Além disso, a maioria dos estudos populacionais de envelhecimento destaca países como Japão, Itália e Alemanha, enquanto países em desenvolvimento seguem no processo de transição demográfica, enfrentando questões peculiares no contexto social e cultural, sem muitos estudos (Coulmas, 2007; Sciubba, 2020).

Ante o exposto, apesar de formarem mundialmente o maior contingente populacional acima de 60 anos (United Nations, 2019), as mulheres encontram atualmente condições sociais, econômicas e culturais desafiadoras no envelhecimento, especialmente em países como o Brasil. Assim, o autocuidado e a melhora da qualidade de vida ao tratar o envelhecimento cutâneo, otimizando a função da barreira cutânea, proporcionando melhora da função imunológica da pele e desenvolvendo a autoestima em mulheres idosas podem contribuir para um envelhecimento mais saudável. Portanto, urge o desenvolvimento de estudos científicos direcionados a estas populações.

#### **1.1.4 Fatores intrínsecos**

Serão detalhados dois dos principais fatores intrínsecos relacionados ao envelhecimento: etnia e variações anatômicas.

##### **1.1.4.1 Etnia**

A diferença de pigmentação é a principal característica relacionada ao efeito do envelhecimento em diferentes etnias. Quanto maior a pigmentação cutânea, maior o efeito protetor contra a ação do fotoenvelhecimento, devido ao papel protetor da melanina na pele. Assim, os negros apresentam pouca diferença de envelhecimento entre áreas cobertas da pele e regiões habitualmente fotoexpostas (Robinson, 1999).

Além disso, a pele negra é mais compacta e apresenta conteúdo lipídico intercelular maior que a caucasiana, também contribuindo como fatores para resistência ao envelhecimento cutâneo (Robinson, 1999).

Já em relação aos asiáticos, o enrugamento tende a ocorrer mais tarde e com menor gravidade em relação aos caucasianos, mas os fatores responsáveis por estas diferenças ainda não foram explicados (Süde et al, 2005).

#### 1.1.4.2 Variações anatômicas

Grandes variações em parâmetros cutâneos são observadas dependendo da parte do corpo estudada, determinando a necessidade de padronizar o sítio anatômico onde a pele será avaliada, para que os resultados sejam comparáveis (Elias, 1996). A espessura da pele, por exemplo, pode variar de menos de 0,5mm nas pálpebras até mais de 6mm nas plantas (Hwang; Kim; Kim, 2006; Lee; Hwang, 2002). A perda de espessura com o passar dos anos também é variável e, na região temporal, por exemplo, tende a ser mais lenta que nos antebraços. A redução na percepção sensorial gerada pelo envelhecimento é mais pronunciada no sulco nasolabial e na região malar, se comparadas à fronte e ao mento (Elias, 1996).

Nas regiões do corpo onde há alto fluxo sanguíneo, como lábios, dedos, fronte e ponta nasal, observa-se uma redução do fluxo com o avançar da idade, enquanto nas áreas de baixo fluxo, a irrigação sanguínea permanece semelhante com o passar dos anos (Waller; Maibach, 2005).

#### 1.1.5 Fatores extrínsecos

Serão enfatizados, a seguir, os seguintes fatores extrínsecos relacionados ao envelhecimento: estilo de vida, tabagismo e radiação ultravioleta (UV).

#### 1.1.5.1 Estilo de vida

A pele é afetada por diferentes condições ambientais, como temperatura, velocidade do vento e umidade. Um aumento de 7 a 8 graus Celsius na temperatura da pele é capaz de duplicar a perda de água por evaporação. Baixas temperaturas enrijecem a pele e reduzem este tipo de perda de água, pois as proteínas e lipídeos estruturais são extremamente dependentes da temperatura para manter a conformação adequada (McCallion; Po, 1993).

Alguns medicamentos também afetam a fisiologia da pele. As estatinas, por exemplo, podem induzir um aumento da descamação cutânea (McCallion; Po, 1993).

#### 1.1.5.2 Tabagismo

Ao lado da radiação ultravioleta, o tabagismo é um dos principais fatores relacionados ao envelhecimento cutâneo (Kennedy et al., 2003). O consumo de cigarros está diretamente relacionado à elastose em ambos os sexos e às telangiectasias em homens. O tabagismo causa danos cutâneos inicialmente por reduzir o fluxo dos capilares sanguíneos, gerando privação de oxigênio e nutrientes nos tecidos da pele. Já foi demonstrado que fumantes apresentam menos fibras colágenas e elásticas na derme, tornando a pele mais flácida, rígida e menos elástica (Leow; Maibach, 1998). A vasoconstrição gerada pela nicotina também contribui para o enrugamento da pele (Castelo-Branco et al., 1998).

O tabagismo aumenta a atipia dos queratinócitos e a rugosidade da pele (Friedman, 2005). Alguns estudos mostram clara relação dose-resposta entre tabagismo e enrugamento, evidenciando-o como maior contribuinte para as rugas faciais, superando até mesmo a exposição solar. Controlando variáveis como idade, exposição solar e pigmentação da pele, o tabagismo demonstrou ser um fator de risco independente para o enrugamento precoce (Leow; Maibach, 1998). Outros estudos demonstraram que a cessação do tabagismo é benéfica para características relacionadas ao envelhecimento (Pirie et al., 2013).

O risco de rugas moderadas a graves entre fumantes foi 2,57 vezes maior que em não fumantes, com intervalo de confiança de 1,83 a 3,06 e  $P < 0,005$  (Castelo-Branco et al., 1998). Os escores de rugas em fumantes foram três vezes maiores que em não fumantes, com um significativo aumento do risco quando se ultrapassa um consumo de 10 maços-ano (Farage et al., 2008). O tabagismo também aumenta a formação de radicais livres e é um fator de risco importante para o carcinoma espinocelular (Leow; Maibach, 1998).

#### 1.1.5.3 Radiação UV

Dentre todos os fatores extrínsecos considerados, um único fator é responsável por 80% a 90% do envelhecimento cutâneo visível: a radiação UV. Isto acontece por causa do dano direto ao DNA e pela ativação de oncogenes (Svobodová; Psotová; Walterová, 2003; Südel et al, 2005).

A luz solar é composta por 3 tipos diferentes de radiação ultravioleta (UV): UVC (100-290nm), UVB (290-320nm) e UVA (320-400nm). A primeira geralmente é bloqueada na camada de ozônio e possui pouco impacto na pele. A segunda, por sua vez, penetra apenas na epiderme e é responsável pelo eritema nas queimaduras solares. A terceira, entretanto, é capaz de penetrar até a derme, causando a maior parte dos danos crônicos associados ao fotoenvelhecimento (Chen et al., 2021; Lubov; Cvammen; Kemp, 2021).

A radiação UV pode gerar inúmeros danos biológicos e acelerar o envelhecimento através de diferentes mecanismos. Alguns envolvem fotossensibilizantes endógenos ou exógenos que absorvem comprimentos de onda compatíveis com UVA e até mesmo luz visível, provenientes da luz solar ou de fontes artificiais. Conseqüentemente, ocorre a formação direta de oxigênio singlet ou através de transformações fotoquímicas, gerando radicais livres que aceleram o envelhecimento. Este processo é facilitado pelo fato da radiação UVA e luz visível serem menos absorvidas na epiderme e, portanto, penetrarem até a derme. Elas ativam e excitam os compostos fotossensibilizantes desta camada cutânea. Assim, clinicamente, a radiação UV gera tanto alterações agudas, como eritema e

queimaduras solares, quanto crônicas, como envelhecimento cutâneo precoce e neoplasias malignas (Glogau, 1997).

A radiação UVA penetra mais profundamente, causando mais danos na derme que a radiação UVB, particularmente no tecido elástico, promovendo o envelhecimento cutâneo. Estas alterações dérmicas são constituídas principalmente por degeneração do colágeno e deposição de material elastótico, percebidos como rugas, sulcos e alterações da pigmentação da pele (Gilchrest, 1996).

A radiação UV também causa dano ao material genético. A radiação UVB gera dímeros de pirimidinas que eventualmente resultam em mutações durante a replicação do DNA. A radiação UVA, por outro lado, gera danos genéticos através do estímulo à produção de espécies livres de oxigênio. Os radicais livres gerados, por sua vez, são capazes de estimular as metaloproteinases, aumentando os danos celulares (Goukassian; Gilchrest, 2004).

Além destes danos, a radiação UV gera prejuízos indiretos à pele ao interferir nas enzimas essenciais aos processos de reparo do DNA e nas células do sistema imune, como linfócitos T e células de Langerhans, que erradicam possíveis células carcinogênicas (Gilchrest, 1996). Outro mecanismo molecular responsável pela indução de tumores cutâneos através da radiação UV é a inibição da apoptose de células fotoexpostas com mutações (Guzman; Langowski; Owen-Schaub, 2003).

### **1.1.6 Fisiologia do envelhecimento**

Diversas teorias são consideradas para explicar o envelhecimento cutâneo. As principais estão relacionadas a: alterações do DNA mitocondrial, estresse oxidativo, processos inflamatórios também conhecidos como inflammaging, encurtamento dos telômeros, anormalidades cromossômicas, redução dos mecanismos de reparo de DNA e mutações em genes únicos (Mercado-Sáenz et al., 2010). Dentre todas essas complexas teorias, destacam-se o estresse oxidativo e os processos inflamatórios, enfatizando o papel das metaloproteinases (MMPs),

da via de proteção antioxidante do fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) e da sinalização de senescência relacionadas ao fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e da proteína p53.

#### 1.1.6.1 Estresse oxidativo

Os radicais livres são produzidos como parte do processo fisiológico. Quando gerados em excesso, podem induzir inúmeros efeitos deletérios ao organismo (Finkel; Holbrook, 2000). Um dos mecanismos moleculares amplamente aceito para explicar o envelhecimento cutâneo é o dano direto causado por radicais livres no material genético, proteínas e lipídeos celulares (Svobodová; Walterová; Vostalova, 2006; Yu; Xiao, 2021). O desequilíbrio entre a crescente produção de radicais livres, que ocorre com o aumento da idade cronológica, associado à redução dos mecanismos endógenos de proteção causam danos celulares capazes de acelerar o envelhecimento (Bogdan; Allemann; Baumann, 2008).

Queimaduras solares e outros tipos de inflamação da pele atraem células imunes e, conseqüentemente, aumentam o estresse oxidativo que contribui para o processo de envelhecimento cutâneo (Kammeyer; Luiten, 2015). A radiação UV que atinge a epiderme induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), alterando fatores diretamente relacionados à transcrição do DNA, podendo culminar em mutações do DNA mitocondrial (Hernandez-Pigeon et al., 2007; Stege et al., 2000).

Quando ocorre acúmulo de EROs induzidas pela exposição à radiação UV, as quinases são ativadas, gerando fatores de transcrição como o ativador de proteína 1 (AP-1) e o fator nuclear kB (NFkB) (Landau, 2007). O AP-1, por sua vez, estimula a transcrição de genes relacionados a metaloproteinases de matriz (MMP), como a MMP-1, MMP-3 e MMP-9. A MMP-1 é capaz de clivar fibras de colágeno tipos I e III na pele, preparando-os para degradação pela MMP-3 e MMP-9. Por outro lado, o NFkB, ativado pelas EROs, estimula citocinas inflamatórias

como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), capazes de estimular a produção de MMPs e elastase (Landau, 2007).

A elastase é responsável pela quebra e desorganização das fibras elásticas, que conferem características primordiais de elasticidade e força tênsil à pele (Heinz, 2020). Desde sua formação, as fibras elásticas praticamente não são renovadas ao longo da vida, pois possuem alta resistência e durabilidade, mantendo uma meia vida superior a 70 anos (Shapiro, 1991; Powell; Vine, 1992). Assim, danos teciduais induzidos pelo processo de envelhecimento podem levar à perda de função da elastina nos vasos sanguíneos, pulmões, ligamentos elásticos, cartilagens e pele (Heinz, 2020).

As peroxirredoxinas, por sua vez, constituem uma ampla família de peroxidases, contendo resíduos de cisteína conservados (Rhee, 2016), ativas em diferentes órgãos humanos (Fatma et al., 2001). Estas proteínas desempenham papel protetor e estão envolvidas no equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes celulares, atuando na neutralização de EROs, exercendo papel fundamental na proteção celular contra danos oxidativos (Knoops et al., 2016). Nos mamíferos, existem seis tipos diferentes de peroxirredoxinas, sendo a peroxirredoxina 6 a responsável pela redução do peróxido de hidrogênio, em resposta a fatores de crescimento (Lyu et al., 1999; Fatma, 2001; Sparling; Phelan, 2003; Wood; Poole; Karplus, 2003; Fisher, 2011).

A peroxirredoxina 6 é, portanto, considerada uma proteína citoprotetiva multifuncional, capaz de manter a integridade de membrana e a homeostase celular. Atua diretamente na regulação da expressão de EROs, desempenhando papel antioxidante (Fatma et al., 2011). A deficiência de peroxirredoxina 6 em células senescentes está diretamente relacionada a ativação de fatores indutores de apoptose (Fatma et al., 2011).

Outros agentes protetores relacionados ao sistema antioxidante são representados pela superóxido dismutase (SOD) e pela catalase. A SOD é uma enzima antioxidante que protege as células através da varredura de radicais livres. Já a catalase estimula a decomposição do peróxido de hidrogênio (Ciriolo et al.,

1997). Em fibroblastos senescentes, já foram demonstradas elevadas concentrações de EROs, que conseqüentemente aumentam os níveis de SOD (Sahoo; Chainy, 1997). O aumento de SOD em fibroblastos humanos também acontece por estímulos gerados pela radiação UV (Zs-Nagy; Steiber; Jeney, 1995; Le Quéré et al., 2014). Por outro lado, a redução da atividade da SOD está relacionada à progressão de danos cutâneos crônicos induzidos pela radiação UV (Rosa et al., 2021).

#### 1.1.6.2 Inflamação

O envelhecimento está intimamente associado a um estado de inflamação crônica de baixo grau, denominado “envelhecimento por inflamação”, conhecido como inflammaging. Estas cascatas inflamatórias envolvem vastos mecanismos moleculares responsáveis pelo aumento da mortalidade e morbidade do processo de envelhecimento (Brüünsgaard; Pedersen, 2003; Zhuang; Lyga, 2014).

Fatores pró-inflamatórios possuem um papel crucial no envelhecimento cutâneo intrínseco e extrínseco. Particularmente no fotoenvelhecimento, a exposição à radiação UV desencadeia vias inflamatórias que culminam com um prematuro envelhecimento da pele (Zhuang; Lyga, 2014). Importante demonstração disto é observada através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF- $\alpha$ , pelos queratinócitos após exposição UV (Wood et al., 1996). Estas citocinas são capazes de desencadear a resposta inflamatória na pele e induzir a síntese e liberação de inúmeras outras citocinas pró-inflamatórias (Kupper, 1996). Além disso, existem interleucinas, como a IL-8 e IL-6, que recrutam neutrófilos e macrófagos, ativando fibroblastos dérmicos e estimulando MMPs, degradando o colágeno na pele (Pillai; Oresajo; Hayward, 2005).

Além da inflamação, este complexo processo de envelhecimento também sofre significativas influências da imunidade inata. O sistema imunológico cutâneo normalmente protege a pele de infecções, remove células danificadas e previne reações autoimunes contra proteínas da pele. Entretanto, com a exposição ao sol,

o sistema imunológico passa a contribuir para o envelhecimento. As reações inflamatórias induzidas por radiação UV promovem o fotoenvelhecimento através da geração de EROs, da produção de enzimas proteolíticas, da supressão do sistema imunológico e da indução de fatores de crescimento para células neoplásicas incipientes (Bennett et al., 2008).

A população de células que permeia a pele humana após 6 a 72 horas de radiação UV é composta principalmente por células mielóides monocíticas, das quais muitas sofrem diferenciação em monócitos e macrófagos ativados (Hammerberg; Duraiswamy; Cooper, 1994; Meunier; Bata-Csorgo; Cooper, 1995). Estas células são relevantes fontes de IL-10 e possuem papel crítico na imunossupressão e tolerância UV-induzida (Hammerberg; Duraiswamy; Cooper, 1994). A linhagem monocítica-macrofágica ativada é necessária não apenas para a fagocitose UV-induzida das células apoptóticas, como também para destruir células cutâneas contendo lipídeos de superfície oxidados, que geram danos ao DNA. A produção de IL-10 pode auxiliar na modulação desta resposta inflamatória e prevenir a autoimunidade (Yoshida et al., 1998; Takahara et al., 2003).

Como forma de regular esta inflamação relacionada ao processo de envelhecimento, a indução de citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$  pode ser um potencial mecanismo capaz de conter o inflammaging, colaborando para ação anti-envelhecimento na pele. A IL-10 é uma citocina imunossupressora produzida por vários tipos celulares e que atua em diferentes leucócitos, incluindo as células dendríticas e células T (Saraiva; O'Garra, 2010). O TGF- $\beta$ , por sua vez, é o protótipo regulador da matriz extracelular, atuando na interação mesenquimal e epitelial durante todo o reparo tecidual (Mauviel, 2009). Ante o exposto, mister se faz avaliar citocinas com potencial inflamatório e anti-inflamatório, no estudo de mecanismos promotores do equilíbrio no envelhecimento cutâneo.

#### 1.1.6.3 Metaloproteinases

A renovação do colágeno é um processo fisiológico que ocorre periodicamente na derme, mas também está presente em reparações teciduais, na

organogênese e em diferentes processos inflamatórios (Vu; Werb, 2000; Rohani; Parks, 2015).

As MMPs são responsáveis pela reparação tecidual e degradação do colágeno (Bonnans; Chou; Werb, 2014). Alguns estudos já demonstraram o mecanismo de degradação de colágeno através das MMP colagenolíticas, que quebram a molécula do colágeno intersticial num sítio específico da sua estrutura de tripla-hélice, gerando duas partes de tamanhos correspondentes a  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{3}{4}$  do seu comprimento original (Tam et al., 2002; Chung et al., 2004; Pelman; Morrison; Overall, 2005). Estes fragmentos desnaturam e sofrem degradação posterior pelas gelatinases, MMP-2, MMP-9 e outras proteases. As modificações relacionadas ao envelhecimento possuem impacto direto na homeostase da matriz extracelular, afetando sua degradação. Assim, o estudo das MMPs é ferramenta importante na avaliação da degradação do colágeno cutâneo (Tam et al., 2004; Toth; Sohail; Fridman, 2012).

No envelhecimento intrínseco, há aumento da expressão de MMPs e redução da síntese de pró-colágeno I e III, por provável alteração da via TGF- $\beta$ /smad. Conseqüentemente, a pele apresenta maior degradação de colágeno tipos I, III e IV, elastina e componentes fibroelásticos. Os principais constituintes da matriz extracelular, como glicoproteínas e glicosaminoglicanos, também tendem a diminuir com a idade.

No fotoenvelhecimento, sobreposto às alterações do envelhecimento cronológico, existe o dano causado pela radiação UV, que induz a síntese de MMPs, principalmente a MMP-1, MMP-3 e MMP-9. A MMP-1 cliva os principais tipos de colágenos da derme, I e III, cujos fragmentos são posteriormente degradados pelas MMP-3 e MMP-9 (McGrath; Robinson; Binder, 2012).

#### 1.1.6.4 Via de antioxidação do Nrf2

Os estudos de novas drogas capazes de atuar no processo de envelhecimento destacam a via do fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) (Yu; Xiao, 2021).

O efeito antienvhecimento da rapamicina (Prašnikar; Borišek; Perdih, 2021), trealose (Sun et al., 2020), ergotioneína (Hseu et al., 2020) e astaxantina (Kohandel et al., 2021), por exemplo, está diretamente relacionado à ativação celular da via Nrf2. Corroborando com estas evidências, o consumo de produtos considerados agonistas naturais do Nrf2, como cúrcuma (Greenwald et al., 2017), resveratrol e flavonóides, já se mostrou benéfico em diferentes doenças associadas ao envelhecimento (Xu et al., 2018).

O Nrf2 é o principal regulador do sistema de enzimas antioxidantes, capaz de estimular a ação da SOD, catalase, glutathione peroxidase e redutase, NAD(P)H: quinona-oxidorredutase 1, heme-oxigenase 1 e ferritina (Sajadimajd; Khazaei, 2018; Yuan et al., 2021). Por isso, exerce ação fundamental na longevidade (Gorbunova; Rezazadeh; Seluanov, 2016) e na prevenção da senescência celular (Wati; Matsumaru; Motohashi, 2020).

Ao longo da evolução, o Nrf2 desempenhou papel relevante na longevidade. Isto pode ser explicado pelo fato de existirem mais de 350 genes citoprotetores, em diferentes espécies animais, por ele regulados, responsáveis pelo combate ao estresse oxidativo, em condições como elevadas temperaturas e desidratação (Shiels et al., 2021). A alta capacidade de estimular sua expressão gênica é observada em animais capazes de sobreviver em condições ambientais extremas (Stenvinkel; Shiels, 2019; Stenvinkel et al., 2020). Atualmente, a via Nrf2/Keap1 está relacionada não apenas ao controle de fatores oxidantes extrínsecos ambientais e psicossociais como também de fatores intrínsecos do metabolismo antioxidante (Shiels et al., 2021).

Esta importante via é ativada principalmente através de fatores do estresse oxidativo, que induzem dissociação entre Keap1 e Nrf2, no citoplasma celular. O Keap1, Kelch-like ECH-associated Protein 1, habitualmente ligado ao Nrf2, funciona como seu inibidor natural (Yu; Xiao, 2021). Logo após a dissociação, o Nrf2 sofre translocação para o núcleo celular, onde se conecta ao elemento de resposta antioxidante de genes citoprotetores, inibe respostas inflamatórias mediadas por NF-kB, estimula a função mitocondrial e mantém a proteostase. Desta forma, produz efeitos benéficos para prevenir o envelhecimento como

aumento da citoproteção, melhora da homeostase antioxidante e redução do impacto inflamatório (Shiels et al., 2021). Sua ativação está, portanto, diretamente relacionada ao efeito protetor da senescência celular (Yu; Xiao, 2021), inclusive em fibroblastos (Kapeta; Chondrogianni; Gonos, 2010).

Além desta importante função no processo natural de envelhecimento, a sinalização do Nrf2 possui influência também em doenças associadas ao envelhecimento, como aterosclerose e doenças cardiovasculares (Ebert et al., 2021). No epitélio pigmentar retiniano senescente, por exemplo, a sinalização desta via está reduzida (Sachdeva; Cano; Handa, 2014). Por outro lado, a atividade física é capaz de aumentar a atividade do Nrf2 nas células mononucleares do sangue periférico (Done; Gage; Nieto, 2016). Existe, entretanto, um limite saudável nesta ativação da via Nrf2, uma vez que a superexpressão desta proteína aumenta o risco de mutação tumoral (Liu et al., 2021a) e induz resistência a medicamentos em pacientes oncológicos (Hu et al., 2013).

#### 1.1.6.5 Via sinalizadora da senescência celular relacionada ao TGF- $\beta$

O TGF- $\beta$  representa uma via relevante na regulação da senescência celular. É expresso em todas as células do organismo e, assim como a p53, desempenha importante papel na homeostase, regulando a apoptose, proliferação, migração e diferenciação celular (Vander-Ark; Cao; Li, 2018).

Existem 3 formas de TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3. Todos possuem atividades biológicas semelhantes. Existem também 3 tipos de receptores para o TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$ R-1, TGF- $\beta$ R-2 e TGF- $\beta$ R-3. O TGF- $\beta$ R1 e o TGF- $\beta$ R2 são serinas/treoninas e tirosina quinases, enquanto o TGF- $\beta$ R3 não possui nenhuma ação de quinase. A cascata de ativação do TGF- $\beta$  inicia-se quando uma das formas deste fator de crescimento se conecta ao TGF- $\beta$ R-2, que sequencialmente recruta e fosforila o TGF- $\beta$ R1, desencadeando sinalizações celulares que culminam na transcrição dos genes alvos do TGF- $\beta$ , inclusive daqueles relacionados à senescência (Vander-Ark; Cao; Li, 2018).

#### 1.1.6.6 Via de citoproteção e senescência celular relacionada à p53

A p53 é uma fosfoproteína tetramérica nuclear de 53 kDa, capaz de atuar como fator de transcrição (Hainaut; Hollstein, 2000). É conhecida como guardião do genoma por desempenhar importante papel na manutenção da integridade genética. Através de um sítio de ligação direta ao DNA, regula a expressão de genes relacionados ao reparo do material genético, apoptose e diferenciação celular (Loureiro et al., 2020).

Cerca de metade dos tumores malignos humanos possuem a função da p53 suprimida através da interação com oncoproteínas. Na outra metade dos cânceres, a p53 possui mutação. Particularmente em relação aos cânceres de pele a mutação da p53 é uma das mais comumente relacionadas ao dano ao DNA induzido pela radiação UV (Loureiro et al., 2020).

Além de estar associada à oncogênese, esta proteína também está relacionada à radiação UVB e ao envelhecimento (Gray-Schopfer et al., 2006; Tran et al., 2012; Joselow; et al., 2017) A expressão da p53 aumenta no envelhecimento de diversos tecidos, incluindo a pele (Chen et al., 2017). Diversos fatores estressantes como radiação UVB, bronzeamento artificial, inflamação e envelhecimento induzem a expressão da p53 em fibroblastos e queratinócitos (Choi et al., 2018).

A p53 é considerada essencial para o fotoenvelhecimento também dos melanócitos, induzido pela radiação UVB e, conseqüentemente, pela hiperpigmentação associada à senescência. São observados níveis elevados da p53 após exposição à radiação UVB, enquanto o uso de inibidores da p53 podem reverter danos induzidos por este tipo de radiação (Choi et al., 2018). Alguns estudos demonstraram que a inibição da atividade da p53 durante o envelhecimento pode funcionar como um método efetivo para prevenção da pigmentação associada à senescência celular (Choi et al., 2018).

Mais recentemente, drogas que possuem a p53 como alvo são estudadas e consideradas promissoras para uso na prevenção e no tratamento do câncer de pele melanoma e não-melanoma (Loureiro et al., 2020).

### **1.1.7 Manifestações clínicas**

As alterações senis nas áreas da pele não expostas ao sol manifestam-se clinicamente através do adelgaçamento da pele e da redução do tecido subcutâneo. Já nas áreas expostas, especialmente na face, há formação de rugas, aspecto apergaminhado e adelgaçamento. Além disto, pode ocorrer distribuição irregular de pigmento. Na região cervical posterior, pode-se encontrar o aspecto de cútis romboidal, característico de pacientes que se expuseram cronicamente ao sol e desenvolveram um aspecto cutâneo espessado, repleto de rugas profundas geometricamente dispostas (Glogau, 1997; Oriá et al., 2003).

Os principais sinais clínicos do fotoenvelhecimento são: discromias, lentigos, pigmentação amarelo pálido, perda da translucência habitual, surgimento gradativo de telangiectasias e púrpuras. Mudanças de textura incluem aspereza, desenvolvimento de rugas finas, que progridem para sulcos profundos, aspecto apergaminhado, culminando com o aparecimento de lesões pré-neoplásicas, as queratoses actínicas (Glogau, 1997). O fotoenvelhecimento representa a superposição do dano solar na pele envelhecida cronologicamente, capaz de gerar a maioria dos sinais cutâneos estéticos e aqueles comprometedores da saúde da pele.

Um dos sítios anatômicos mais propícios ao estudo do envelhecimento cutâneo são os antebraços, por apresentar áreas acometidas pelo envelhecimento cronológico e aquelas com a sobreposição do fotoenvelhecimento. Além disto, são regiões do corpo mais discretas para serem excisadas cirurgicamente em ensaios clínicos (Guimarães et al., 2015).

### **1.1.8 Evidências histológicas**

O envelhecimento marca o declínio da função e integridade de inúmeros tecidos. Particularmente na epiderme, há redução da estratificação e da diferenciação celular. Sua espessura média é reduzida e ocorre retração das cristas interpapilares. O balanço entre a auto renovação e diferenciação de células tronco

garante a manutenção da epiderme, ao recuperar todas as camadas suprabasais (Charruyer et al., 2021).

Na pele não fotoexposta, há o desaparecimento progressivo do tecido elástico na derme papilar. As principais responsáveis por esta alteração são as fibras oxitalânicas que, com o passar dos anos, deixam de formar a habitual rede delgada e superficial, perpendicular à junção dermoepidérmica, observada na pele jovem. Aos poucos, as fibras oxitalânicas tornam-se mais esparsas e menos numerosas, até desaparecem por completo na pele de idosos (Oriá et al., 2003).

Por outro lado, na pele fotoexposta, a maioria das pessoas com 30 anos de idade já apresenta alguma alteração do tecido elástico, mesmo sem sinais clínicos. Após os 40 anos, todos apresentam alterações de tecido elástico na pele da face. Histologicamente, a pele fotoexposta apresenta elastose solar, representada por degeneração basofílica do colágeno na derme superficial, separada da epiderme atrófica por uma fina camada de colágeno normal, evidenciada pela coloração com Hematoxilina-Eosina. As bandas eosinofílicas de colágeno são substituídas por um material amorfo, granular e basofílico. Nas áreas de exposição solar grave, este material elastótico pode estar localizado nas porções mais profundas da pele (Del Bino; Duval; Bernerd, 2018).

Os queratinócitos das áreas fotoexpostas acumulam anomalias como retenção do núcleo remanescente, perda das camadas sobrepostas na epiderme e retificação das cristas epidérmicas (Bergfeld, 1997). A espessura da epiderme aumenta para depois tornar-se mais fina que o habitual, com eventual perda da polaridade na maturação epidérmica e aumento da atipia dos queratinócitos (Gilchrest, 1996).

O fotodano grave na derme gera uma grande quantidade de fibras elásticas emaranhadas, espessadas e degradadas. Fibrilas de colágeno compactadas substituem microfilamentos elásticos, gerando uma massa amorfa (Gilchrest, 1996). Este tecido dérmico danificado deixa de fornecer suporte adequado para os vasos sanguíneos, que se tornam alargados e visíveis na superfície cutânea como

telangectasias. A redução da perfusão é mais evidente nas áreas com fotodano (McCallion; Po, 1993).

## 1.2 ANTIOXIDANTES ORAIS

Os antioxidantes orais estão entre os suplementos nutricionais para cuidados com a saúde mais populares e são vendidos sem a necessidade de prescrição médica (Villanueva; Kross, 2012). Alguns deles já foram testados em ensaios clínicos randomizados, como licopeno, betacaroteno, zinco, vitaminas C e E, mas sem resultados dermatológicos moleculares evidentes no que concerne à ação antienvhecimento em humanos (Stahl et al., 2000; Stahl; Sies, 2012; Costa et al., 2015; Sokoloski; Borges; Bagatin, 2015).

Outros antioxidantes orais, entretanto, vêm sendo amplamente comercializados com a promessa de efeito antienvhecimento, apesar de pouco avaliados em ensaios clínicos duplo-cegos e randomizados em humanos, como ocorre com os suplementos orais contendo a Coenzima Q10 (CoQ10). Muitas evidências científicas destacadas como suporte a este uso são apenas resultados promissores de ensaios pré-clínicos, realizados em animais (Kwong et al., 2002; Santos-Gonzalez et al., 2007).

Além disso, não é recomendável nem seguro promover antioxidação de todas as vias celulares, indiscriminadamente. Afinal, o processo de oxidação é de primordial importância em diversas funções fisiológicas celulares, como proliferação e diferenciação celular (López-Armada et al., 2013), ativação do sistema imunológico (Chen et al., 2016; Yarosz; Chang, 2018), sinalização hormonal (Shadel; Horvath, 2015) e sinalização de vias do aprendizado e da memória (Kishida; Klann, 2007).

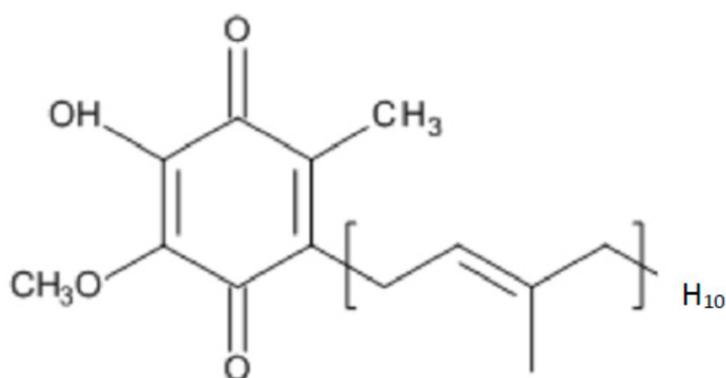
Existe ainda um limite tênue entre vias relacionadas ao envelhecimento e vias oncogênicas (Zuo et al., 2019). Isto pode ser demonstrado pelo fato da suplementação oral de betacaroteno aumentar o risco de câncer de pulmão, principalmente em tabagistas (Albanes et al., 1995; Albanes et al., 1996; Omenn et

al., 1996; Goralczyk, 2009; Middha et al., 2019). Além disso, o uso da vitamina E por via oral também já foi implicado no aumento do risco de câncer de próstata (Klein et al., 2011) e no aumento de todas as causas de mortalidade (Miller et al., 2005). Portanto, a elaboração de ensaios clínicos sobre segurança e eficácia de diferentes doses administradas, bem como a avaliação do tempo de uso de suplementos orais antioxidantes é fundamental.

### 1.2.1 Coenzima Q10

A CoQ10 foi descoberta em 1957 por Fredrick Crane e sua equipe, na mitocôndria de células de coração de boi (Crane et al., 1957). Por possuir uma presença ubíqua na natureza, com a estrutura química de uma quinona (Figura 1), é também conhecida como ubiquinona (Kawamukai, 2016). É constituída por um anel central de benzoquinona ligado a uma cadeia lipofílica de 10 unidades isoprenóides, formando quimicamente a estrutura de 2,3-dimetoxi-5-metil-6-decaprenil-1,4-benzoquinona (Kumar et al., 2009; Hargreaves; Heaton; Mantle, 2020).

Figura 1 - Estrutura química da Coenzima Q10



Fonte: Hargreaves; Heaton; Mantle, 2020.

O número de unidades de isoprenos na cadeia varia entre os organismos, por ser determinado a partir de uma poliprenil difosfato sintase específica, originando o algarismo relativo à coenzima Q. Assim, em humanos, são 10 cadeias, formando a CoQ10. Já na *Escherichia coli*, são 8 cadeias, formando a coenzima Q8 (Tsui et al., 2019). Sua forma completamente reduzida, a hidroquinona representada por CoQH<sub>2</sub>, é chamada ubiquinol. Já a forma oxidada, a quinona representada por CoQ, é denominada ubiquinona (Stefely; Pagliarini, 2017).

A biossíntese da CoQ10 pode ser dividida em três etapas principais. A primeira é marcada pela síntese do anel de benzoquinona, partindo do 4-hidroxibenzoato, que se origina da tirosina ou fenilalanina. A segunda é caracterizada pela síntese da cadeia poliisoprenóide, através da via do mevalonato, a partir da acetil-coenzima A (acetil-CoA). Na terceira etapa, estas duas estruturas formadas são condensadas numa mesma molécula. O anel de benzoquinona sofre subsequentes modificações através de hidroxilação, metilação e descarboxilação para finalmente constituir a CoQ10 (Hargreaves; Heaton; Mantle, 2020).

É, portanto, um composto lipossolúvel, encontrado em virtualmente todas as células do corpo humano. Age como mediadora essencial da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, sendo necessária na respiração celular e produção de adenosina trifosfato (ATP). Atua, especificamente, na transferência de elétrons do complexo I, de NADH desidrogenase, e do complexo II, de succinato desidrogenase, para o complexo III mitocondrial (Kawamukai, 2016). É considerada um antioxidante intercelular e sua presença já foi demonstrada em diferentes membranas celulares e no sangue, em lipoproteínas de alta e baixa densidade (Crane, 2001).

Por estar relacionada à síntese de ATP, afeta o funcionamento de todas as células do organismo, principalmente aquelas que possuem alta demanda energética, tornando-se essencial à saúde dos tecidos e órgãos. É, portanto, o antioxidante endógeno que previne a oxidação de proteínas, lipídeos e DNA (Littarru; Tiano, 2010).

Evidências mais recentes mostram o efeito desta coenzima também como reguladora da expressão gênica, principalmente relacionada a sinalização celular, metabolismo intermediário, inflamação, controle de transporte e transcrição. Entretanto, os mecanismos moleculares pelos quais exerce estas funções ainda não foram completamente elucidados (Groneberg et al., 2005; Santos-Gonzalez et al., 2007; Schmelzer et al., 2008).

As atuais indicações clínicas para suplementação oral de CoQ10 incluem: deficiências primárias e secundárias de CoQ10 (Quinzii; Hirano, 2011), doenças mitocondriais (Kerr, 2010), fibromialgia (Cordero et al., 2010), insuficiência cardíaca (Adarsh; Kaur; Mohan, 2008), cardiopatia isquêmica (Celik; Iyisoy, 2009), hipertensão arterial sistêmica (Rosenfeldt et al., 2007), diabetes mellitus (Golbidi; Ebadi; Laher, 2011), neoplasias malignas (Roffe; Schmidt; Ernst, 2004), doença de Parkinson (Henchcliffe; Beal, 2008), doença de Huntington (Stack; Matson; Ferrante, 2008), doença de Alzheimer (Lee; Boo; Ryu, 2009), ataxia de Friedreich (Cooper et al., 2008), astenozoospermia (Mancini; Balercia, 2011), doenças periodontais (Prakash; Sunitha; Hans, 2010), cefaléia migrânea (Sándor et al., 2005), pré-eclampsia (Teran et al., 2009) e síndrome de Down (Tiano et al., 2011).

As deficiências de CoQ10 podem surgir a partir de alterações nutricionais, como deficiência de vitamina B6, um cofator essencial para biossíntese de CoQ10, por defeitos genéticos, por aumento da demanda em doenças específicas (Quinzii; Hirano, 2011), mas também podem aparecer com o avançar da idade, durante o processo de envelhecimento (Sohal; Forster, 2007), pois a produção da CoQ10 diminui com a idade (Saini, 2011).

As principais fontes dietéticas naturais são encontradas na proteína de origem animal, especialmente carne de coração de animais, coxa de frango e em peixes, como truta e arenque. A necessidade diária de CoQ10 para evitar deficiências é de 3 a 5mg por dia. Em tecidos normais, entretanto, esta coenzima atinge um nível de saturação a partir do qual a suplementação oral é incapaz de ultrapassar os níveis normais de CoQ10 (Weber; Bysted; Holmer, 1997; Beal, 1999).

Após ingerida, a CoQ10 é absorvida lentamente no intestino delgado, devido ao seu alto peso molecular e baixa hidrossolubilidade, depois alcança os vasos linfáticos e, finalmente, o sangue e os tecidos (Palamakula; Soliman; Khan, 2005). Logo após a absorção, pode ser detectada nas lipoproteínas plasmáticas e no fígado (Zhang et al., 1995). Quando administrada após as refeições, sua absorção pode ser até 3 vezes mais rápida (Ochiai et al., 2007). Além disto, suplementações de altíssimas doses diárias, como 150mg/Kg/dia, levam ao aumento significativo na quantidade de CoQ10 no miocárdio e músculos esqueléticos, sugerindo que concentrações plasmáticas elevadas são necessárias para facilitar sua captação pelos tecidos periféricos (Kwong et al., 2002). Não há diferença significativa da absorção da CoQ10 quando administrada na forma granulada, através de cápsulas ou em alimentos ricos em CoQ10, como coração de porco (Weber; Bysted; Holmer, 1997).

A suplementação oral é comprovadamente segura, mesmo quando utilizadas doses diárias altas (Hidaka et al., 2008). As doses avaliadas como seguras e bem toleradas são de até 1.200mg/dia em adultos (Hathcock; Shao, 2006) e 10mg/kg/dia em crianças (Miles et al., 2006). Níveis plasmáticos estáveis são obtidos após 3 a 4 semanas de suplementação, quando podem ser medidos no plasma (Hosoe et al., 2007) e, para estas dosagens máximas de suplementação, variam de 5 a 10mcg/mL (Miles et al., 2006). Estes valores correspondem a 2,5 a 5 vezes o limite superior da normalidade dos níveis séricos de CoQ10 em indivíduos saudáveis (Steele et al., 2004). As medidas séricas são amplamente utilizadas para estimar o status de CoQ10 em humanos e, em indivíduos saudáveis não submetidos a suplementação, podem variar de 0,34 a 1,65 mcg/mL (Bhagavan; Chopra, 2006).

Existem evidências de interações medicamentosas com a CoQ10, como o uso de estatinas. Estas drogas, utilizadas no tratamento de dislipidemias, inibem a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, necessária tanto para síntese de colesterol quanto para de CoQ10. Assim, pacientes em tratamento com lovastatina ou pravastatina, por exemplo, tendem a apresentar níveis séricos reduzidos desta coenzima (Mortensen et al., 1997). Outras medicações como os

betabloqueadores, metoprolol e propranolol (Kishi; Watanabe; Folkers, 1977), além das fenotiazinas e antidepressivos tricíclicos, inibiram as enzimas dependentes de CoQ10 (Moreno-Fernández et al., 2012).

Em relação à coagulação sanguínea, pacientes que tomam drogas antiplaquetárias, como ácido acetil-salicílico, podem ter alterações na função das plaquetas pela CoQ10, aumentando as chances de sangramento (Serebruany et al., 1997). Por outro lado, pacientes que usam anticoagulantes como a warfarina podem apresentar redução do seu efeito terapêutico pela ação da CoQ10 semelhante à vitamina K (Singh; Devaraj; Jialal, 2007). Em hipertensos, por sua vez, a CoQ10 pode apresentar efeito hipotensor somado aos anti-hipertensivos orais (Bonakdar; Guarneri, 2005). Já nos diabéticos, esta coenzima aumenta a sensibilidade à insulina, ao melhorar a função das células beta pancreáticas, reduzindo a necessidade diária de hipoglicemiantes (Hodgson et al., 2002).

Em relação à toxicidade, a maioria dos ensaios clínicos não demonstrou efeitos adversos significativos, que indicassem a interrupção do tratamento. Os efeitos colaterais registrados são, em geral, de baixa morbidade, tais como: desconforto abdominal, náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, cefaléia e rash cutâneo (Hidaka et al., 2008). Por ser metabolizada pelo fígado e eliminada através do trato biliar, pode ser acumulada em pacientes com insuficiência hepática ou colestase (Greenberg; Frishman, 1990).

Portanto, a CoQ10 possui papel amplamente consolidado, descrito e demonstrado na literatura científica no tocante a sua ação antioxidante em diferentes sistemas, como cardiovascular, neurológico e hepático (Bor-Jen et al., 2012; Bor-Jen et al., 2013; Noh et al., 2013; Liu et al., 2016; Liu et al., 2017). Apesar de muitos suplementos dermatológicos serem comercializados mundialmente com a promessa de gerar atividade antioxidante e contribuir para o controle do envelhecimento, poucos estudos duplo-cegos, randomizados, placebo controlados foram realizados para demonstrar este efeito.

A hipótese deste estudo é que a CoQ10 possa ter algum efeito benéfico na pele, principalmente na região fotoexposta, ao reduzir o estresse oxidativo induzido

pela radiação ultravioleta. Assim, propomos um ensaio clínico dermatológico triplo cego, randomizado, placebo controlado para avaliar a ação antioxidante da Coenzima Q10, sua eficácia e segurança neste complexo processo de envelhecimento cutâneo.

## **2 JUSTIFICATIVA**

Apesar da comprovada ação antioxidante nos sistemas cardiovascular, neurológico e hepático, poucos estudos foram desenvolvidos para avaliar o efeito da suplementação oral de CoQ10 na pele, principalmente de mulheres idosas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar o efeito clínico, histológico e laboratorial da suplementação oral de CoQ10, em diferentes doses, no processo de envelhecimento cutâneo de idosas saudáveis, através de um ensaio clínico triplo cego, randomizado, placebo controlado.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a resposta cutânea, em relação às seguintes características clínicas:

- a) Autopercepção da melhora estética global;
- b) Eritema e hiperpigmentações cutâneas faciais;
- c) Viscoelasticidade no antebraço;
- d) Hidratação no antebraço;
- e) Perda de água transepidermica ou *transepidermal water loss* (TEWL) no antebraço;
- f) Espessura e densidade da dérmicas no antebraço.

Avaliar os impactos histológicos, nas seguintes estruturas:

- a) Epiderme celular e junção dermo-epidérmica (JDE);
- b) Fibras colágenas da derme;
- c) Fibras elásticas da derme;
- d) Proteínas cutâneas relacionadas a mecanismos de antioxidação e envelhecimento, como Nrf2 e p53.

Analisar a resposta laboratorial, sob os seguintes aspectos:

- a) Segurança clínica nas funções hepática, renal e hematológica;
- b) Determinação de citocinas séricas TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10;
- c) Dosagem sérica de CoQ10, para monitorização da absorção sanguínea do suplemento;
- d) Expressão de genes de MMPs (MMP-1, MMP3, MMP9), proto-oncogenes (c-JUN, FOS) e antioxidantes (TGF-beta, receptor II de TGF-beta e SOD).

## 4 MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO

Trata-se de um ensaio clínico de intervenção terapêutica, prospectivo, randomizado, placebo-controlado e triplo cego, em grupos paralelos para avaliar segurança e eficácia de um suplemento alimentar no envelhecimento da pele.

O estudo foi composto por três braços: duas doses diferentes do suplemento e grupo placebo, em formato triplo cego para todos os pesquisadores e participantes da pesquisa. Todos realizaram seguimento clínico-laboratorial, durante o período de suplementação, com anamnese, exame físico geral e dermatológico. avaliações das funções renal e hepática.

O cadastro deste estudo foi realizado na plataforma de Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (ReBEC), através do número UNT (Universal Trial Number) U1111-1221-4225, gerado pela World Health Organization (WHO). A aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da USP (CEP-USP) ocorreu em outubro de 2016, sob número 1.784.048, e o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) recebeu número 58760016.5.0000.0068 (ANEXO A). Todas as participantes da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B).

### 4.2 POPULAÇÃO

Com base em estudo anterior (Žmitek et al., 2017) o valor de viscoelasticidade da pele após o tratamento, com o mesmo suplemento usado neste estudo, apresentou valor médio de 1,63 MPa no grupo placebo e 1,97 MPa no grupo com a maior dose de CoQ10 oral, sendo a maior variabilidade apresentada de 0,23 MPa (DP = 0,23 MPa). Assim, supondo encontrar pelo menos a diferença entre os grupos apresentada no artigo citado, com um poder de 80% e um intervalo de confiança de 95% (alpha de 5%), a amostra para a realização deste

estudo foi calculada com 13 pacientes em cada grupo, ou seja, 39 pacientes no total (Bratcher; Moran; Zimmer, 1970; Overall; Doyle, 1994).

Considerando perdas de seguimento esperadas em ensaios clínicos, foram recrutadas 45 voluntárias, sendo 15 em cada grupo. O estudo foi realizado no ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e no ambulatório da Unidade de Cosmiatria, Cirurgia e Oncologia (UNICCO) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), no período de 27 de setembro de 2009 a 30 de janeiro de 2020.

#### 4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios de inclusão adotados foram: mulheres saudáveis com idade entre 60 e 80 anos completos, fototipos I a III da escala de Fitzpatrick (Fitzpatrick, 1988), em boas condições de saúde física e mental, capazes de seguir as instruções do estudo, com desejo e disponibilidade para comparecer às consultas, avaliações e coletas de exames nas datas pré-agendadas e que concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

#### 4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas mulheres que estavam em uso de terapia de reposição hormonal, estatinas, betabloqueadores, fenotiazinas, antidepressivos tricíclicos, antiplaquetários e anticoagulantes varfarínicos. Outros fatores de exclusão foram: hipersensibilidade ou intolerância à CoQ10, distúrbios de absorção intestinal, doenças renais e hepáticas, colagenoses e neoplasias vigentes.

## 4.5 INTERVENÇÃO

As participantes foram distribuídas em três grupos com 15 participantes, de forma randomizada simples e computadorizada, através do Excel 2011 (Microsoft, Redmond, WA, USA), seguindo a alocação de 1:1 com os códigos das cápsulas de suplementação (Kim; Shin, 2014). O primeiro grupo (CoQ10 100mg) recebeu suplementação oral com 100mg por dia de CoQ10, com excipiente de amido, em cápsulas, durante 12 semanas. O segundo grupo (CoQ10 200mg) recebeu suplementação oral com 200mg por dia de CoQ10, com excipiente de amido, em cápsulas, durante 12 semanas. O terceiro grupo (placebo), por sua vez, recebeu apenas excipiente de amido via oral, em cápsulas, durante 3 meses.

Todas as voluntárias foram orientadas a ingerir as cápsulas após a primeira refeição do dia e avaliadas clinicamente a cada 4 semanas. As medidas instrumentais não invasivas como viscoelasticidade, hidratação e ultrassonografia de área padronizada da pele, biopsias cutâneas e coletas de sangue foram realizadas no dia anterior ao início da suplementação oral e após 12 semanas de intervenção.

## 4.6 PARÂMETROS CLÍNICOS

### 4.6.1 Observações de eventos adversos, sinais e sintomas clínicos

Nas 4 consultas médicas dermatológicas agendadas a cada 4 semanas durante todo o período do estudo, as participantes foram incentivadas a reportar quaisquer efeitos adversos e sintomas ocorridos nos últimos 28 dias. Na mesma ocasião, as participantes passaram por consulta médica incluindo anamnese, exame físico geral e exame físico dermatológico, para avaliação de possíveis sinais clínicos.

#### **4.6.2 Autopercepção da melhora estética global**

As participantes foram questionadas acerca de sua opinião quanto a melhora do aspecto geral da pele após suplementação oral, segundo escala de 5 pontos de Likert (Cox et al., 2003), com as seguintes pontuações: 5 - muito melhor, 4 - melhor, 3 - inalterada, 2 - pior e 1 - muito pior.

#### **4.6.3 Imagens faciais por estereofotogrametria**

As imagens faciais foram obtidas antes e ao final da suplementação oral, através do aparelho de estereofotogrametria Vectra H1 (Canfield Scientific, Parsippany, Nova Jersey, Estados Unidos) por 2 operadores devidamente treinados para reconhecer pontos de referência do posicionamento do aparelho, de acordo com orientações do fabricante. Todas as participantes foram orientadas a comparecer ao estúdio sem usar maquiagem ou cremes. Uma faixa de cor preta foi devidamente posicionada no limite da linha de implantação capilar, cobrindo o cabelo, para favorecer a padronização das imagens obtidas. A aquisição de imagens foi realizada no estúdio de fotografia do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da USP, garantindo o mesmo cenário e a mesma intensidade de luz.

O desmembramento de imagens para exibir aspectos de manchas e vasos sanguíneos visíveis na face foi realizada através do software do próprio sistema. As análises de frações da área facial acometidas por manchas e vasos sanguíneos foi realizada através do software Image-Pro Plus (Media Cybernetics Inc., Bethesda, Maryland).

#### **4.6.4 Viscoelasticidade da pele**

A medida não invasiva da viscoelasticidade da pele foi realizada com o aparelho Cutometer® MPA 580 (Courage & Khazaka, Cologne, Alemanha). O transdutor deste aparelho, em contato com a pele, realiza sucção a vácuo de 350

mbar, alternando medidas de sucção e de recuperação da pele à posição de repouso. A resistência da pele à pressão negativa, definida como firmeza, bem como sua capacidade de retorno à posição original, denominada elasticidade, são apresentadas em gráficos ao longo da medição (O'goshi, 1995).

Para análise da elasticidade cutânea, foram consideradas as seguintes medidas: distensibilidade máxima da pele (R0), elasticidade (R2, R5 e R7), viscoelasticidade (R6) e fadiga após repetidas sucções (R9) (Dobrev, 2005; Bracone 2020; Hameed, 2019). O valor R5 representa a proporção elástica da curva de sucção do aparelho versus a proporção elástica da curva de relaxamento, estabelecendo uma relação entre a recuperação imediata e a deformidade elástica local, sendo considerado o parâmetro mais acurado para detectar alterações da elasticidade da pele relacionadas ao envelhecimento (Krueger et al., 2011; Ryu et al., 2008).

Antes de cada aferição, as participantes foram aclimatadas à temperatura de  $21,5 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $50 \pm 5\%$  de umidade relativa do ar, por no mínimo 30 minutos. As aferições foram realizadas 3 vezes em 2 pontos do antebraço esquerdo, distando o primeiro 10 cm e o segundo 15 cm da prega antecubital. A medida final analisada corresponde a média destas 6 medidas realizadas. Este mesmo procedimento foi adotado para as medidas de hidratação e TEWL, descritas a seguir.

#### **4.6.5 Hidratação da pele**

A hidratação da pele foi medida com o equipamento Corneometer® CM 825 (Courage & Khazaka, Cologne, Alemanha), que fornece valores em unidades arbitrárias, através de capacitância elétrica (Heinrich et al., 2003). O transdutor do aparelho, ao tocar a pele, utiliza o estrato córneo como membrana dielétrica do sistema. As medidas são arbitrariamente expressas em índices de hidratação, que aumentam conforme melhora da hidratação cutânea.

#### **4.6.6 Perda de água transepidérmica ou *Transepidermal Water Loss* (TEWL)**

A perda de água transepidérmica, do inglês transepidermal water loss (TEWL), foi aferida através do aparelho Tewameter® TM 300 (Courage & Khazaka, Cologne, Alemanha), que realiza a aferição através de uma sonda com câmara aberta, contendo 4 sensores de temperatura e umidade capazes de inferir a taxa de evaporação de água na pele em g/h/m<sup>2</sup>.

#### **4.6.7 Exame ultrassonográfico da pele**

Os aparelhos de ultrassonografia (USG) de 20 MHz Dermascan C (Cortex Technology, Hadsund, Dinamarca) e de 22 MHz Ultrascan UC 22 (Courage & Khazaka, Cologne, Alemanha), foram utilizados para obter imagens da pele em corte transversal. Com o intuito de reduzir possíveis influências de variações da ecogenicidade na derme ao longo do dia (Tsukahara et al., 2001), todas as participantes foram avaliadas entre as 8 e 10 horas da manhã. A curva de compensação de ganho foi ajustada na posição oblíqua entre 17-26 dB.

Para execução do exame, a quantidade padrão de gel de USG indicada pelo fabricante foi aplicada na abertura do transdutor de USG e o excesso foi removido. O transdutor foi posicionado perpendicularmente à superfície cutânea na face dorsal do antebraço esquerdo, para aferições em dois pontos: o primeiro a 10 cm e o segundo a 15 cm da prega antecubital. Todas as participantes foram posicionadas de forma padronizada (Caetano et al., 2016).

As imagens ultrassonográficas foram gravadas para processamento e análise através do programa de análise digital fornecido pelos próprios fabricantes. Foram analisadas medidas de densidade total da derme e espessura dérmica (Waller; Maibach, 2005; Dąbrowska; Mielcarek; Nowak, 2018).

#### 4.7 PARÂMETROS HISTOLÓGICOS

Antes e após a suplementação oral, foram realizadas biópsias com *punch* de 6mm de diâmetro na pele fotoexposta do antebraço, distando 10 cm da prega antecubital, após aplicação de anestesia local com xylocaína a 10%. As amostras foram divididas ao meio com bisturi, sendo metade do fragmento de pele armazenada em formol, para avaliações histológicas, e a outra metade armazenada em solução RNA later (Sigma, CA, USA) a 20°C para posterior análise de transcritos pelo método da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR).

O fragmento de pele acondicionado em formol 10% tamponado foi posteriormente processada em até 48 horas para confecção de blocos de parafina. Os blocos foram estocados até o término da inclusão de todas as participantes do estudo, a fim de que as colorações e marcações de imuno-histoquímica fossem realizadas num só tempo.

Os blocos foram colocados em freezer para resfriamento e cortados em micrótomo manual na espessura de 5 micras. Em seguida, foram colocados em banho-maria a +/-65°C e apostos nas lâminas já identificadas com o código da participante. Logo após, permaneceram na estufa à 60°C durante 40 minutos para posterior desparafinização e hidratação dos cortes. Os fragmentos de pele foram então submetidos às seguintes colorações/ reações:

- a) Hematoxilina-Eosina (HE);
- b) Picrosirius;
- c) Weigert-oxona.

Todas as lâminas foram digitalizadas no aparelho Aperio Scan-scope Cs (Aperio Technologies, Vista, CA) no aumento de 40X e analisadas através do programa Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, Maryland). Para as avaliações de Weigert e Picrosirius com e sem polarização, foram obtidas seções digitais de 4000 x 2000 pixels, sendo analisados

separadamente 3 campos da derme superficial e 3 campos da derme profunda, para cada lâmina digitalizada.

#### **4.7.1 Hematoxilina-eosina (HE)**

As lâminas coradas pela HE foram analisadas através do programa Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, Maryland), para definir as seguintes medidas: área completa da epiderme, excluindo-se a camada córnea, comprimentos da superfície da epiderme e da junção dermo-epidérmica (JDE), razão entre os comprimentos da JDE e da superfície da epiderme e razão entre a área de epiderme e o comprimento da superfície epidérmica.

#### **4.7.2 Picrosirius vermelho**

As lâminas foram deixadas por uma hora na solução de Picrosirius vermelho, preparada através da mistura de 0,2 g de *picrosirius-red* (Sirius red F3B; Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) com 100ml de solução aquosa saturada de ácido pícrico. Em seguida foram lavadas em água corrente por 5 minutos, coradas pela hematoxilina durante o dobro do tempo usual, lavadas novamente em água corrente por 10 minutos, desidratadas, diafanizadas e adequadamente montadas, para análise das fibras colágenas (Junqueira; Bignolas; Brentani, 1979).

##### **4.7.2.1 Picrosirius vermelho sem polarização**

A análise foi feita através do software Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, Maryland), tomando medidas de área marcada, área total e razão área marcada/área total.

#### 4.7.2.2 Picosirius vermelho com polarização

Para distinção entre fibras de colágeno maduro e colágeno recém-formado, foi utilizado um Microscópio Zeiss Axioplan (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Alemanha) equipado com filtros adequados para permitir a análise com microscopia circularmente polarizada. A morfometria foi realizada a partir das imagens digitais obtidas no microscópio e analisadas usando o programa FIJI (Madison, WI, USA).

A microscopia polarizada foi utilizada para observar a proporção de colágeno jovem, evidenciado nas cores verde e amarelo, assim como de colágeno antigo, definido pelas cores vermelho e laranja (Junqueira; Bignolas; Brentani, 1979).

As imagens digitais das seções das biópsias foram segmentadas em faixas nas cores descritas, usando valores de matiz, saturação e brilho para criar uma máscara. Neste estudo, os valores para o canal vermelho e laranja foram definidos com matiz de 34 a 193, saturação de 81 a 255 e brilho de 90 a 255. Já para o canal verde/amarelo, foram determinados valores de matiz de 52 a 178, saturação de 0 a 255 e brilho de 109 a 255. Os mesmos parâmetros foram aplicados para todas as imagens sem qualquer modificação, permitindo uma comparação e avaliação quantitativa das fibras de colágeno novas e antigas em termos de porcentagem, em pixels, de áreas ocupadas por vermelho/laranja e verde/amarelo.

#### 4.7.3 Weigert

Os cortes histológicos foram submetidos à coloração pelo método da fucsina-resorcina de Weigert com oxidação prévia pela oxona na concentração de 1% ( $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$ , Du Pont Co.) para evidenciação das fibras elásticas. A análise dos resultados foi feita em relação à fração de área marcada, através do programa Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, Maryland).

#### 4.7.4 Expressão de proteínas por imuno-histoquímica (IHQ)

Cortes histológicos de 4 micras de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. A3648) a 2%.

Estes cortes histológicos foram desparafinizados em dois banhos de xilol que duraram 20 e 10 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram hidratados na sequência decrescente de etanol (absoluto, 95% e 70%) e água corrente, durante cinco minutos cada etapa.

Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena em câmara escura com três incubações em água oxigenada na concentração de 3%, durante 10 minutos. As lâminas foram então lavadas em água corrente por cinco minutos e submetidas a recuperação antigênica em calor úmido, banho maria a 95°C por 20 min em solução tampão pH 9,0 (Dako), de acordo com a particularidade do anticorpo.

Após esta recuperação, foram lavadas duas vezes com água corrente, destilada e PBS em pH 7,4, sucessivamente. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi feito através da incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé®), para posteriormente serem realizadas as marcações com anticorpo primário NRF2 (ab 31163, DAKO) e p53 (M3629, DAKO) (Quadro 1), incubados por 18 horas. Após nova lavagem das lâminas, por duas vezes, em tampão PBS em pH 7.4 durante cinco minutos cada, foi realizada a incubação do anticorpo pós-primário *Novolink* (Novolink Max Polymer Detection System, cód. RE7159, Leica Biosystems, Newcastle Upon Tine, UK) e ou *Spring Reveal Polyvalent HRP* (Spring Bioscience, cód. DCMT 125 Pleasanton, CA EUA) pronto para uso, em câmara úmida, durante 30 min, à temperatura ambiente.

As lâminas foram então lavadas em tampão PBS em pH 7.4, por duas vezes, por cinco minutos cada, e incubadas com o polímero Novolink (Novolink Max Polymer Detection System, cód. RE7161, Leica Biosystems, Newcastle) ou *Reveal*

(Spring Bioscience cód. DHRR 125, Pleasanton, CA EUA) pronto para uso, em câmara úmida por 30 minutos, à temperatura ambiente.

Os sítios de ligações foram revelados com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. D5637), na concentração de 0,03%, acrescida de 1,2 ml de água oxigenada com 3% de concentração. Novamente, as lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos, contracoradas com Hematoxilina de Carazzi durante 30 segundos, lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. A montagem de todas as lâminas foi realizada com resina Permunt (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, cód. SP15-100).

Quadro 1 - Anticorpos primários utilizados na imuno-histoquímica para detecção das proteínas Nrf2 e p53 na pele das participantes

NRF2 (ab 31163)	P53 (M3629)
Diluição 1:80	Diluição 1:200
Sistema: Reveal Spring bioscience	Sistema: Novolink Leica Biosystems
Banho maria 95° C 20min	Banho maria 95° C 20min
pH 9,0 DAKO	pH 9,0 DAKO
Controle positivo: Placenta	Controle positivo: Carcinoma cólon

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2022.

Para avaliação de p53 e NRF2, as lâminas foram digitalizadas no aparelho Aperio Scan-scope Cs (Aperio Technologies, Vista, CA), com aumento de 40X, e analisadas através do software Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, Maryland). No caso do p53, toda a extensão de epiderme de cada lâmina foi avaliada. Já para o NRF2, foram obtidas seções digitais de cada lâmina,

com medidas de 4000 x 2000 pixels, sendo analisados separadamente 3 campos da derme superficial e 3 campos da derme profunda.

Para análises dos resultados de p53, foram contados os núcleos positivamente marcados na epiderme e o número total de células desta camada em cada seção de fragmento de pele obtido. Além do valor percentual de núcleos positivos, foram utilizados dois escores de categorização. O primeiro classificou o percentual de núcleos marcados, considerando 0 quando menor de 1%, 1 quando de 1 a 10%, 2 quando acima de 10 até 50% e 3 com mais de 50%. O segundo categorizou a intensidade da marcação, tomando por 0 quando negativa, 1 para fraca, 2 para moderada e 3 para forte (Liang et al., 1999). A soma destes dois escores foi calculada e analisada, assim como o percentual de núcleos positivos.

Para análise de resultados de NRF2, foram consideradas a área com coloração positiva, a área total avaliada e a densidade óptica integrada (IOD), como uma medida da intensidade da cor do anticorpo no tecido marcado.

#### 4.8 PARÂMETROS LABORATORIAIS

Antes e logo após a suplementação oral, foram coletadas amostras de sangue de todas as voluntárias, após devida assepsia local, por punção venosa, utilizando-se sistema de coleta a vácuo, em tubos estéreis, contendo o sal dipotássico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA-K2) como anticoagulante. Parte das amostras foi destinada à realização de exames bioquímicos, enquanto as demais foram armazenadas a -20°C para posterior análise sérica do perfil de citocinas e quimiocinas pelo método de *cytometric bead array* (CBA) e para realização de dosagem sérica de CoQ10.

##### 4.8.1 Exames bioquímicos

Foram realizadas coletas de sangue antes e depois da suplementação oral, para avaliação dos seguintes parâmetros laboratoriais, na Divisão de Laboratório

Central (DLC) do HCFMUSP. Os itens analisados foram: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), apolipoproteína A1 (APO A1), apolipoproteína B (APO B), fosfatase alcalina (FA), bilirrubina direta (BD), bilirrubina indireta (BI), bilirrubina total (BT), creatinina (CR), uréia (UR), gama glutamil transferase (GGT), glicemia de jejum (GLI), hemoglobina glicada (HBA1C), contagem de plaquetas (PLQ), hemoglobina (HB), hematócrito (HT), leucócitos totais (LEUCO), neutrófilos (NEUTRO), eosinófilos (EOS), basófilos (BASO), linfócitos (LINFO), monócitos (MONO), insulina (INSUL), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), colesterol total (COL), colesterol não-HDL (COL NÃO-HDL), triglicérides (TGL), lipoproteína A (LIPO A), proteínas totais (PT), albumina (ALB) e globulina (GLOB).

#### **4.8.2 Dosagem de citocinas séricas por *Cytometric Bead Array* (CBA)**

A determinação da concentração de citocinas de perfil pró e anti-inflamatório, como TNF, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10, nos sobrenadantes séricos foram realizadas pela técnica de CBA, antes e após a intervenção, seguindo as especificações do fabricante (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os limites de detecção utilizados foram: TNF = 67,3 fg/mL; IL-6 = 68,4 fg/mL; IL-1 $\beta$  = 48,4 fg/mL; IL-10 = 13,7 fg/mL. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo (Fortessa X-20, BD Biosciences) e os resultados foram gerados em formato gráfico e tabular utilizando o programa BD FCAPArray 3.0 (BD Biosciences).

#### **4.8.3 Dosagem de coenzima q10 no sangue (ELISA)**

Essas dosagens séricas de CoQ10 foram realizadas antes da primeira dose e 24 horas após a última dose da suplementação oral. Foi utilizada a metodologia de imunoensaio enzimático do tipo ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), de acordo com orientações do fabricante do kit E3164Hu, *Human CoenzymeQ10*

*ELISA kit* (Bioassay Tech Laboratory, Bioassay Technologies), cujo alcance de detecção varia entre 0,5ng/mL e 180ng/mL, com sensibilidade de 0,23ng/mL.

#### **4.8.4 Expressão dos genes por PCR em tempo real (q-RT-PCR) para metaloproteinases, proto-oncogenes e fatores antioxidantes na pele**

A avaliação dos genes por q-RT-PCR foi realizada em fragmento de pele. O tecido foi submetido à maceração com o uso do TissueRuptor (Qiagen) e a extração de RNA total foi obtido com o auxílio dos kits RNeasy Plus Mini Kit e QIAshredder (Qiagen, Alemanha), que conferem pureza e eliminação do gDNA. Os níveis de RNA foram mensurados com auxílio do espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, EUA). Para obtenção de cDNA a partir do RNA total purificado foi utilizado o kit Script (Biorad). Para a realização da reação de amplificação em tempo real foi utilizada, para cada amostra: 5 µL cDNA (30 ng/µL), 7 µL da solução SYBR® Green (Applied Biosystem) e 2 µL (10 µM) dos *primers* sense e anti-sense.

Os iniciadores utilizados, sintetizados pela *Invitrogen*, foram:

MMP1

F (5-ATGTGGAGTGCCTGATGTGG-3)

R (5-TGGCGTGTAATTTTCAATCCTGT-3)

MMP3

F (5-CACTCACAGACCTGACTCGG-3)

R (5-AGTCAGGGGGAGGTCCATAG-3)

## MMP9

F (5-AAGGATGGGAAGTACTGGCG-3)

R (5-GCTCCTCAAAGACCGAGTCC-3)

## AP-1 c-JUN

F (5'- CCAACTCATGCTAACGCAGC -3')

R (5'- TCTCTCCGTCGCAACTTGTC-3')

## AP-1 FOS

F (5'- TGGCGTTGTGAAGACCATGA-3')

R (5'- CTGTCTCCGCTTGGAGTGTA-3')

TGF- $\beta$  Receptor II

F (5- GTCTGTGTGGCTGTATGGAGAA-3)

R (5- TTGGGGTCATGGCAAACCTGT-3)

## SOD

F (5- AGGCATGTTGGAGACTTGGG-3)

R (5- TGCTTTTTTCATGGACCACCAG-3)

## Catalase

F (5'- CTCCGGAACAACAGCCTTCT-3')

R (5'- GAATGCCCGCACCTGAGTAA-3')

## Peroxirredoxina 6

F (5- TGCCTGGAGCAAGGATATCAA-3)

R (5- GGCAAGCTCCCGATTCTAT-3)

TGF-  $\beta$ 

F (5- GGAAATTGAGGGCTTTCGCC-3)

R (5- AGTGAACCCGTTGATGTCCA-3)

## GAPDH

F: GAAGGTGAAGGTCGGAGT

R: GAAGATGGTGATGGGATTTTC

A amplificação foi realizada através do aparelho ABI7500 (Applied Biosystem) e os resultados foram avaliados pelo threshold cycle (Ct) do gene de interesse normalizado com o Ct do controle interno de Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH). O aumento da expressão do gene foi comparado em relação às células não estimuladas de acordo com o método de Livak et al., em 2001(2- $\Delta\Delta$ Ct).

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação das variáveis entre os tempos de tratamento em cada grupo e entre os grupos para cada tempo foi utilizado o modelo linear de efeitos mistos, composto a partir de efeitos aleatórios e fixos. Esta metodologia é utilizada na análise de dados onde as respostas de um mesmo indivíduo estão agrupadas e a suposição de independência entre as observações num mesmo grupo não é adequada (Schall, 1991).

As análises foram realizadas no software estatístico SAS 9.4. Foi fixado o nível de significância  $\alpha = 0,05$  para todas as análises.

Para correlacionar as variáveis clínicas por tempo e ganhos residuais, utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman. Este coeficiente é uma medida de correlação não-paramétrica, ou seja, avalia a relação entre duas variáveis baseado nos postos das observações das variáveis sem fazer suposições sobre a distribuição de frequência dessas.

Para o cálculo da correlação não residual, inicialmente calcularam-se os ganhos residuais em percentual de cada variável entre os tempos (Rankin; Tracy, 1965). Posteriormente, utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman. As análises foram realizadas no software estatístico SAS 9.4.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Foram triadas 50 voluntárias que, espontaneamente, entraram em contato com os pesquisadores após visualização do cartaz de recrutamento afixado nas dependências da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). Três voluntárias foram excluídas inicialmente, de acordo com critérios previamente determinados, pois uma delas iniciaria tratamento com estatina via oral, outra apresentava ao exame físico lesão dermatológica compatível com granuloma anular e iniciaria fototerapia como método de tratamento e a terceira enquadrava-se no fototipo VI da classificação de Fitzpatrick (Fitzpatrick, 1988).

As demais 47 voluntárias participaram da primeira reunião convocada para esclarecimentos acerca do estudo, leitura, esclarecimento de dúvidas e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e agendamentos das avaliações clínicas e laboratoriais. Destas, duas não compareceram ao primeiro agendamento, onde realizariam avaliações clínicas e laboratoriais, por motivos pessoais, como viagem de férias e acompanhamento do filho em internação hospitalar.

Cada uma das 45 voluntárias que prosseguiram nas avaliações recebeu um código variando de CQ-1 a CQ-45, mantido em sigilo e conhecido apenas por um pesquisador independente, que não fez análises neste estudo. As cápsulas de suplementação oral contendo CoQ10 100mg, CoQ10 200mg ou placebo também receberam códigos numéricos determinados e conhecidos unicamente pelo farmacêutico responsável. A correspondência entre o código da participante e o código da cápsula foi feita de forma computadorizada, randomizada simples, através do Excel 2011 (Microsoft, Redmond, WA, USA), seguindo a alocação de 1:1 (Kim; Shin, 2014). As cápsulas possuíam cores e embalagens plásticas semelhantes, diferindo apenas pelo registro do código no rótulo.

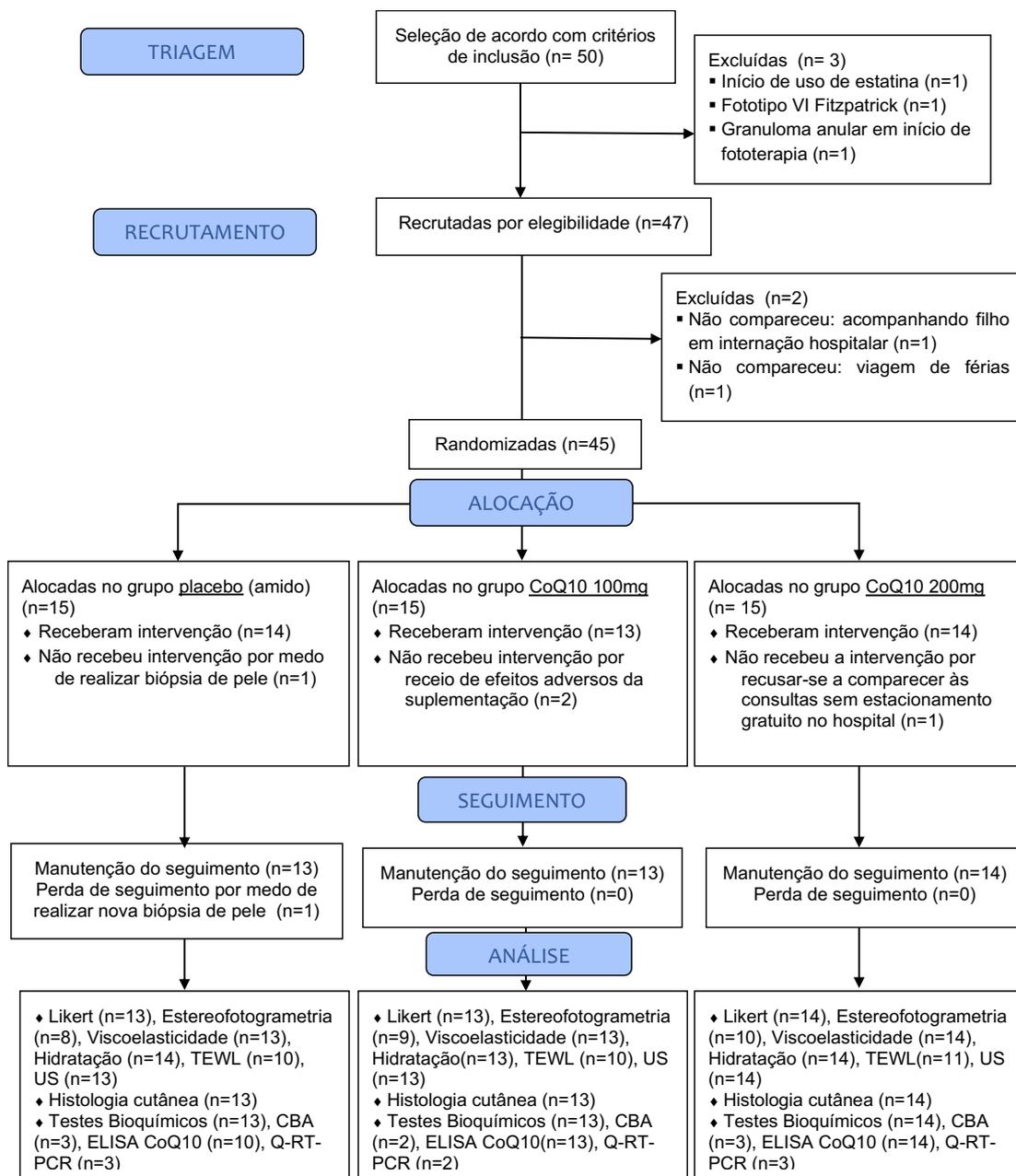
Das 45 participantes randomizadas, uma desistiu por receio de realizar a biópsia cutânea, duas desistiram por receio de efeitos adversos com a

suplementação oral, após discutir o assunto com a família, e uma terceira recusou-se a manter o seguimento por não disponibilizarmos estacionamento gratuito no local das coletas de exames. O diagrama de fluxo das participantes da pesquisa clínica está representado na Figura 2.

Ante o exposto, 41 voluntárias iniciaram a suplementação oral, sendo randomizadas para 3 grupos: placebo (14), CoQ10 100mg (13) e CoQ10 200mg (14). Todas mantiveram seguimento clínico regular com a mesma médica dermatologista, a cada 4 semanas, durante 12 semanas. Uma única voluntária, identificada ao final do estudo após a abertura do cegamento, estava alocada no grupo placebo e faltou à última coleta de exames por receio de realizar uma nova biópsia de pele.

As medidas de TEWL e estereofotogrametria não foram realizadas em todas as participantes da pesquisa porque o estudo teve início na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), onde os respectivos aparelhos não estavam disponíveis, ou seja, apenas 31 (10 placebo; 10 CoQ10 100 mg e 11 CoQ10 200mg) foram submetidas a medida de TEWL e 27 (8 placebo; 9 CoQ10 100 mg e 10 CoQ10 200mg) a estereofotogrametria. As análises através de CBA e PCR-TR também foram realizadas em algumas participantes da pesquisa de cada grupo por causa do elevado custo dos testes, ou seja, apenas 8 (3 placebo; 2 CoQ10 100 mg e 3 CoQ10 200mg) foram submetidas a essas análises. Do mesmo modo, a dosagem sérica de CoQ10 através de ELISA não foi realizada em todas as participantes da pesquisa por limitações de recursos financeiros deste projeto, ou seja, apenas 37 (10 placebo; 13 CoQ10 100 mg e 14 CoQ10 200mg) foram submetidas a essa dosagem.

Figura 2 - Diagrama de fluxo das voluntárias do ensaio clínico



Fonte: Adaptado de Eldridge et al., 2016.

A idade das participantes da pesquisa variou entre 60 e 76 anos, com média de idade, entre os grupos, de: 65,7, 63,7 e 66,3 para placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg, respectivamente. O nível de escolaridade, em anos de estudo, variou de 5 a 20, em média de 12,4, 12,8 e 14,6 para placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg, respectivamente. As profissões mais frequentes relatadas foram dona de casa, professora e secretária. A maior parte das participantes da pesquisa não apresentou história atual ou pregressa de tabagismo; a maioria não praticava atividade física regularmente. As principais comorbidades encontradas foram: asma, depressão, diabetes, dislipidemia, hipertensão, hipotireoidismo e osteoporose. As características clínicas e demográficas da população estudada estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas da população estudada

	<b>Placebo (n=14)</b>	<b>CoQ10 100mg (n=13)</b>	<b>CoQ10 200mg (n=14)</b>
Idade (anos)	60-73 Média= 65,7	60-69 Média= 63,7	63-76 Média= 66,3
Fototipo de Fitzpatrick	II (n=6) III (n=8)	II (n=7) III (n=6)	II (n=7) III (n=7)
Escolaridade (anos de estudo)	9-16 Média=12,4	5-20 Média=12,8	10-16 Média=14,6
Profissão	Dona de casa (n=2) Secretária (n=3) Professora (n=2) Terapeuta (n=1) Corretora (n=2)	Dona de casa (n=5) Jornalista (n=1) Médica (n=1) Dançarina (n=1) Vendedora (n=1) Bibliotecária (n=1)	Antropóloga (n=1) Secretária (n=2) Dona de casa (n=1) Jornalista (n=1) Administradora (n=1) Bióloga (n=1)

	Placebo (n=14)	CoQ10 100mg (n=13)	CoQ10 200mg (n=14)
	Auxiliar de enfermagem (n=2)	Professora (n=1)	Professora (n=2)
	Advogada (n=1)	Costureira (n=1)	Vendedora (n=1)
	Publicitária (n=1)	Secretária (n=1)	Comerciante (n=2)
			Enfermeira (n=1)
			Artesã (n=1)
História de tabagismo	21,4% (n=3)	15,4% (n=2)	14,3% (n=2)
Atividade física (2 a 5 vezes por semana)	28,6% (n=4)	38,5% (n=5)	21,4% (n=3)
Comorbidades			
Asma	7,1% (n=1)	7,7% (n=1)	14% (n=2)
Depressão	7,1% (n=1)	7,7% (n=1)	0% (n=0)
Diabetes	7,1% (n=1)	7,7% (n=1)	7,1% (n=1)
Dislipidemia	42,8% (n=6)	15,4% (n=2)	0% (n=0)
Hipertensão	35,7% (n=5)	30,8% (n=4)	28,6% (n=4)
Hipotireoidismo	21,4% (n=3)	23,1% (n=3)	7,1% (n=1)
Osteoporose	0% (n=0)	15,4% (n=2)	0% (n=0)

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

## 5.2 PARÂMETROS CLÍNICOS

### 5.2.1 Relatos e observações de eventos adversos, sinais e sintomas clínicos

Cinco participantes do grupo CoQ10 200mg relataram maior disposição para desempenhar as atividades domésticas. Uma delas explicou que passou a aspirar a casa inteira em metade do tempo habitual. Outras três idosas, alocadas no grupo da CoQ10 100mg, perceberam suas roupas mais folgadas, sinalizando provável

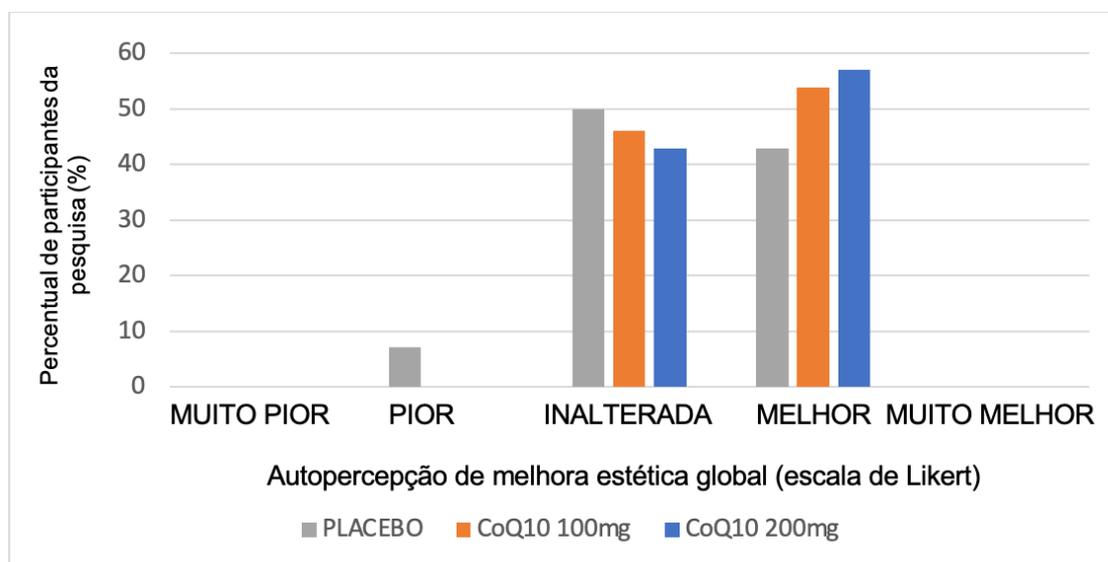
redução de gordura abdominal, uma vez que mantiveram o peso corporal. Duas participantes, por sua vez, reportaram o evento de queda da própria altura durante o período de seguimento clínico do estudo, sem fraturas ou comprometimentos sistêmicos. Ao final do estudo, revelou-se que ambas pertenciam ao grupo placebo.

Potenciais efeitos adversos reportados na literatura, como desconforto abdominal, cefaléia, náuseas e vômitos (Singh, 2007), não foram detectados neste estudo. O único efeito adverso relatado por 3 participantes, sendo duas do grupo CoQ10 100mg e uma do grupo CoQ10 200mg, foi queda de cabelo após a oitava semana de suplementação oral.

### **5.2.2 Autopercepção de melhora estética global**

Quando questionadas acerca da autopercepção de melhora estética global, numa análise pela escala de Likert (Cox et al., 2003), nenhuma das voluntárias considerou-se nos extremos “muito pior” ou “muito melhor”. Apenas no grupo placebo foi marcada a opção “pior”, representando 7,1%. Do total de participantes da pesquisa em cada grupo, 50% daquelas do placebo, 46,1% CoQ10 100mg e 42,8% CoQ10 200mg perceberam seu aspecto estético global “inalterado”, enquanto 42,8% placebo, 53,8% CoQ10 100mg e 57,1% CoQ10 200mg sentiram-se “melhor” (Figura 3).

Figura 3 - Gráfico de barras evidenciando a autopercepção das participantes da pesquisa sobre melhora estética global, após suplementação oral nos grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



Legenda: as repostas foram divididas entre 5 opções, de acordo com a escala de Likert: muito pior, pior, inalterado, melhor e muito melhor. Os resultados não mostraram diferenças estatísticas.

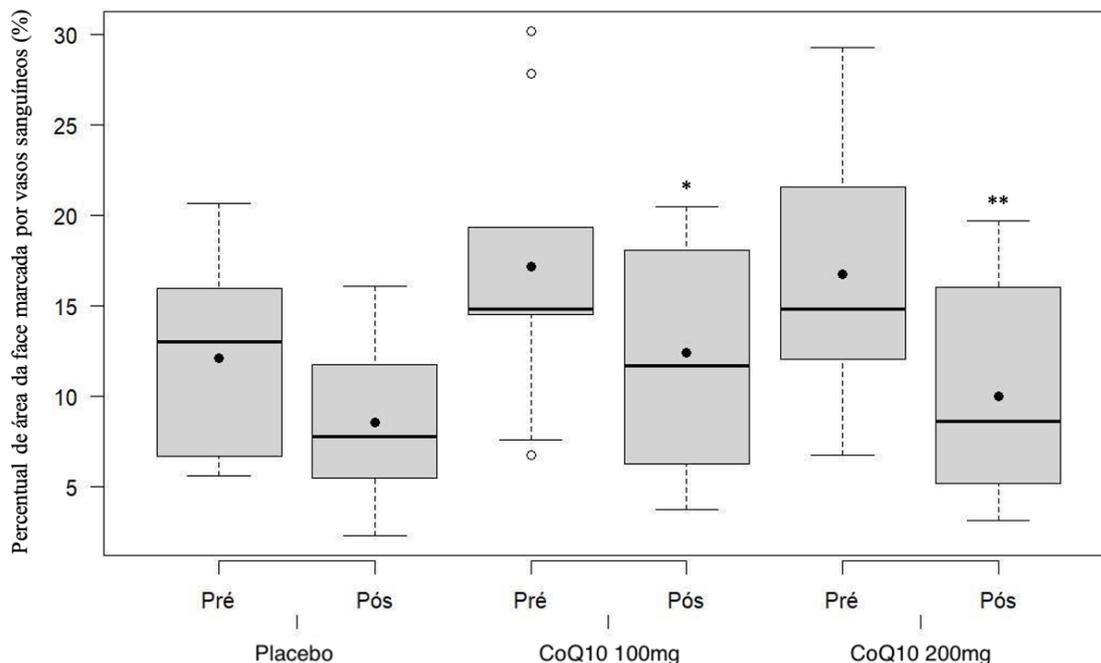
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

### 5.2.3. Imagens faciais por estereofotogrametria

#### 5.2.3.1 Vasos sanguíneos

O percentual de área da face marcada por vasos sanguíneos mostrou resposta significativa após suplementação com CoQ10. Houve redução média de 27,8% ( $p=0,0355$ ) no grupo CoQ10 100mg e de 40,4% ( $p=0,0029$ ) no grupo CoQ10 200mg. O grupo placebo não mostrou diferença estatística (Figura 4 e Tabela 2).

Figura 4 - *Boxplot* evidenciando o percentual de área da face marcada por vasos sanguíneos, através da estereofotogrametria, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=8), CoQ10 100mg (n=9) e CoQ10 200mg (n=10)



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 2 - Diferença entre médias do percentual de área da face marcada por vasos sanguíneos, através da estereofotogrametria, pré e pós suplementação, nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

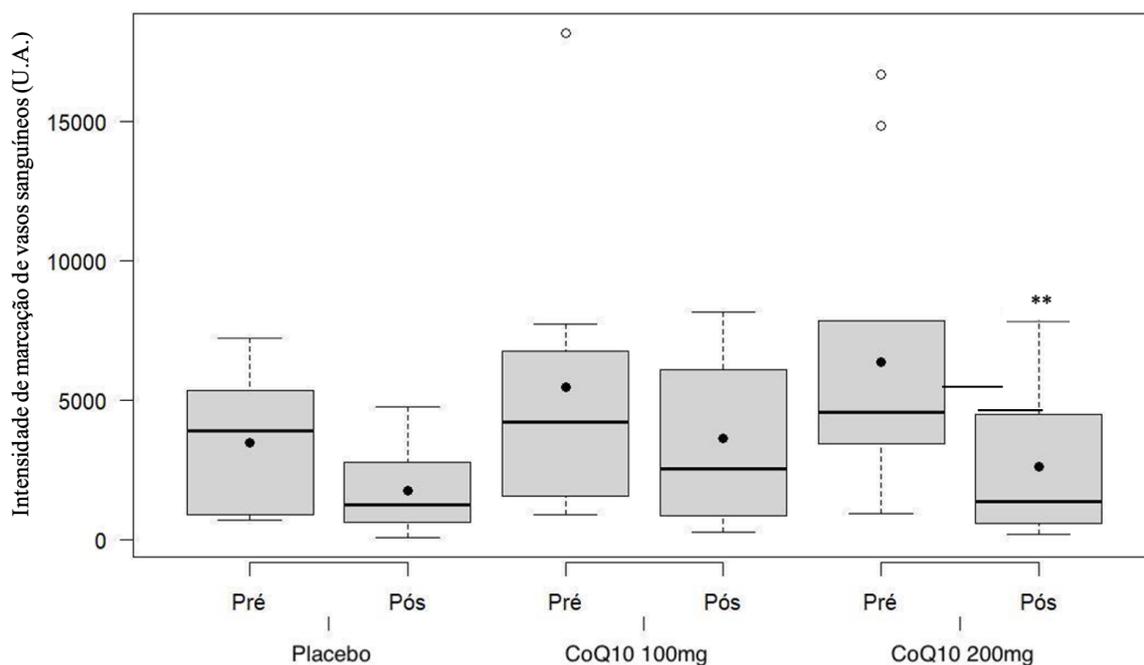
Suplemento	Comparação entre Tempos	Diferença	IC(95%)	EP	GL	Valor t	p-valor
PLACEBO	PÓS - PRÉ	-3,531	-8,462 1,400	2,383	23	-1,48	0,152
100MG	PÓS - PRÉ	-4,763	-9,175 -0,352	2,133	23	-2,23	0,0355 *
200MG	PÓS - PRÉ	-6,752	-10,937 -2,567	2,023	23	-3,34	0,0029 **

Legenda: \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Quando avaliada a densidade óptica integrada (DOI), que representa a intensidade da marcação, na área da face marcada por vasos sanguíneos, houve redução média de 58,9% ( $p=0,0068$ ) no grupo CoQ10 200mg. Os demais grupos mostraram tendência a redução, mas sem significância estatística (Figura 5 e Tabela 3).

Figura 5 - *Boxplot* evidenciando a intensidade da marcação, por estereofotogrametria, na área da face marcada por vasos sanguíneos, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo ( $n=8$ ), CoQ10 100mg ( $n=9$ ) e CoQ10 200mg ( $n=10$ )



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com  $**p<0,01$ .

U.A.: Unidades Arbitrárias

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 3 - Diferença entre médias da intensidade de marcação, por estereofotogrametria, em unidades arbitrárias (U.A.), na área da face marcada por vasos sanguíneos, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

Suplemento	Comparação			Diferença	IC(95%)	EP	GL	Valor t	p-valor
	entre	Tempos							
PLACEBO	pós	-	pré	-1691	-4754 1372	1481	23	-1,14	0,2652
100MG	pós	-	pré	-1837	-4586 910	1328	23	-1,38	0,1799
200MG	pós	-	pré	-3747	-6355 -1139	1260	23	-2,97	0,0068 **

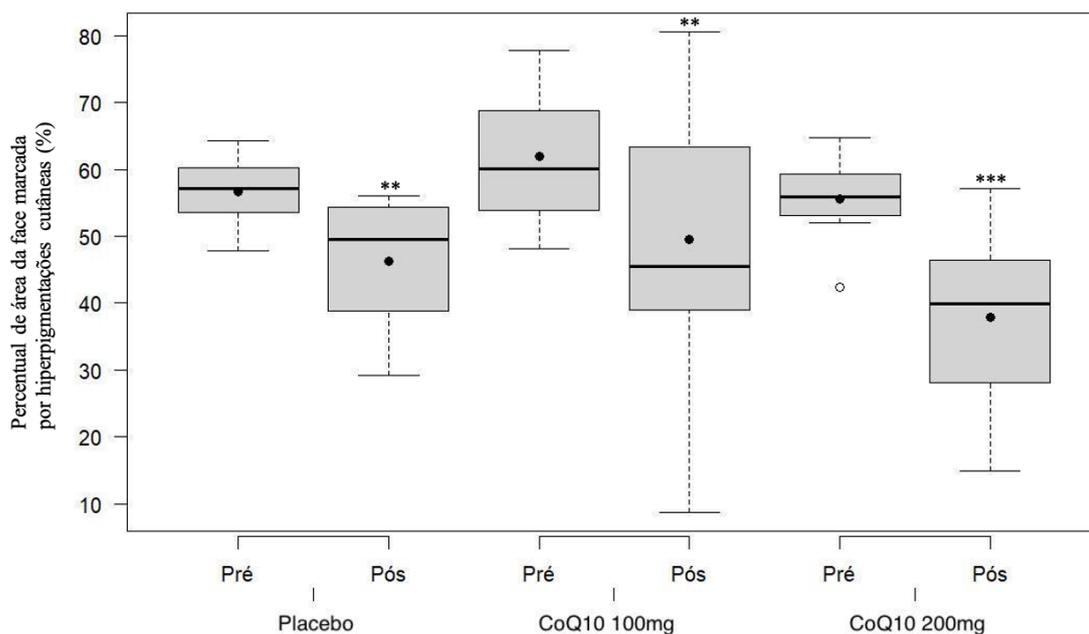
Legenda: \*\*p<0,01.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

#### 5.2.3.2. Hiperpigmentações cutâneas

Analogamente às medidas de vasos sanguíneos na face, as medidas de hiperpigmentações cutâneas mostraram resultados significativos, comparando os períodos pré e pós suplementação para cada um dos grupos. Ao avaliar o percentual de área da face marcada por hiperpigmentações, após a suplementação, houve redução em todos os grupos (Gráfico 4). A diminuição média foi de 19,5% (p=0,0086) no grupo placebo, 19,9% (p=0.0018) no grupo CoQ10 100mg e 31,7% (p<0,0001) no grupo CoQ10 200mg (Figura 6 e Tabela 4).

Figura 6 - *Boxplot* evidenciando o percentual de área da face marcada por hiperpigmentações cutâneas, através da estereofotogrametria, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=8), CoQ10 100mg (n=9) e CoQ10 200mg (n=10)



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 4 - Diferença entre médias do percentual de área da face marcada por hiperpigmentações cutâneas, através da estereofotogrametria, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

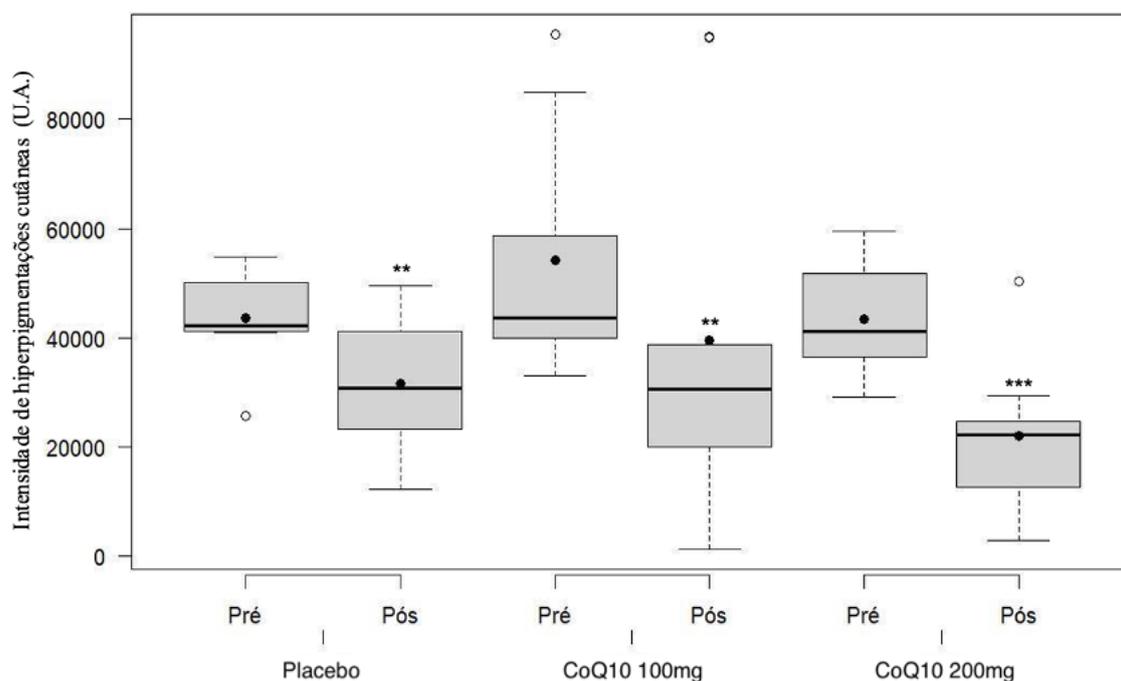
Suplemento	Comparação entre Tempos	Diferença	IC(95%)	EP	GL	Valor t	p-valor
PLACEBO	PÓS - PRÉ	-11,252	-19,358 -3,146	3,919	23	-2,87	0,0086 **
100MG	PÓS - PRÉ	-12,338	-19,566 -5,110	3,494	23	-3,53	0,0018 **
200MG	PÓS - PRÉ	-17,617	-24,474 -10,759	3,315	23	-5,31	<0,0001 ***

Legenda: \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Ao avaliar a intensidade da marcação por hiperpigmentações cutâneas, através da DOI, houve redução média de 29,9% ( $p=0,0052$ ) no grupo placebo, 27% ( $p=0,001$ ) no grupo CoQ10 100mg e 49,1% ( $p<0,0001$ ) no grupo CoQ10 200mg (Figura 7 e Tabela 5).

Figura 7 - *Boxplot* evidenciando a intensidade da marcação de hiperpigmentações cutâneas, por estereofotogrametria, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo ( $n=8$ ), CoQ10 100mg ( $n=9$ ) e CoQ10 200mg ( $n=10$ )



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com \*\* $p<0,01$  e \*\*\* $p<0,001$ .

U.A.: Unidades Arbitrárias.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 5 - Diferença entre médias da intensidade de marcação, por estereofotogrametria, em unidades arbitrárias (U.A.), na área da face marcada por hiperpigmentações cutâneas, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

Suplemento	Comparação entre Tempos	Diferença	IC(95%)			EP	GL	Valor t	p-valor
PLACEBO	PÓS - PRÉ	-13476	-22495	-4458	4360	23	-3,09	0,0052	**
100MG	PÓS - PRÉ	-14611	-22613	-6610	3868	23	-3,78	0,001	**
200MG	PÓS - PRÉ	-21260	-28850	-13669	3669	23	-5,79	<0,0001	***

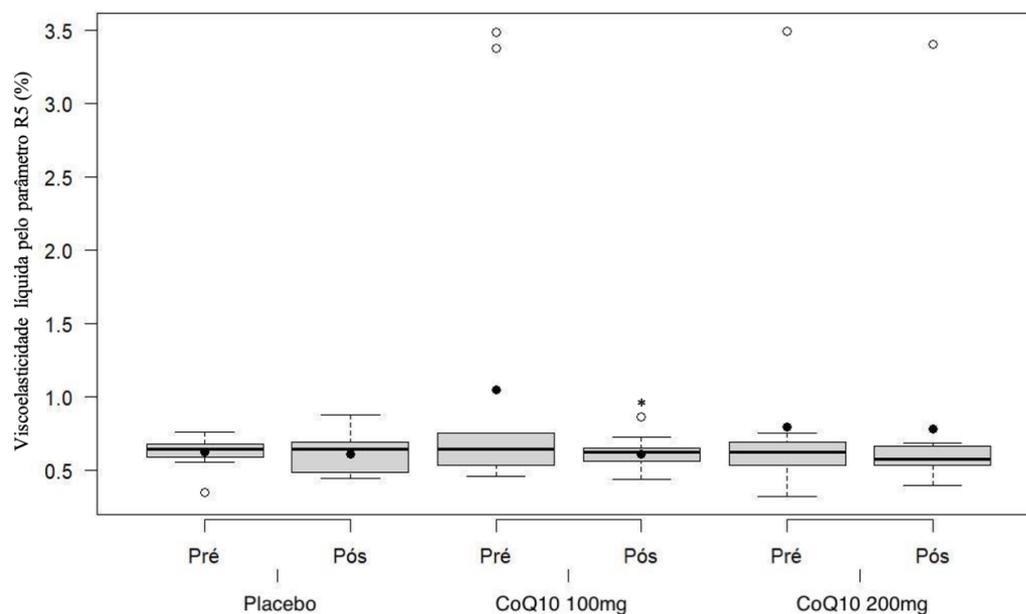
Legenda: \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

#### 5.2.4 Viscoelasticidade da pele

Os parâmetros de viscoelasticidade representados por R5 e R6 demonstraram diferença significativa no grupo CoQ10 100mg. Após a suplementação, houve redução de 42% (p=0,0185) em R5 e de 72% (p=0,0195) em R6. Os grupos placebo e CoQ10 200mg permaneceram sem alterações significativas (Figuras 8 e 9 e Tabelas 6 e 7).

Figura 8 - *Boxplot* evidenciando o parâmetro de viscoelasticidade R5, que representa elasticidade líquida em percentual, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com  $*p < 0,05$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

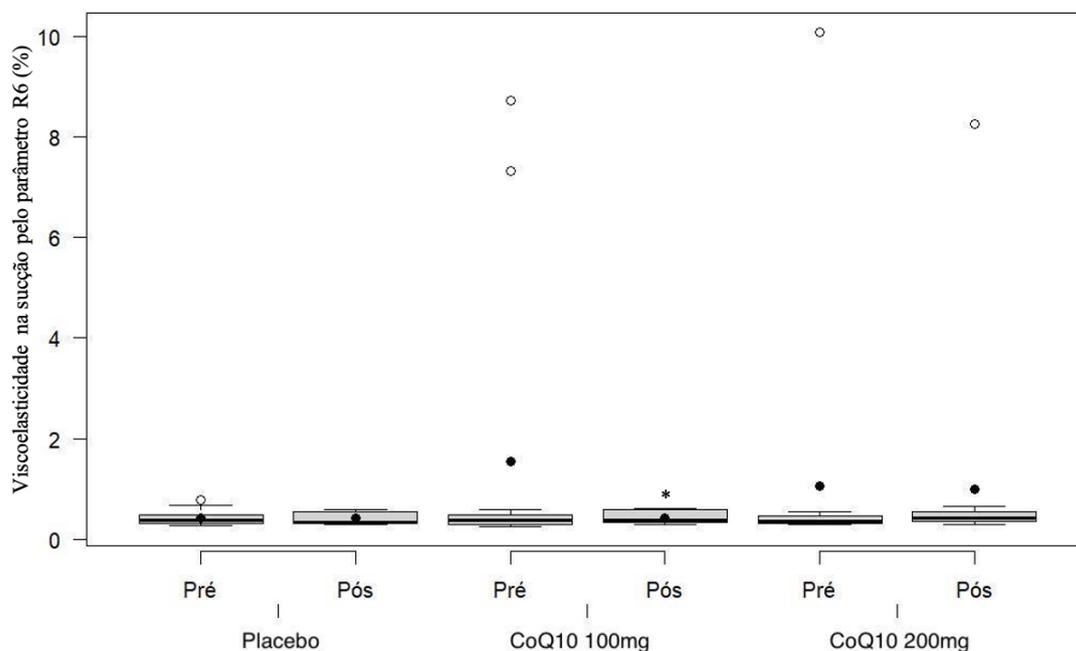
Tabela 6 - Diferença entre médias do percentual de viscoelasticidade líquida, representada pelo parâmetro R5, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

Suplemento	Comparação entre Tempos	Diferença	IC(95%)	EP	GL	Valor t	p-valor
<b>PLACEBO</b>	PÓS - PRÉ	-0,015	-0,388 0,357	0,184	36	-0,08	0,9337
100MG	PÓS - PRÉ	-0,440	-0,802 -0,078	0,178	36	-2,47	0,0185 *
200MG	PÓS - PRÉ	-0,017	-0,366 0,331	0,172	36	-0,1	0,9197

Legenda:  $*p < 0,05$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Figura 9 - *Boxplot* evidenciando o parâmetro de viscoelasticidade R6, que representa a porção de viscoelasticidade durante a curva de sucção, em percentual, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com  $*p < 0,05$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 7 - Diferença entre médias do percentual de viscoelasticidade na sucção, representada pelo parâmetro R6, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

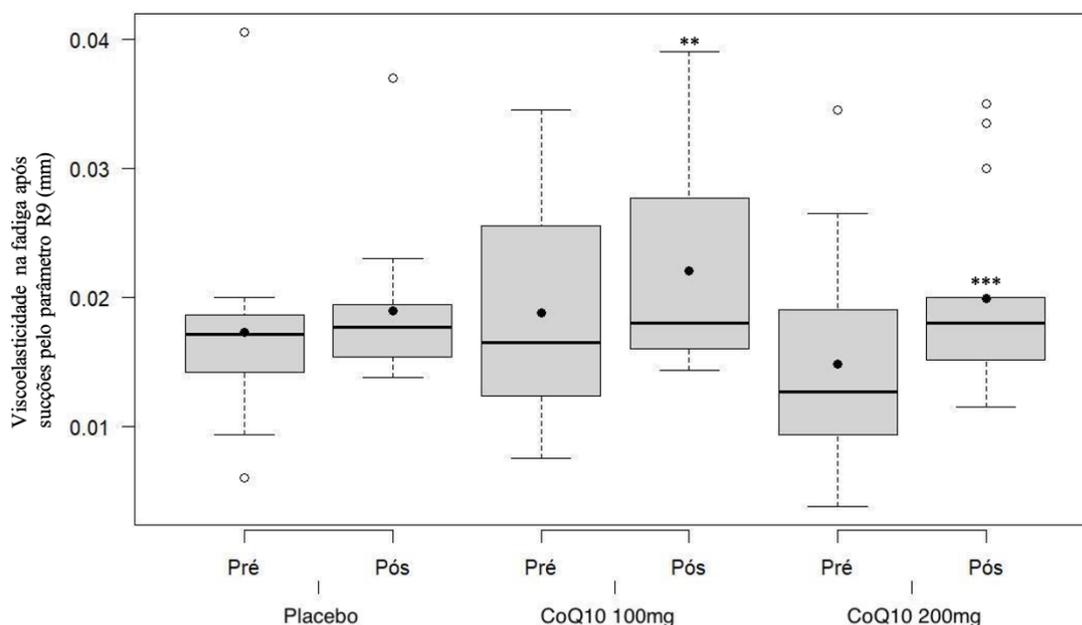
Suplemento	Comparação entre Tempos	Diferença	IC(95%)	EP	GL	Valor t	p-valor
PLACEBO	PÓS - PRÉ	-0,015	-0,975 0,944	0,473	36	-0,03	0,9741
100MG	PÓS - PRÉ	-1,120	-2,049 -0,191	0,458	36	-2,44	0,0195 *
200MG	PÓS - PRÉ	-0,075	-0,970 0,820	0,441	36	-0,17	0,8661

Legenda:  $*p < 0,05$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

No parâmetro R9, houve aumento significativo nos grupos CoQ10 100mg (17%,  $p=0,0248$ ) e CoQ10 200mg (34,3%,  $p=0,0004$ ) sem alterações significativas no grupo placebo (Figura 10 e Tabela 8).

Figura 10 - *Boxplot* evidenciando o parâmetro de viscoelasticidade R9, que representa fadiga após repetidas sucções, em milímetros, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo ( $n=13$ ), CoQ10 100mg ( $n=13$ ) e CoQ10 200mg ( $n=14$ )



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com \*\* $p<0,01$  e \*\*\* $p<0,001$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 8 - Diferença entre médias do parâmetro de viscoelasticidade R9, que representa fadiga após repetidas sucções, em milímetros, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

Suplemento	Comparação entre Tempos	Diferença	IC(95%)		EP	GL	Valor t	p-valor
<b>PLACEBO</b>	PÓS - PRÉ	0,001	-0,001	0,004	0,001	36	0,99	0,3276
100MG	PÓS - PRÉ	0,003	0,000	0,006	0,001	36	2,34	0,0248 **
200MG	PÓS - PRÉ	0,005	0,002	0,008	0,001	36	3,87	0,0004 ***

Legenda: \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001.

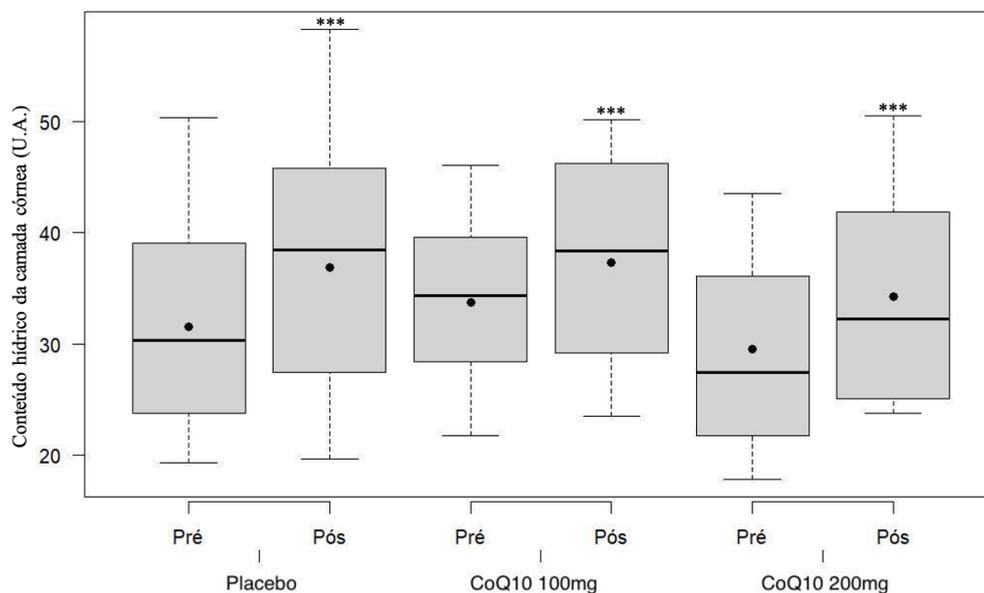
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Todos os demais parâmetros de viscoelasticidade cutânea avaliados não demonstraram diferença significativa entre os grupos. As respectivas tabelas estão descritas em apêndices para os respectivos parâmetros: R0 (Apêndices A e B), R2 (Apêndices C e D) e R7 (Apêndices E e F).

### 5.2.5. Hidratação da pele

A hidratação da pele demonstrou melhora dos parâmetros em todos os grupos após a suplementação, com aumento médio de 15,3% ( $p<0,0001$ ) no grupo placebo, 10,8% ( $p=0,0009$ ) no grupo CoQ10 100mg e 15,9% ( $p<0,0001$ ) no grupo CoQ10 200mg, conforme Figura 11 e Tabela 9.

Figura 11 - *Boxplot* evidenciando o conteúdo hídrico da camada córnea, em unidades arbitrárias (U.A.), nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=14), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com  $***p < 0,001$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 9 - Diferença entre médias do conteúdo hídrico da camada córnea, em unidades arbitrárias (U.A.), pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

Suplemento	Comparação entre Tempos	Diferença	IC(95%)		EP	GL	Valor t	p-valor
Placebo	PÓS - PRÉ	4,823	2,788	6,857	1,004	37	4,8	<0,0001 ***
100MG	PÓS - PRÉ	3,642	1,605	5,680	1,006	37	3,62	0,0009 ***
200MG	PÓS - PRÉ	4,701	2,737	6,664	0,969	37	4,85	<0,0001 ***

Legenda:  $***p < 0,001$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

### **5.2.6 Perda de água transepidérmica ou Trans-Epidermal Water Loss (TEWL)**

Não houve alteração da perda de água transepidérmica nos grupos CoQ10 100mg e CoQ10 200mg e grupo placebo (Apêndices G e H).

### **5.2.7 Exame ultrassonográfico da pele**

#### **5.2.7.1 Espessura total da pele (micrômetros)**

Não houve alteração significativa na medida de espessura total da pele, incluindo epiderme e derme total, através da USG (Apêndices I e J).

#### **5.2.7.2 Densidade da derme**

A medida de densidade dérmica à USG não mostrou diferenças significativas após a suplementação em nenhum dos grupos estudados (Apêndices K e L).

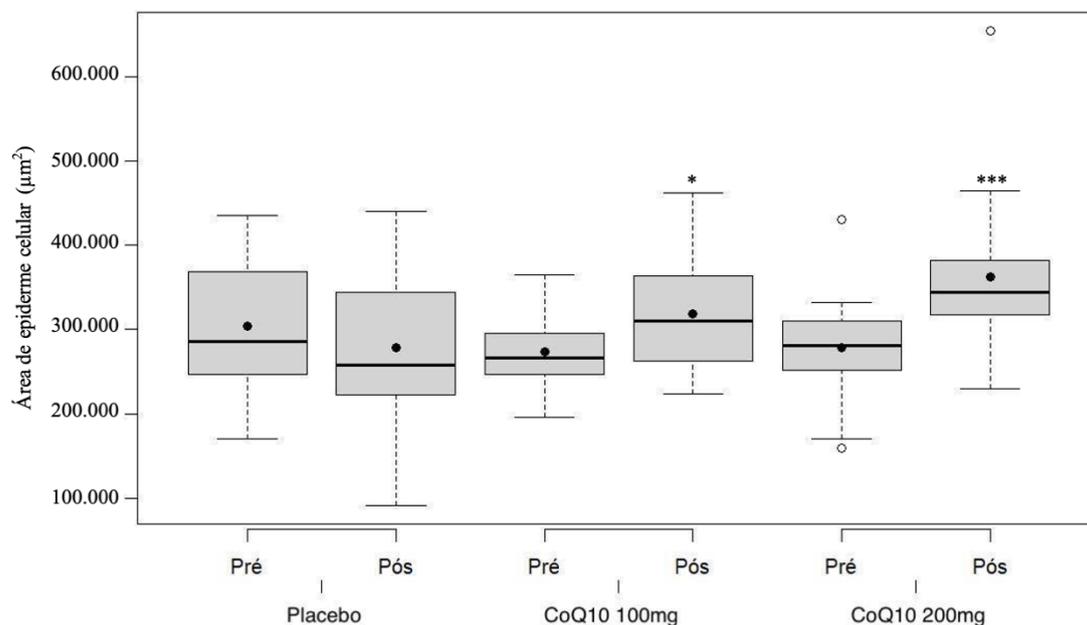
## **5.3 PARÂMETROS HISTOLÓGICOS**

### **5.3.1 Hematoxilina-eosina (HE)**

#### **5.3.1.1 Área de epiderme celular**

Houve aumento médio da área de epiderme celular de 16,4% ( $p=0,0283$ ) no grupo CoQ10 100mg e de 30,4% ( $p<0,0001$ ) no grupo CoQ10 200mg conforme dados do Figuras 12 e 13, Tabela 10.

Figura 12 - *Boxplot* evidenciando a área de epiderme celular, em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ), nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

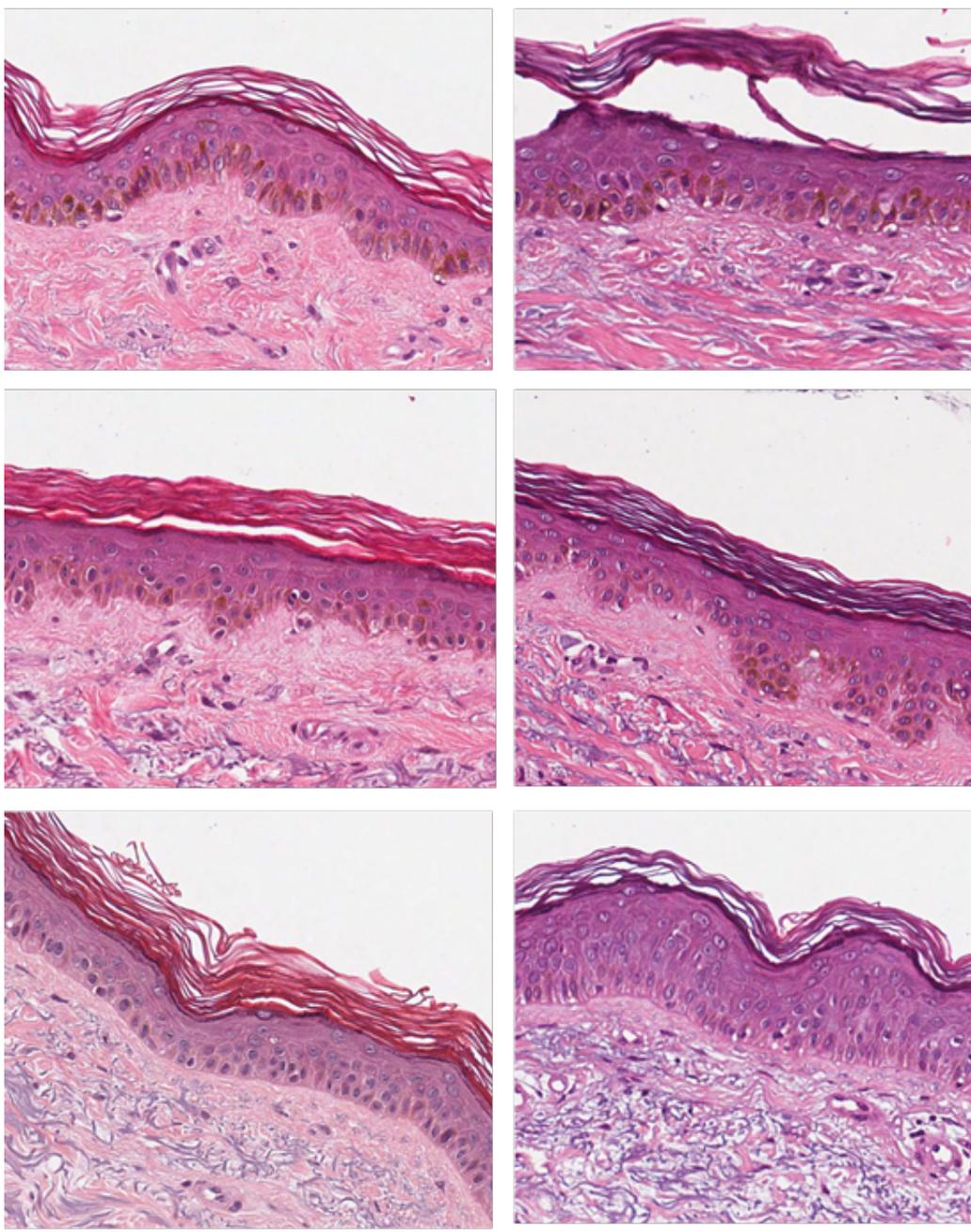
Tabela 10 - Diferença entre médias da área de epiderme celular, em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ), pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

Suplemento	Comparação entre Tempos	Diferença	IC(95%)	EP	GL	Valor t	p-valor
Placebo	PÓS - PRÉ	-21891	-61438 17655	19518	37	-1,12	0,2693
100MG	PÓS - PRÉ	44852	5028 84675	19654	37	2,28	0,0283 *
200MG	PÓS - PRÉ	84556	46182 122931	18939	37	4,46	<0,0001 ***

Legenda: \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Figura 13 - Espessura da epiderme. Imagens de campos de aumento (20x) das lâminas de amostras cutâneas do antebraço, coradas por hematoxilina-eosina



Legenda: grupos: (a) placebo pré-suplementação; (b) placebo pós-suplementação; (c) CoQ10 100mg pré-suplementação; (d) CoQ10 100mg pós-suplementação; (e) CoQ10 200mg pré-suplementação; (f) CoQ10 200mg pós-suplementação.

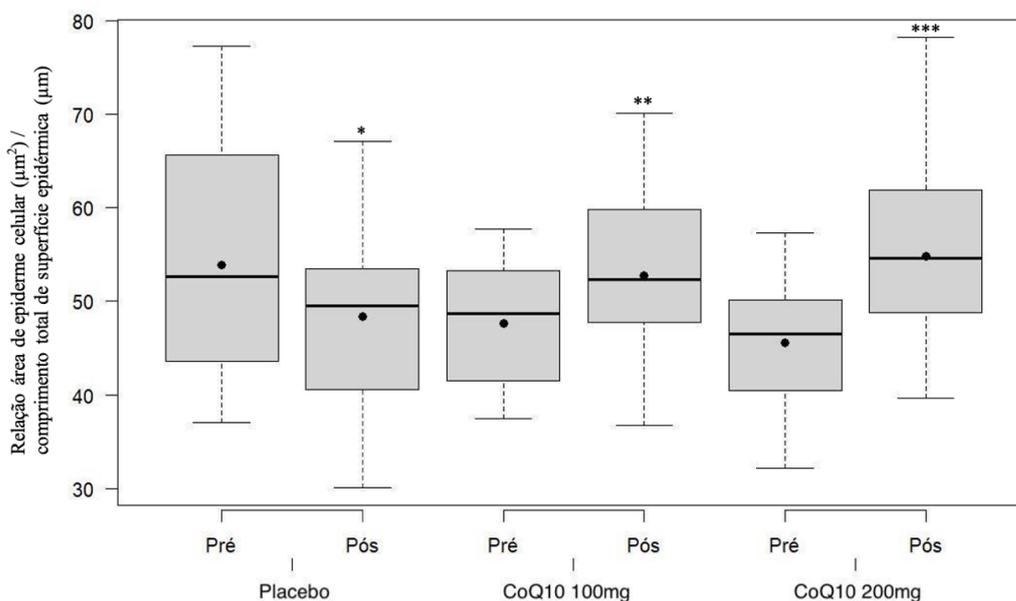
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

### 5.3.1.2 Razão entre área total de epiderme celular e extensão total da superfície epidérmica

Na razão entre a área de epiderme celular, em micrômetros quadrados, e a extensão da superfície total da epiderme, em micrômetros, do fragmento completo de pele obtido por biopsia, houve evidências de diferença significativa, comparando o período pré e pós suplementação, em todos os grupos.

Houve redução média de 8,7% ( $p=0,0115$ ) da referida razão para o grupo placebo, enquanto foi observado aumento médio de 10,7% ( $p=0,0066$ ) para o grupo CoQ10 100mg e aumento médio em 20,4% ( $p<0,0001$ ) no grupo CoQ10 200mg (Figura 14, Tabela 11).

Figura 14 - *Boxplot* evidenciando a razão entre a área de epiderme celular, em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ), e o comprimento total de superfície epidérmica, em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo ( $n=13$ ), CoQ10 100mg ( $n=13$ ) e CoQ10 200mg ( $n=14$ )



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  e \*\*\* $p<0,001$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 11 - Diferença entre médias da razão entre área de epiderme celular, em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ), e comprimento total de superfície epidérmica, em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

Suplemento	Comparação entre Tempos	Diferença	IC(95%)	EP	GL	Valor t	p-valor
Placebo	PÓS - PRÉ	-4,682	-8,249 -1,114	1,761	37	-2,66	0.0115 *
100MG	PÓS - PRÉ	5,089	1,507 8,670	1,767	37	2,88	0.0066 *
200MG	PÓS - PRÉ	9,303	5,852 12,754	1,703	37	5,46	<.0001 *

Legenda: \* $p < 0,05$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

#### 5.3.1.3 Extensão da junção dermo-epidérmica (JDE)

As medidas da extensão da JDE não mostraram diferença significativa para nenhum dos grupos (Apêndices M e N).

#### 5.3.1.4 Razão entre extensão da junção dermo-epidérmica (JDE) e superfície da epiderme

Na razão entre as extensões da JDE e a superfície da epiderme, não houve diferença significativa entre os períodos pré e pós suplementação em nenhum dos grupos (Apêndices O e P).

### 5.3.2 Picrosirius vermelho

#### 5.3.2.1 Picrosirius vermelho sem polarização

O percentual de área dérmica tanto superficial (Apêndices Q e R) quanto profunda (Apêndices S e T) marcadas pela coloração de picrosirius vermelho, evidenciando fibras colágenas, não apresentou diferenças significativas em nenhum dos grupos, na comparação pré e pós suplementação.

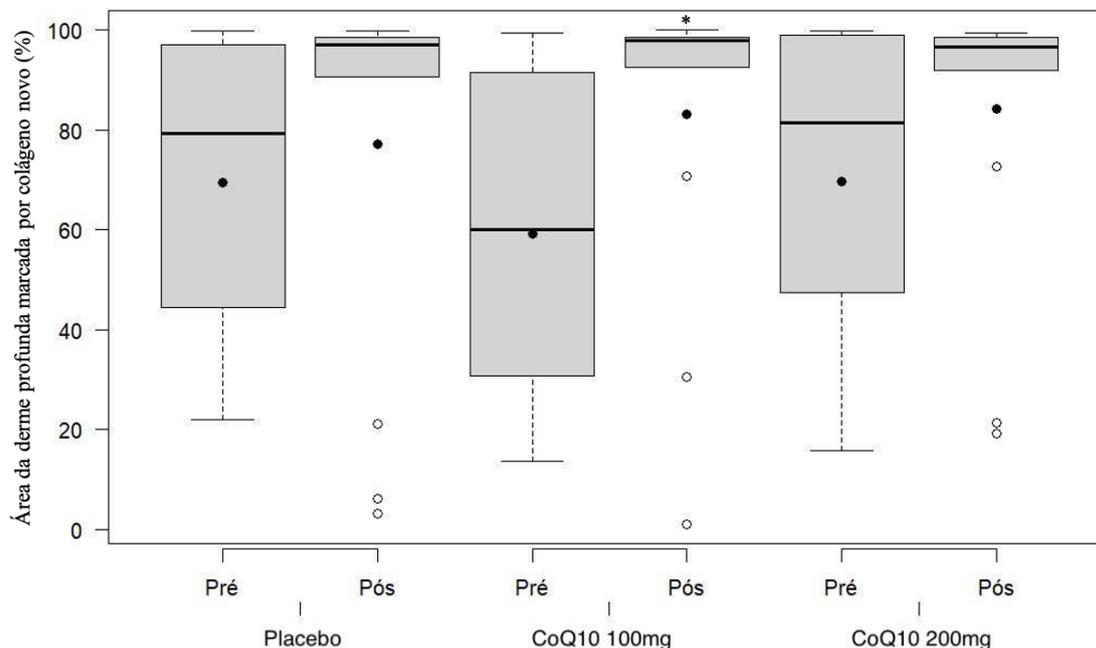
#### 5.3.2.2 Picrosirius vermelho com polarização

Os percentuais de área de colágeno novo marcado na derme superficial pela coloração de picrosirius vermelho com polarização, não foram significantes (Apêndices U e V).

De forma complementar aos resultados mostrados para fibras colágenas novas, os percentuais de área de colágeno antigo marcado na derme superficial pela coloração de picrosirius vermelho com polarização não foram significantes (Apêndices W e X).

Os percentuais de área de colágeno novo marcado na derme profunda, pela coloração de picrosirius vermelho com polarização, evidenciaram aumento significativo de 40,6% ( $p=0,0174$ ) no grupo CoQ10 100mg, mas não significativo nos demais grupos (Figura 15 e Tabela 12).

Figura 15 - *Boxplot* evidenciando percentual da área da derme profunda marcada por colágeno novo pela coloração de picosirius vermelho com polarização, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com  $*p < 0,05$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 12 - Diferença entre médias dos percentuais da área da derme profunda marcada por colágeno novo, pela coloração de picosirius vermelho com polarização, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

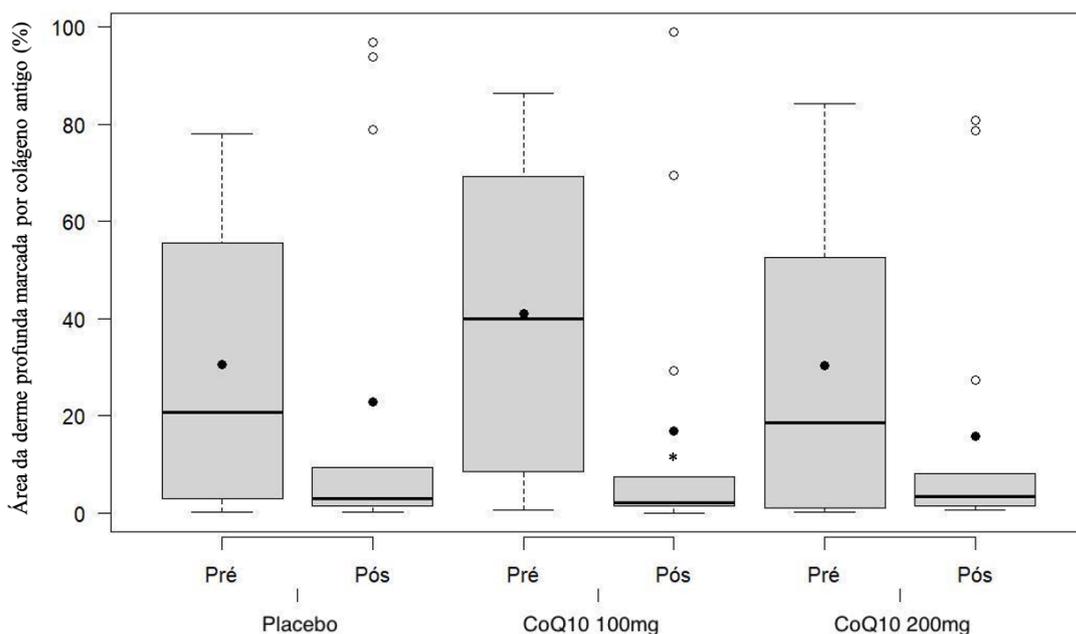
Suplemento	Comparação		Diferença	IC(95%)	EP	GL	Valor t	p-valor		
	entre	Tempos								
Placebo	PÓS	- PRÉ	8,516	-10,833	27,865	9,549	37	0,89	0,3783	
100MG	PÓS	- PRÉ	24,027	4,469	43,585	9,653	37	2,49	0,0174	*
200MG	PÓS	- PRÉ	14,645	-4,201	33,492	9,302	37	1,57	0,1239	

Legenda: \*  $p < 0,05$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

De forma análoga ao observado para colágeno novo, o percentual de área de colágeno antigo marcado na derme profunda pela coloração de picrosirius vermelho com polarização, demonstrou redução média de 58,8% ( $p=0,0174$ ) no grupo CoQ10 100mg, mas sem significância nos demais grupos (Figura 16, Tabela 13).

Figura 16 - *Boxplot* evidenciando percentual da área da derme profunda marcada por colágeno antigo pela coloração de picrosirius vermelho com polarização, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com  $*p<0,05$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 13 - Diferença entre médias dos percentuais da área da derme profunda marcada por colágeno antigo pela coloração de picrosirius vermelho com polarização, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

Suplemento	Comparação		Diferença	IC(95%)			EP	GL	Valor t	p-valor
	entre	Tempos								
Placebo	PÓS	- PRÉ	-8,516	-27,865	10,833	9,549	37	-0,89	0,3783	
100MG	PÓS	- PRÉ	-24,027	-43,585	-4,469	9,653	37	-2,49	0,0174 *	
200MG	PÓS	- PRÉ	-14,645	-33,492	4,201	9,302	37	-1,57	0,1239	

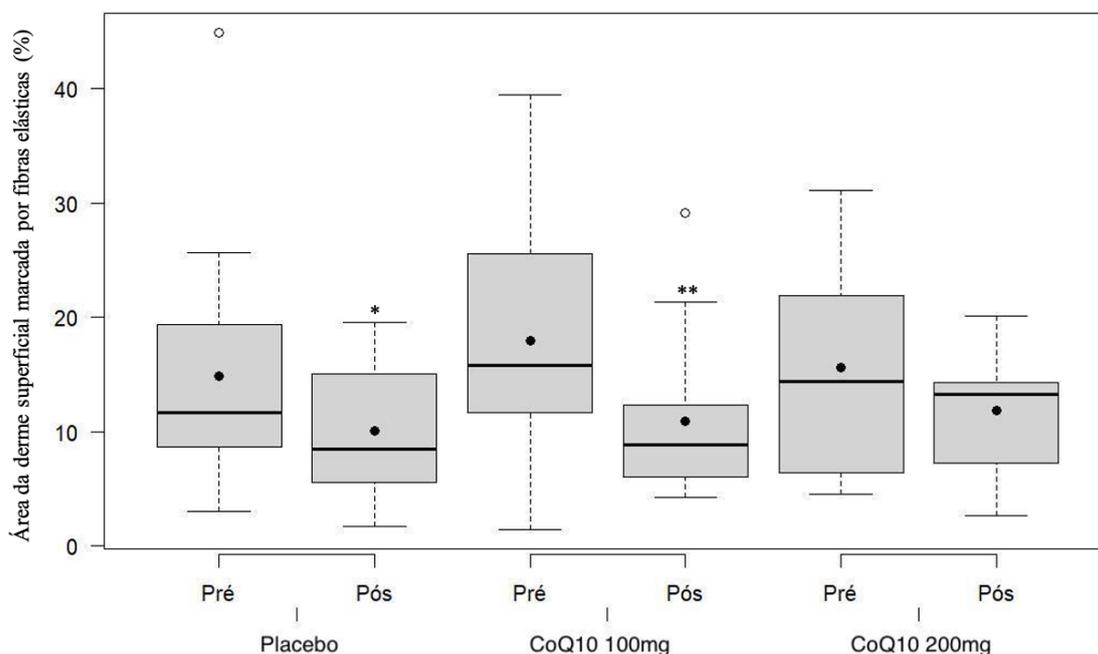
Legenda: \*  $p < 0,05$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

### 5.3.3 Weigert

O percentual de área marcada pela coloração de Weigert, evidenciando fibras elásticas na derme superficial, mostrou diferença significativa entre os grupos, com redução de 30,8% ( $p=0,0496$ ) no grupo placebo e 39,3% ( $p=0,0037$ ) no grupo CoQ10 100mg. O grupo CoQ10 200mg não apresentou diferença significativa na comparação pré e pós suplementação (Figura 17, Tabela 14).

Figura 17 - *Boxplot* evidenciando percentual da área da derme superficial marcada por fibras elásticas, pela coloração de Weigert, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 14 - Diferença entre médias dos percentuais da área da derme superficial marcada por fibras elásticas, pela coloração de Weigert, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

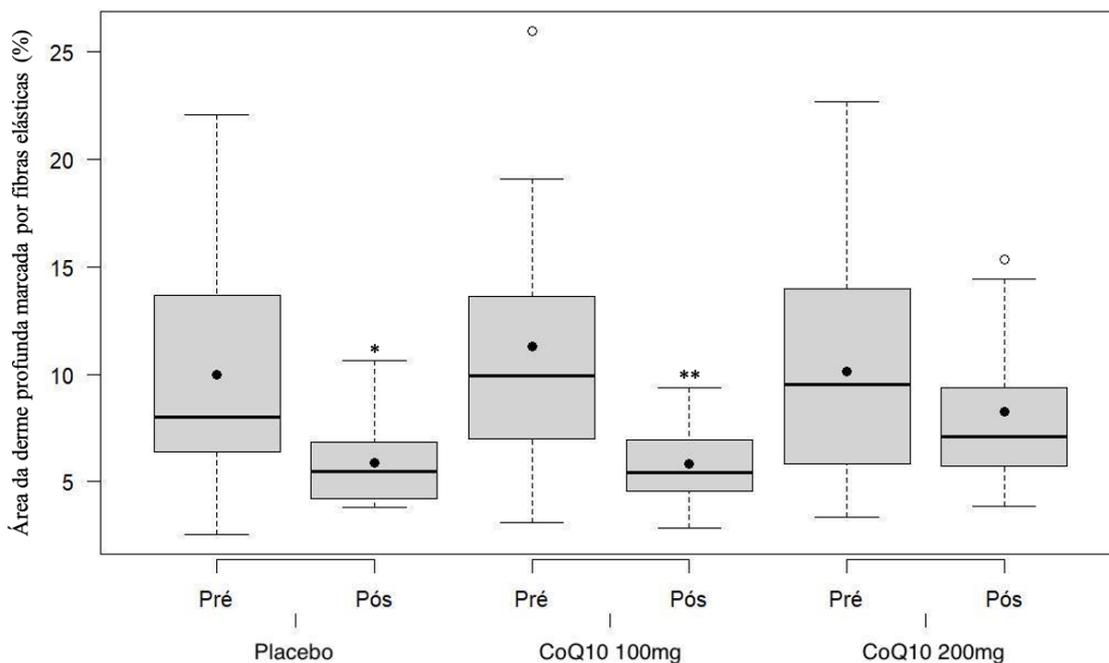
Suplemento	Comparação entre Tempos	Diferença	IC(95%)	EP	GL	Valor t	p-valor
Placebo	PÓS - PRÉ	-4,594	-9,178 -0,009	2,263	37	-2,03	0,0496 *
100MG	PÓS - PRÉ	-7,071	-11,693 -2,449	2,281	37	-3,1	0,0037 *
200MG	PÓS - PRÉ	-3,778	-8,232 0,676	2,198	37	-1,72	0,094

Legenda: \*  $p < 0,05$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Consoante resultado na derme superficial, o percentual de área marcada pela coloração de Weigert, evidenciando fibras elásticas na derme profunda, mostrou diferença significativa entre os grupos, com redução de 41% ( $p=0,0231$ ) no grupo placebo e 48,1% ( $p=0,0037$ ) no grupo CoQ10 100mg. O grupo CoQ10 200mg, entretanto, não apresentou diferença significativa entre os tempos de suplementação (Figura 18, Tabela 15).

Figura 18 - *Boxplot* evidenciando percentual da área da derme superficial marcada por fibras elásticas, pela coloração de Weigert, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo ( $n=13$ ), CoQ10 100mg ( $n=13$ ) e CoQ10 200mg ( $n=14$ )



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com  $*p<0,05$  e  $**p<0,01$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 15 - Diferença entre médias dos percentuais da área da derme superficial marcada por fibras elásticas, pela coloração de Weigert, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

Suplemento	Comparação entre Tempos		Diferença	IC(95%)		EP	GL	Valor t	p-valor
Placebo	PÓS	- PRÉ	-4,084	-7,574	-0,593	1,723	37	-2,37	0,0231 *
100MG	PÓS	- PRÉ	-5,421	-8,970	-1,871	1,752	37	-3,09	0,0037 *
200MG	PÓS	- PRÉ	-1,886	-5,306	1,535	1,688	37	-1,12	0,2712

Legenda: \*p<0,05.

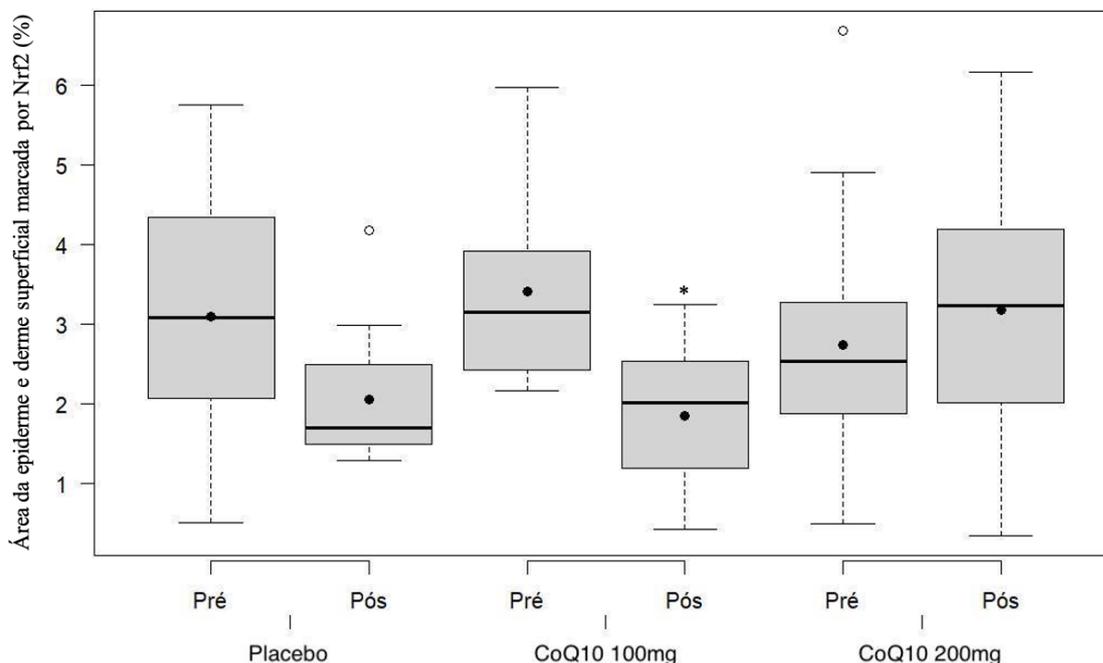
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

### 5.3.4 Expressão das proteínas por imuno-histoquímica (IHQ)

#### 5.3.4.1 Nrf2

Na análise da expressão de Nrf2, o fator regulador da resposta antioxidante, na superfície da pele, o percentual de área marcada evidenciou diferença significativa entre os tempos pré e pós suplementação para o grupo CoQ10 100mg, com redução significativa de 45,5% (p=0,0056). Os demais grupos não mostraram diferenças significantes (Figura 19 e Tabela 16).

Figura 19 - *Boxplot* evidenciando percentual da área da epiderme e derme superficial marcada por Nrf2, pela imuno-histoquímica, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com  $*p < 0,05$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 16 - Diferença entre médias dos percentuais da área da epiderme e derme superficial marcada por Nrf2, pela imuno-histoquímica, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

Suplemento	Comparação entre Tempos	Diferença	IC(95%)	EP	GL	Valor t	p-valor
Placebo	PÓS - PRÉ	-1,046	-2,096 0,005	0,518	37	-2,02	0,051
100MG	PÓS - PRÉ	-1,552	-2,621 -0,482	0,528	37	-2,94	0,0056 *
200MG	PÓS - PRÉ	0,448	-0,582 1,479	0,509	37	0,88	0,3839

Legenda:  $*p < 0,05$

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Quando comparados os valores pré e pós suplementação, houve diferença significativa na expressão de Nrf2 na superfície da pele, considerando o percentual de área marcada, pois o grupo o grupo CoQ10 200mg mostrou média significativamente superior aos demais (Tabela 17).

Tabela 17 - Diferença entre médias dos percentuais da área da epiderme e derme superficial marcada por Nrf2, pela imuno-histoquímica, nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg, comparada nos períodos pré e pós suplementação

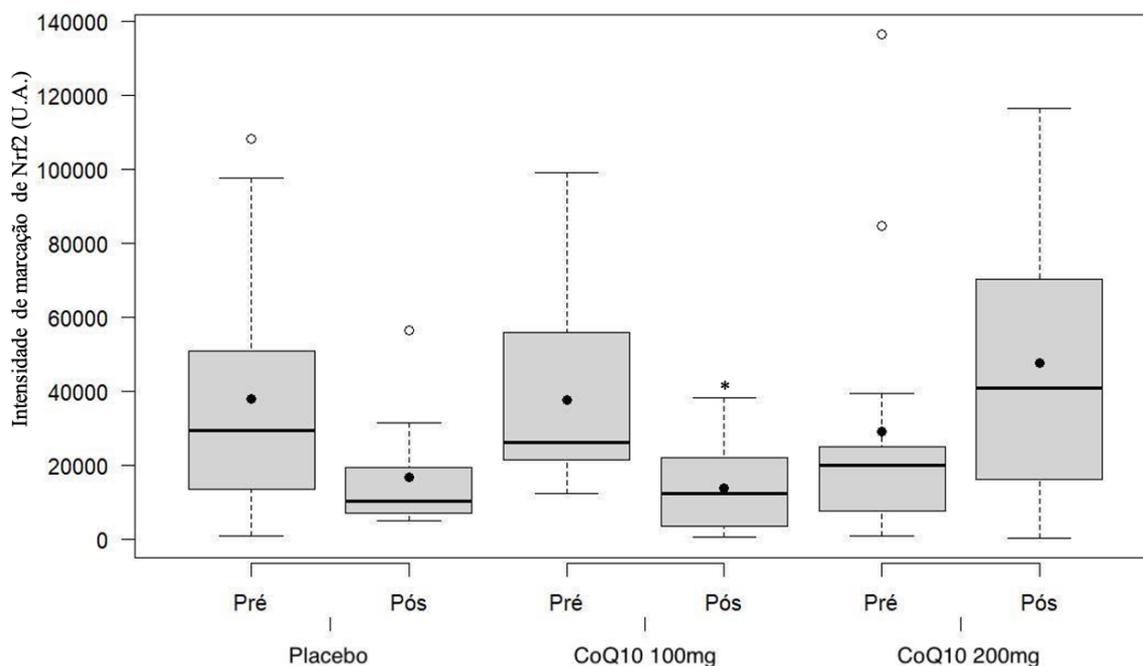
Tempo	Comparação entre Suplementos		Diferença	IC(95%)		EP	GL	Valor t	p-valor
PRÉ	Placebo	- 100MG	-0,313	-1,363	0,738	0,518	37	-0,6	0,5502
	Placebo	- 200MG	0,359	-0,672	1,389	0,509	37	0,7	0,4853
	100MG	- 200MG	0,671	-0,379	1,721	0,518	37	1,29	0,2034
PÓS	Placebo	- 100MG	0,194	-0,876	1,263	0,528	37	0,37	0,7155
	Placebo	- 200MG	-1,135	-2,185	-0,085	0,518	37	-2,19	0,0349 *
	100MG	- 200MG	-1,329	-2,379	-0,279	0,518	37	-2,56	0,0145 *

Legenda: \* $p < 0,05$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Quando analisada a expressão de Nrf2 na superfície da pele, considerando o percentual de área marcada e a intensidade da marcação pela imuno-histoquímica, os achados foram mantidos, demonstrando redução significativa, de 63,6% ( $p=0,0462$ ) no grupo CoQ10 100mg, entre os períodos pré e pós suplementação. O grupo placebo e o grupo CoQ10 200mg não mostraram diferenças (Figura 20 e Tabela 18).

Figura 20 - *Boxplot* evidenciando a intensidade da marcação de Nrf2 na epiderme e derme superficial, por imuno-histoquímica, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com  $*p < 0,05$ .

U.A.: Unidades Arbitrárias.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 18 - Diferença entre médias da intensidade da marcação de Nrf2 na epiderme e derme superficial, pela imuno-histoquímica, pré e pós suplementação, comparada entre os grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

Suplemento	Comparação entre Tempos	Diferença	IC(95%)	EP	GL	Valor t	p-valor
Placebo	PÓS - PRÉ	-21330	-44448 1787	11409	37	-1,87	0,0695
100MG	PÓS - PRÉ	-23970	-47511 -428	11619	37	-2,06	0,0462 *
200MG	PÓS - PRÉ	18366	-4320 41051	11196	37	1,64	0,1094

Legenda:  $*p < 0,05$ .

Fonte: Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Ao comparar os três grupos antes da suplementação, observamos que os índices eram semelhantes, com  $p > 0,05$ . Após a suplementação, o grupo CoQ10 200mg mostrou índices mais elevados que os demais (Tabela 19).

Tabela 19 - Diferença entre médias da intensidade da marcação de Nrf2 na epiderme e derme superficial, pela imuno-histoquímica, nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg, comparada nos períodos pré e pós suplementação

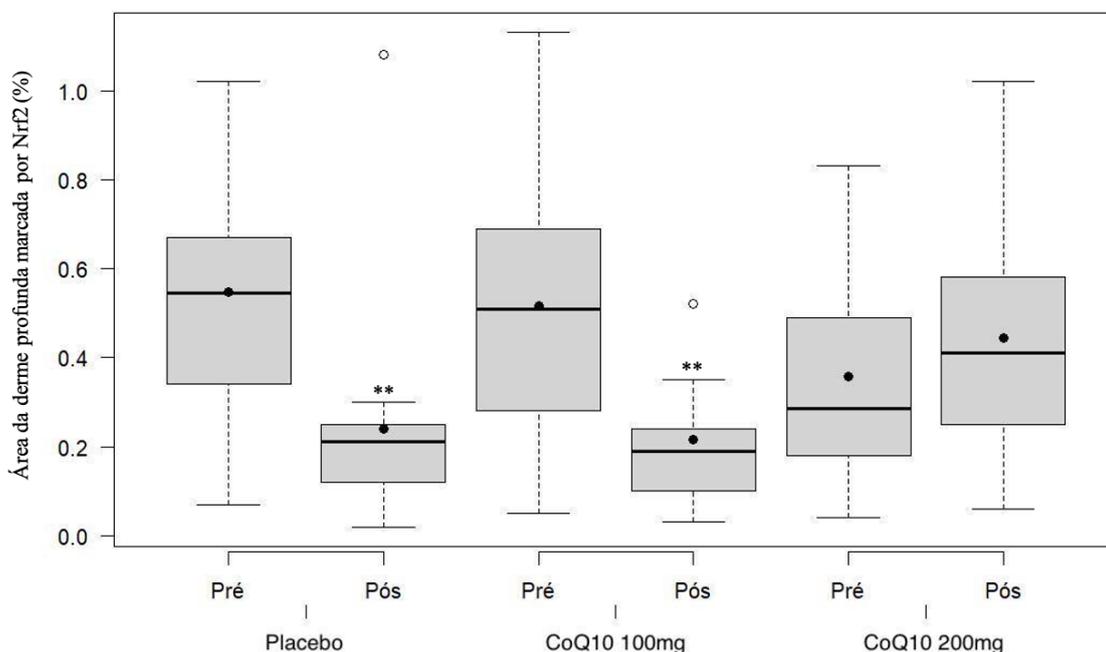
Tempo	Comparação entre Suplementos	Diferença	IC(95%)		EP	GL	Valor t	p-valor
PRÉ	Placebo - 100MG	339	-22778	23457	11409	37	0,03	0,9764
	Placebo - 200MG	8824	-13861	31509	11196	37	0,79	0,4356
	100MG - 200MG	8484	-14633	31601	11409	37	0,74	0,4618
PÓS	Placebo - 100MG	2979	-20563	26520	11619	37	0,26	0,7991
	Placebo - 200MG	-30872	-53989	-7755	11409	37	-2,71	0,0102 *
	100MG - 200MG	-33851	-56968	-10734	11409	37	-2,97	0,0052 *

Legenda: \* $p < 0,05$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

A expressão de Nrf2 na profundidade da pele, considerando o percentual de área marcada, mostrou diferença significativa entre os períodos pré e pós suplementação para os grupos placebo e CoQ10 100mg. A diminuição média para o grupo placebo foi de 56% ( $p=0,0035$ ) e de 58,3% ( $p=0,0049$ ) para o grupo CoQ10 100mg. Por outro lado, o grupo CoQ10 200mg não se alterou (Figura 21 e Tabela 20).

Figura 21 - *Boxplot* evidenciando percentual da área da derme profunda marcada por Nrf2, pela imuno-histoquímica, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com  $**p < 0,01$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 20 - Diferença entre médias dos percentuais da área da derme profunda marcada por Nrf2, pela imuno-histoquímica, pré e pós suplementação, comparada entre os grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

Suplemento	Comparação entre Tempos	Diferença	IC(95%)		EP	GL	Valor t	p-valor
Placebo	PÓS - PRÉ	-30,7	-50,7	-10,8	9,9	37	-3,12	0,0035 **
100MG	PÓS - PRÉ	-30,1	-50,4	-9,7	10,1	37	-2,99	0,0049 **
200MG	PÓS - PRÉ	8,4	-11,2	28,1	9,7	37	0,87	0,3888

Legenda:  $**p < 0,01$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Analisando apenas o tempo pré suplementação, observou-se que os três grupos iniciaram com valores estatisticamente homogêneos, porém ao final da suplementação o grupo CoQ10 200mg apresentou níveis médios significativamente mais altos que os demais (Tabela 21).

Tabela 21 - Diferença entre médias dos percentuais da área da derme profunda marcada por Nrf2, pela imuno-histoquímica, nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg, comparada nos períodos pré e pós suplementação

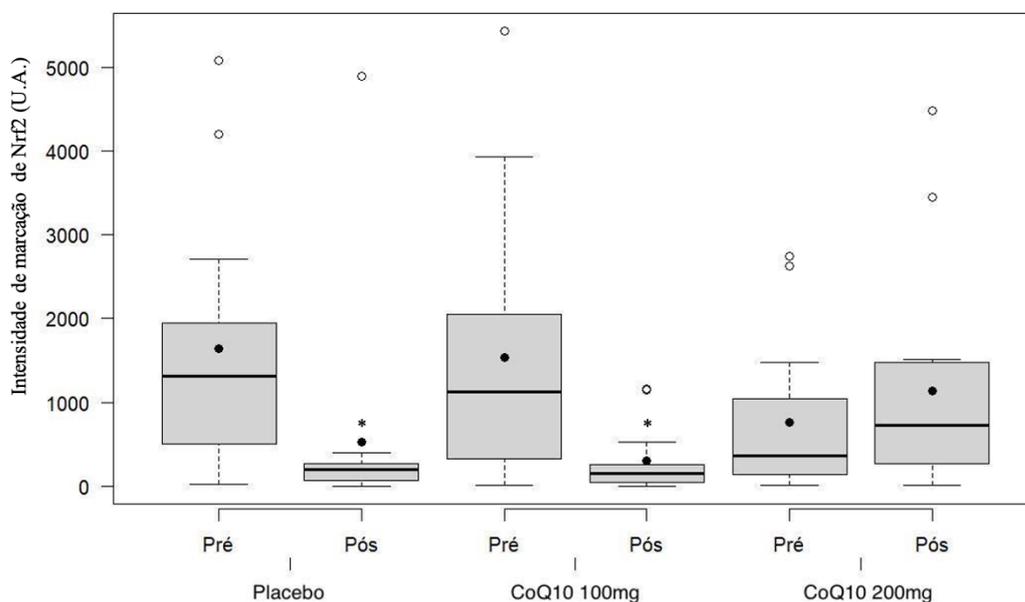
Tempo	Comparação entre Suplementos	Diferença	IC(95%)		EP	GL	Valor t	p-valor
PRÉ	Placebo - 100MG	3,3	-16,7	23,3	9,9	37	0,34	0,7363
	Placebo - 200MG	19,0	-0,6	38,6	9,7	37	1,96	0,0574
	100MG - 200MG	15,7	-4,3	35,6	9,9	37	1,59	0,1213
PÓS	Placebo - 100MG	2,7	-17,7	23,0	10,1	37	0,26	0,7928
	Placebo - 200MG	-20,2	-40,2	-0,2	9,9	37	-2,05	0,0479 *
	100MG - 200MG	-22,9	-42,9	-2,9	9,9	37	-2,32	0,0262 *

Legenda: \* $p < 0,05$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

A expressão de NRF2 na profundidade da pele, considerando o percentual de área marcada e a intensidade da coloração, mostrou evidências de diferença significativa entre os períodos pré e pós suplementação para os grupos placebo e CoQ10 100mg. Houve diminuição média em 68% ( $p=0,0263$ ) para o grupo placebo e 80,2% ( $p=0,0164$ ) para o grupo CoQ10 100mg. Por outro lado, o grupo CoQ10 200mg apresentou tendência de aumento, não significativa (Figura 22 e Tabela 22).

Figura 22 - *Boxplot* evidenciando a intensidade da marcação de Nrf2 na derme profunda, por imuno-histoquímica, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com  $*p < 0,05$ .

U.A.: Unidades Arbitrárias.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 22 - Diferença entre médias da intensidade da marcação de Nrf2 na derme profunda, pela imuno-histoquímica, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

Suplemento	Comparação entre Tempos	Diferença	IC(95%)	EP	GL	Valor t	p-valor
Placebo	PÓS - PRÉ	-1112	-2085,6 -138,4	480,5	37	-2,31	0,0263 *
100MG	PÓS - PRÉ	-1231	-2222,5 -239,5	489,3	37	-2,52	0,0164 *
200MG	PÓS - PRÉ	372,6	-582,9 1328,0	471,5	37	0,79	0,4345

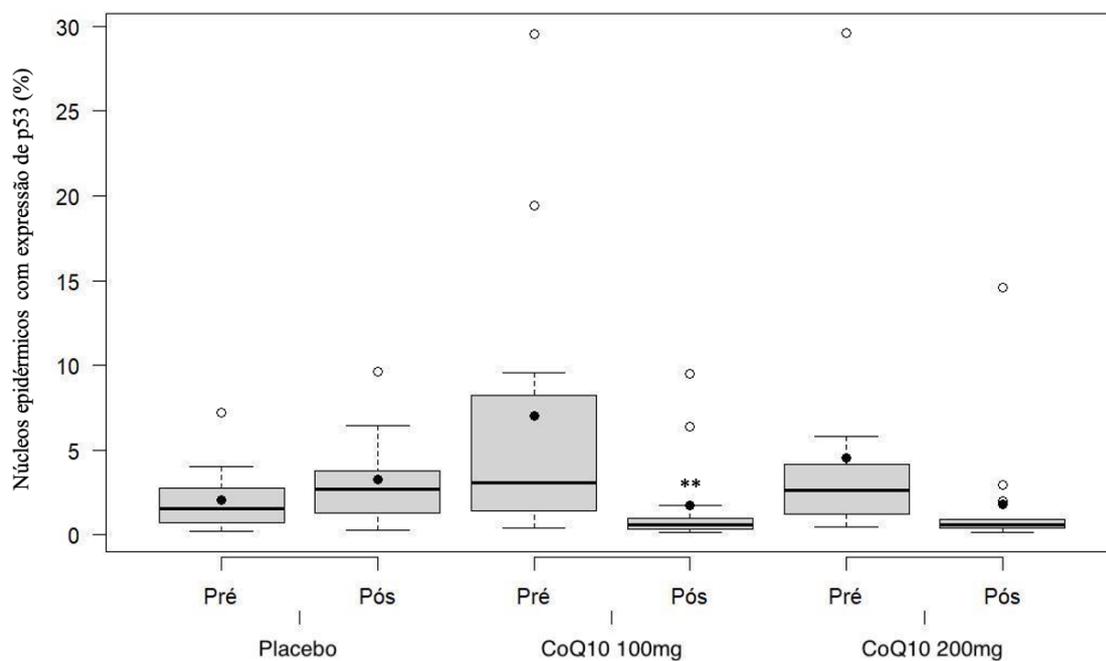
Legenda:  $*p < 0,05$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

## 5.3.4.2. p53

Ao avaliar o percentual de núcleos epidérmicos com expressão da proteína p53, observou-se diminuição significativa de 75% ( $p=0,0057$ ) para o grupo CoQ10 100mg, quando comparados os tempos pré e pós suplementação. O grupo placebo e o grupo CoQ10 200mg não se alteraram (Figura 23 e Tabela 23).

Figura 23 - *Boxplot* evidenciando o percentual de núcleos epidérmicos com expressão da proteína p53, pela imuno-histoquímica, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com  $**p<0,01$ .

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 23 - Diferença entre médias dos percentuais de núcleos epidérmicos com expressão da proteína p53, pela imuno-histoquímica, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

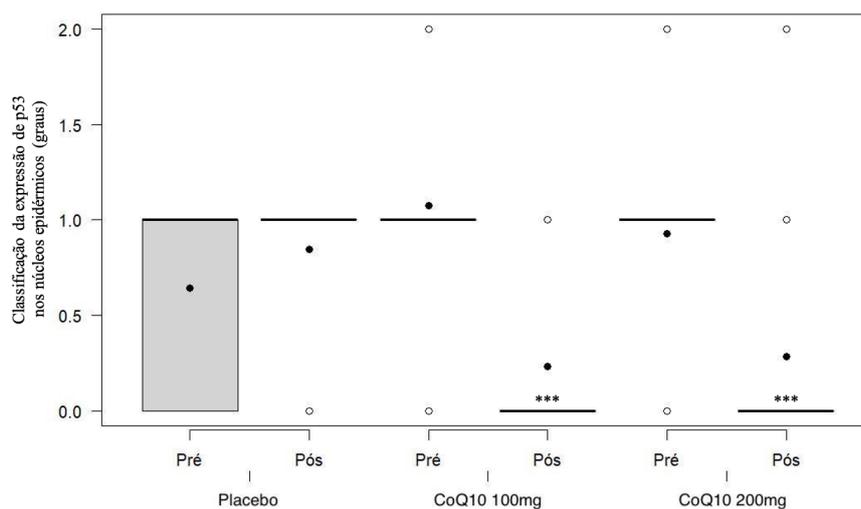
Suplemento	Comparação entre Tempos	Diferença	IC(95%)	EP	GL	Valor t	p-valor
Placebo	PÓS - PRÉ	1,194	-2,395 4,783	1,771	37	0,67	0,5045
100MG	PÓS - PRÉ	-5,275	-8,916 -1,635	1,797	37	-2,94	0,0057 **
200MG	PÓS - PRÉ	-2,738	-6,247 0,770	1,732	37	-1,58	0,1223

Legenda: \*\*p<0,01.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Ao proceder a análise de expressão da proteína p53 através do percentual de núcleos marcados, classificados em 4 graus, de 0 a 3, foram detectadas entre os tempos pré e pós suplementação para os grupos CoQ10 100mg e 200mg diminuição da média de 78,6% (p<0,0001) para CoQ10 100mg e de 69,2% (p<0,0001) para CoQ10 200mg (Figura 24 e Tabela 24).

Figura 24 - *Boxplot* evidenciando a classificação da expressão da proteína p53 nos núcleos epidérmicos, pela imuno-histoquímica, estabelecida em 4 graus, de 0 a 3, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com \*\*\*p<0,001.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 24 - Diferença entre médias da classificação da expressão da proteína p53 nos núcleos epidérmicos, pela imuno-histoquímica, estabelecida em 4 graus, de 0 a 3, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

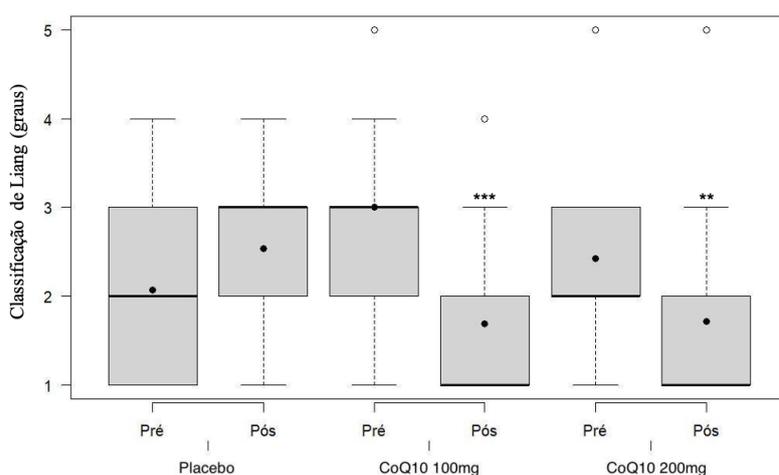
Suplemento	Comparação entre Tempos		Diferença	IC(95%)		EP	GL	Valor t	p-valor
Placebo	PÓS	PRÉ	0,213	-0,092	0,519	0,151	37	1,42	0,1651
100MG	PÓS	PRÉ	-0,846	-1,155	-0,537	0,152	37	-5,55	<0,0001 ***
200MG	PÓS	PRÉ	-0,643	-0,940	-0,345	0,147	37	-4,38	<0,0001 ***

Legenda: \*\*\*p<0,001.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Analisando a expressão da proteína p53 através da soma das classificações de percentual de núcleos marcados e da intensidade da marcação pela classificação de Liang (Liang et al., 1999), houve evidência significativa de diminuição média em 43,6% (p<0,0001) no grupo CoQ10 100mg e 29,4% (p<0,0089) no grupo CoQ10 200mg, na comparação pré e pós suplementação (Figura 25 e Tabela 25).

Figura 25 - *Boxplot* evidenciando a classificação de Liang para expressão da proteína p53 nos núcleos epidérmicos, pela imuno-histoquímica, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



Legenda: os asteriscos representam diferença significativa entre valores pré e pós suplementação, com \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Tabela 25 - Diferença entre médias da classificação de Liang para expressão da proteína p53 nos núcleos epidérmicos, pela imuno-histoquímica, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

Suplemento	Comparação entre Tempos		Diferença	IC(95%)			EP	GL	Valor t	p-valor
	PÓS	PRÉ								
Placebo	PÓS	PRÉ	0,464	-0,076	1,004	0,266	37	1,74	0,0898	
100MG	PÓS	PRÉ	-1,308	-1,852	-0,764	0,268	37	-4,87	<0,0001	***
200MG	PÓS	PRÉ	-0,714	-1,238	-0,190	0,259	37	-2,76	0,0089	**

Legenda: \*\* p<0,01 e \*\*\*p<0,001.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

## 5.4 PARÂMETROS LABORATORIAIS

### 5.4.1 Exames bioquímicos

As análises séricas de função renal, hepática e hematológica não demonstraram alterações significativas quando comparados os períodos pré e pós suplementação nos grupos. Os parâmetros de glicemia, insulina, hemoglobina glicada, proteínas totais e frações, colesterol total e frações, apolipoproteína A1, apolipoproteína B e lipoproteína A também permaneceram inalterados nos grupos.

### 5.4.2 Dosagem de citocinas séricas por Cytometric Bead Array (CBA)

As citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 $\beta$  não foram detectáveis no soro das voluntárias, tanto antes quanto após suplementação de CoQ10. Por outro lado, as citocinas IL-6 e IL-10 apresentaram níveis cutâneos detectáveis, mas sem diferenças.

### **5.4.3 Dosagem de coenzima Q10 sérica (ELISA)**

Não houve diferença significativa entre as dosagens séricas de CoQ10 nos grupos avaliados e tempos pré e pós suplementação (Apêndices Y e Z).

### **5.4.4 Expressão dos genes por PCR em tempo real (q-RT-PCR) para metaloproteinases, proto-oncogenes e fatores antioxidantes na pele**

A análise por Q-RT-PCR da expressão de RNAm de MMP-9, na pele das voluntárias, não mostrou diferença estatística. A expressão das demais metaloproteinases avaliadas, MMP-1 e MMP-3, foi indetectável na pele das idosas tanto antes quanto após a suplementação (Apêndices AA).

As frações C-JUN e FOS do AP-1, assim como TGF-beta e TGF BR II, importantes fatores atuantes nas vias moleculares do processo de envelhecimento, foram detectáveis em todas as participantes da pesquisa, antes e após a suplementação, mas não mostraram diferenças (Apêndice AA).

Os fatores antioxidantes avaliados, SOD, catalase e peroxirredoxina 6, comparados no período pré e pós suplementação para cada grupo, também não evidenciaram diferenças significativas (Apêndice AA).

## **5.5 CORRELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS**

Todas as variáveis quantitativas foram relacionadas através do coeficiente de correlação de Spearman e representadas através do mapa térmico de cor no período pré suplementação (Apêndices AA) e no período pós suplementação (Apêndices AB, AC, AD e AE). As correlações positivas foram marcadas em azul e as negativas em vermelho, assumindo variações de tonalidades de cores de acordo com a intensidade da correlação.

Foram adotados limites de intensidade das correlações de acordo com os seguintes intervalos dos coeficientes  $\rho$  de Spearman: entre 0 e  $\pm 0,3$  são biologicamente desprezíveis, entre 0,31 e 0,5 (ou -0,31 e -0,5) são fracas, entre 0,51 e 0,7 (ou -0,51 e -0,7) são moderadas, entre 0,71 e 0,9 (ou -0,71 e 0,9) são correlações fortes e maiores que 0,9 (ou menores que -0,9) são consideradas muito fortes (Mukaka, 2012). Entre as 39 variáveis representadas, não foram evidenciadas correlações fortes entre variáveis não correlacionadas.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 PARÂMETROS CLÍNICOS

#### 6.1.1 Observações de eventos adversos, sinais e sintomas clínicos

O efeito descrito por participantes do grupo CoQ10 200mg de melhora da vitalidade, performance física e qualidade de vida em idosos já foi descrito, entretanto a suplementação avaliada foi administrada diariamente durante 48 meses e continha a combinação de 200 µg de selênio orgânico com 200mg de CoQ10 (Johansson et al., 2015). Tal efeito poderia ser explicado pelo papel essencial da CoQ10 na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Ao transportar elétrons do complexo I e II até o complexo III, a CoQ10 induz aumento da produção de ATP e, conseqüentemente, de energia celular (Singer, 2014). Correlações entre CoQ10 e Índice de Massa Corpórea (IMC), relatadas no grupo CoQ10 100mg, também já foram descritas em outros estudos (Del Pozo-Cruz et al., 2014; Fischer et al., 2016).

Até o presente momento, não foram detalhados na literatura efeitos da CoQ10 nos anexos cutâneos. Assim, ante o fato de algumas participantes terem percebido queda de cabelo, é importante incluir, em futuros estudos, avaliações clínicas de cabelos e unhas pré e pós suplementação oral de CoQ10 para esclarecer melhor este possível efeito adverso.

Como as idosas que sofreram queda da própria altura estavam no grupo placebo, a CoQ10 poderia ter atuado como fator protetor para quedas nos grupos CoQ10 100mg e CoQ10 200mg. A CoQ10 confere proteção antioxidante associada à performance dos músculos esqueléticos durante o processo de envelhecimento, evidenciada pelo fato da elevada taxa  $\text{CoQ10H}_2 / \text{CoQ10}$  acompanhar o aumento de força muscular, enquanto a baixa correlação  $\text{CoQ10H}_2 / \text{CoQ10}$  pode ser considerada preditor de sarcopenia em humanos (Fischer et al., 2016; Hernández-Camacho et al., 2018). Assim, o possível efeito de prevenção de quedas da suplementação oral de CoQ10 poderia ser mais bem avaliado em outros estudos

### 6.1.2 Autopercepção da melhora estética global

A autopercepção de melhora estética foi observada tanto no grupo placebo quanto nos grupos tratados, com expressivos 42,8% das pacientes que tomaram amido durante 12 semanas relatando autopercepção de melhora, indicando forte influência do processo psicobiológico conhecido como efeito placebo neste tipo de análise (Blease, 2019). As últimas evidências relacionadas ao assunto demonstram que o efeito placebo é particularmente poderoso para sinais e sintomas autoavaliados (Bernstein et al., 2020).

Recentemente, o impacto do efeito placebo foi definido a partir das expectativas geradas de forma verbal e não-verbal, conscientes e inconscientes, produzidas a partir do que é explicado sobre o tratamento, principalmente quando existe um raciocínio lógico e convincente envolvido com informações de valência positiva (Bernstein et al., 2020). Assim, é de fundamental importância que estudos relacionados ao envelhecimento tenham sempre um grupo placebo comparativo e que, além de questionários acerca da autopercepção de resposta, sejam também realizadas medidas clínicas e moleculares objetivas e comparáveis, para atestar resposta.

Além disso, os fatores sociais e ambientais no contexto da interação entre o profissional de saúde e o participante de pesquisa também são determinantes (Leibowitz et al., 2019), além da característica da substância utilizada no tratamento, como sabor, tamanho e cor (Berna et al., 2017). O fato deste estudo fazer parte de uma tese de doutorado e de ter sido realizado em duas grandes universidades com respaldo científico pode ter significativamente influenciado a autopercepção de melhora das participantes da pesquisa.

Avaliações realizadas pelos próprios participantes de pesquisas, em diferentes estudos, podem variar também com as estações do ano, mostrando mais otimismo no verão que no inverno (Rehn; Schuster, 2017). O fato de as participantes terem iniciado o estudo na primavera e finalizado no verão pode explicar as melhores notas de autopercepção estética ao final do estudo.

Algumas participantes do grupo placebo descreveram detalhadamente melhora da queda de cabelos após a suplementação. Tal fato pode ser compatível com o efeito da sazonalidade da queda de cabelos, cuja maior ocorrência é observada naturalmente no pico no outono (Kunz; Seifert; Trüeb, 2009). Assim, as participantes podem ter observado a ausência de queda de cabelos durante todo o período do estudo, executado na primavera e verão, influenciando, portanto, as respostas de autopercepção estética.

### **6.1.3 Imagens faciais por estereofotogrametria**

#### **6.1.3.1 Vasos sanguíneos**

Quando considerada a área facial ocupada por eritema, houve resposta significativa nos grupos CoQ10 100mg e CoQ10 200mg. Entretanto, quando a análise incluiu, além da área de eritema, a intensidade captada, houve resposta significativa apenas no grupo CoQ10 200mg com redução de 58,9% comparada ao período pré suplementação.

Alterações da estrutura vascular, inflamação e vasodilatação são clinicamente manifestados como eritema, uma vez que ocorre aumento anormal da hemoglobina na derme papilar (Xu et al., 2016). O eritema, por sua vez, está fortemente associado ao envelhecimento da pele do rosto e do couro cabeludo, surgindo por volta dos 20 anos de idade e intensificando-se a partir de 40 anos (Kim et al., 2017). Além disso, eritema e telangiectasia são relevantes manifestações de fotoenvelhecimento (El Kahky; Diab; Ali, 2018).

O efeito antiinflamatório e antioxidante demonstrado pela CoQ10 (Lee et al., 2013) pode estar associado à resposta clínica de melhora do eritema facial. Outros estudos com substâncias antiinflamatórias e antioxidantes de uso tópico, como a niacinamida (Bissett et al, 2004) e ativos botânicos (Draelos; Donald, 2018), também evidenciaram redução do eritema em 3 meses de tratamento. A resposta ao tratamento do eritema facial já instalado é distinta da sua prevenção. Em outro

estudo, a CoQ10 nas doses diárias de 50 e 150 mg via oral não foi capaz de prevenir o eritema induzido pela radiação UVB (Žmitek et al., 2017).

Atualmente, os únicos medicamentos aprovados para uso tópico no tratamento do eritema facial persistente associado a rosácea são oximetazolina e brimonidina, que atuam através da ativação pós-sináptica de receptores alfa-adrenérgicos. Esses medicamentos podem induzir rebote do quadro de eritema, além de efeitos adversos cardiovasculares e oftalmológicos (Okwundu; Cline; Feldman, 2021). Considerando que a maioria dos pacientes com eritema facial possui pele sensível devido às alterações da barreira cutânea (Draelos; Donald, 2018), o estudo da CoQ10 em pacientes com rosácea poderia revelar uma opção oral segura de tratamento.

O tratamento do fotoenvelhecimento cutâneo, por sua vez, pode ser dividido em duas etapas. A primeira inclui melhora do eritema e ectasias vasculares, pigmentação, alterações pilosas e sebáceas. A segunda está relacionada à melhora do processo de envelhecimento dérmico e subcutâneo (Ganceviciene et al., 2012). Assim, com a melhora da pigmentação e do eritema expostos anteriormente, nosso estudo demonstrou importante papel da CoQ10 na primeira etapa do tratamento do fotoenvelhecimento, principalmente com a dose oral diária de 200mg. Nos tópicos subsequentes, destacaremos características relevantes de melhora também relacionadas à segunda etapa.

#### 6.1.3.2 Hiperpigmentações cutâneas

A área e a intensidade das manchas foram reduzidas em todos os grupos avaliados, porém a redução foi mais intensa no grupo CoQ10 200mg, que reduziu em 31,7% a área de pele ocupada por hiperpigmentações na face e 49,1% quando considerada também a intensidade da coloração acastanhada. Nas avaliações clínicas realizadas ao longo das consultas, tais hiperpigmentações correspondiam a lentigos solares.

A redução, apesar de menos pronunciada, da área e intensidade das manchas no grupo placebo semelhante ao grupo CoQ10 100mg pode estar relacionada à sazonalidade, uma vez que o estudo foi concluído no início do verão, em 2020. Esse momento estava distante do final do último verão, em 2019, que é o período de maior exposição solar, quando intensidade e área das hiperpigmentações costumam aumentar (Hexsel et al., 2013).

O efeito clareador da CoQ10 já foi demonstrado *in vivo* e *in vitro*, através da via de sinalização do  $\alpha$ -MSH e da indução de genes antioxidantes pela via NRF2, em queratinócitos expostos à radiação UVA (Hseu et al., 2019). Em nosso estudo, demonstramos ativação da via NRF2 na superfície da pele, principalmente no grupo CoQ10 200mg. Outro mecanismo de redução de melanina foi demonstrado pela CoQ10 em cultura de células B16, através da inibição da tirosinase (Zhang et al., 2012).

Além disso, alguns ativos clareadores de amplo uso em cremes para tratamento de hiperpigmentações cutâneas, como o ácido kójico, possuem como principal mecanismo de ação a inibição da via NF $\kappa$ B nos queratinócitos (Searle; Al-Niaimi; Ali, 2020). Já foi demonstrado que a CoQ10 é capaz de modular NF $\kappa$ B e I $\kappa$ B (Pala et al., 2016). Futuro estudo poderia avaliar a correlação entre o clareamento das manchas e a inibição de NF $\kappa$ B na epiderme.

Apesar de estudos pré-clínicos mostrarem a capacidade da CoQ10 em reduzir danos induzidos pela radiação UV (Kim et al., 2007), o efeito de clareamento da pele parece não estar relacionado à proteção contra a radiação UV, pois o estudo que avaliou o efeito da suplementação diária com CoQ10 50 mg e 150mg não demonstrou modificações nas medidas da dose eritematosa mínima (Žmitek et al., 2017) e o uso tópico também não foi capaz de demonstrar fotoproteção (Tournas et al., 2006).

#### 6.1.4 Viscoelasticidade da pele

Houve impacto significativo ( $p=0,0195$ ) na medida R6 da viscoelasticidade, que representa a fluidez da pele e que aumenta no envelhecimento (Choi et al., 2013). Este parâmetro diminuiu 72% quando comparados os períodos pré e pós suplementação com a dose de 100mg de CoQ10. Quanto menor o valor de R6, melhor a elasticidade cutânea (Brancalion et al., 2016). Quanto maior o R6, mais fluido é o material. Assim, os idosos costumam apresentar valores elevados deste parâmetro devido à fragilidade das fibras colágenas, que se alongam facilmente, deixando a pele com uma textura gelatinosa (Choi et al., 2013).

O grupo CoQ10 200mg mostrou leve tendência a queda de R6, mas não significativa ( $p=0,8661$ ), enquanto o grupo placebo manteve o valor inicial, apresentando diferença de apenas 0,015% entre os valores pós e pré suplementação. O aumento da população do estudo poderia evidenciar alguma resposta significativa da CoQ10 200mg.

Em estudo anterior, a suplementação oral de CoQ10 nas doses de 50mg e 150mg/dia durante 12 semanas evitou a queda da viscoelasticidade naturalmente esperada no inverno, em comparação ao placebo (Žmitek et al., 2017). No grupo placebo, comparado aos dois tratamentos, houve queda de 24,5% na única medida de elasticidade apresentada no estudo esloveno, concluído no inverno de 2015, obtida na região malar direita das participantes. O referido parâmetro utilizado mede a elevação da pele induzida pela pressão do ar em Megapascal (MPa). Vale ressaltar que a Eslovênia é um país de pequenas dimensões geográficas cujas regiões de maior altitude, como Kredarica, atingem média de temperatura de 7 graus Celsius negativos nos meses de inverno (Ogrin et al., 2011). O estudo esloveno concluiu, portanto, que a CoQ10 tanto na dose de 50 quanto de 150mg/dia foi útil em evitar a redução sazonal da viscoelasticidade cutânea (Žmitek et al., 2017).

Outro ponto importante que pode colaborar com resultados distintos de medidas de ensaios clínicos prévios, além de aparelhos diversos, é o local onde a medida de elasticidade foi aferida. Os valores encontrados para as variáveis de

viscoelasticidade e suas correlações com o envelhecimento são diferentes quando comparadas medidas em diferentes sítios anatômicos do corpo, como face, braço e dorso (Ryu et al., 2008). Em nosso estudo, a região analisada foi a face fotoexposta do antebraço, onde também foram colhidos os fragmentos de pele por biópsia para as análises histológicas. No estudo citado anteriormente, a medida foi feita na face.

Na face, o envelhecimento tem correlação positiva com R1, R4 e R6 e negativa com R2, R5, R7 e R8. Já no braço, o envelhecimento tem correlação positiva com R1, R3, R4, R6 e R9 e negativa com R2, R5 e R7 (Ryu et al., 2008). As medidas de R0, R2 e R7 não demonstraram alterações significativas, apesar de, em outros estudos, a medida R7 ter sido apontada como a mais relacionada ao envelhecimento (Ryu et al., 2008).

Em relação à variável R5, que indica a elasticidade líquida, houve redução significativa de 42% no grupo CoQ10 100mg ( $p=0.0185$ ), enquanto placebo e CoQ10 200mg permaneceram inalterados. A espessura da pele sugada pela sonda durante a análise de viscoelasticidade, particularmente nas áreas fotoexpostas, em decorrência do envelhecimento extrínseco, pode influenciar a redução do parâmetro R5 (Takema et al, 1994, Ryu et al., 2008).

Houve aumento significativo de R9, que representa a histerese, nos grupos tratados, correspondendo a 17% para CoQ10 100mg ( $p=0.0248$ ) e 34,3% para CoQ10 200mg ( $p=0.0004$ ), permanecendo estável no grupo placebo. Esta medida está relacionada às deformidades residuais ao final do ciclo de relaxamento após sucção pelo aparelho, além de mostrar correlação positiva com a hidratação cutânea (Choi et al., 2013). Como a CoQ10 possui papel importante na integridade da barreira cutânea (Marcheggiani et al., 2019), os grupos tratados podem apresentar melhor histerese. Alguns cremes contendo lipídeos do estrato córneo, por exemplo, são capazes de melhorar a hidratação da pele e, conseqüentemente, trazer benefícios para as análises da elasticidade (Yilmaz; Borchert, 2006).

Quanto maior a densidade de ligações entre as fibrilas de colágeno, mais rígido é o tecido (Avery; Bailey, 2008). Assim, um tempo maior de suplementação

com CoQ10 poderia gerar mais conexões entre as fibras construídas e, conseqüentemente, melhorar a viscoelasticidade da pele.

### **6.1.5 Hidratação da pele**

A melhora da hidratação da pele ocorreu de forma semelhante em todos os grupos e pode ser justificada pelo fato de as participantes terem iniciado o estudo na primavera e terminado no verão. Na região sudeste do Brasil, as quatro estações apresentam uniformidade de distribuição de chuvas, mas considerável diferença na umidade relativa do ar (Rao; Cavalcanti IFA, Hada, 1996). Durante o verão na cidade de São Paulo, são encontradas as melhores médias de umidade relativa do ar, em oposição a taxas inferiores a 20% encontradas no inverno (Masiero; Souza, 2018). Novamente, a inclusão de um grupo placebo mostra fundamental importância em estudos com análise de respostas clínicas cutâneas a intervenções orais ou tópicas.

Outro fator plausível é a influência do efeito Hawthorne em ensaios clínicos, quando os participantes mudam de comportamento pelo fato de estarem sob análise (Sedgwick; Greenwood, 2015). Um maior cuidado global com a saúde durante o estudo pode ter estimulado a maior ingestão diária de água por parte das participantes, explicando a melhora nos três grupos.

O fato da suplementação oral de CoQ10 100mg ou 200mg não ter mostrado diferença quando comparada ao placebo está de acordo com ensaio clínico prévio, placebo controlado, realizado com doses de 50mg e 150mg de CoQ10 (Žmitek et al., 2017). Para medidas de hidratação da pele o sítio anatômico de aferição não impacta no resultado, assim o antebraço é considerado representativo de regiões da face (Bazin; Fanchon, 2006).

### **6.1.6 Perda de água transepidérmica ou *Transepidermal Water Loss* (TEWL)**

Houve tendência a redução nos valores de TEWL nos grupos suplementados com CoQ10. O grupo CoQ10 100mg mostrou redução de 11,5 % ( $p=0,0935$ ), enquanto o CoQ10 200mg, 4,7 % ( $p=0,5106$ ), porém não significativa. O grupo placebo mostrou aumento de 8,7%, também não significativa ( $p=0,2456$ ).

Estudo recente, com 17 participantes no grupo placebo e 17 usando suplementação oral diária combinada de 50mg CoQ10 com 4000mg de colágeno hidrolisado de peixe, 80mg de vitamina C, 920 µg de vitamina A e 150µg de biotina, também não mostrou diferença na TEWL (Žmitek et al., 2020). Um estudo com população maior poderia ser útil para evidenciar a tendência observada em nossos resultados.

### **6.1.7 Exame ultrassonográfico da pele**

Em relação a medidas de espessura total da pele e densidade dérmica aferidas na região extensora do antebraço das participantes pelo ultrassom de alta frequência, não houve alterações significativas em nenhum dos grupos. Este dado corrobora com outro ensaio clínico com CoQ10 nas doses diárias de 50mg ou 150mg por 12 semanas, onde a densidade e a espessura dérmicas, medidas na região zigomática facial, não mostraram diferença em relação ao placebo (Žmitek et al., 2017).

Por outro lado, quando combinada com colágeno oral, vitamina C, vitamina A e biotina, a CoQ10 na dose diária de 50mg por 12 semanas, foi capaz de aumentar a densidade dérmica da região zigomática facial, mas não influenciou a espessura da derme (Žmitek et al., 2020).

Apesar do ultrassom de alta frequência ser amplamente utilizado para medir eficácia de produtos para tratar envelhecimento cutâneo, existem inúmeras variações de resultados de acordo com o sítio anatômico e até mesmo com a idade (Vergilio et al., 2021). Para medidas realizadas no antebraço, existem diferenças

biofísicas significativas encontradas quando avaliada a superfície extensora e flexora, sendo maior a ecogenicidade na região flexora (Carvalho et al., 2017). Os parâmetros de espessura dérmica também variam com a idade e com o sítio anatômico avaliado (Crisan et al., 2012). Isto pode explicar diferenças encontradas entre os ensaios clínicos. Um tempo maior de suplementação oral poderia ser útil em demonstrar mais resultados.

## 6.2 PARÂMETROS HISTOLÓGICOS

### 6.2.1 Hematoxilina-eosina (HE)

#### 6.2.1.1 Área de epiderme celular e razão entre área total de epiderme celular e extensão total da superfície epidérmica

A área de epiderme celular, após a suplementação, aumentou significativamente no grupo CoQ10 100mg e apresentou aumento duas vezes maior no grupo CoQ10 200mg. Quando ajustada de acordo com a extensão total da superfície epidérmica, a observação de aumento nos grupos suplementados foi significativamente mantida, enquanto o valor para o placebo diminuiu em 8,7%.

Este resultado mostra ajuste de alterações epidérmicas próprias do envelhecimento, uma vez que a espessura da epiderme tende a diminuir, após os 60 anos de idade, nas regiões de pele fotoexposta como antebraço e região zigomática (Crisan et al., 2012). Isto ocorre devido à redução da quantidade de células tronco epidérmicas, que diminuem a capacidade de regeneração da pele durante o envelhecimento (Niamtu, 2019). A CoQ10, na forma reduzida de ubiquinol, possui ação antiapoptótica epidérmica ao regular o mecanismo de morte celular programada induzido no ambiente extracelular através da liberação de ceramidas pela esfingomiéline (Marcheggiani et al., 2019).

O aumento da área de epiderme é relevante porque a pele é a primeira barreira de defesa do organismo contra agressões externas, incluindo radiação UV, microrganismos, substâncias contaminantes e traumas. Este papel de proteção é

desempenhado principalmente pela epiderme e sua função de barreira cutânea (Yang et al., 2020). Quando ocorrem alterações na barreira, frequentes no envelhecimento, há predisposição a inúmeras afecções dermatológicas (Chambers; Vukmanovic-Stejic, 2020), além de uma maior susceptibilidade a um aumento na absorção de substâncias tóxicas do ambiente e perda de água (Edamitsu et al., 2022), reduzindo a hidratação e aumentando a formação de rugas (Niamtu, 2019).

A matriz lipídica da epiderme é constituída principalmente por colesterol, ácidos graxos livres e ceramidas. Considerando que a biossíntese de CoQ10 e de colesterol compartilham a via comum endógena do mevalonato (Pravst et al, 2020; Gutierrez-Mariscal et al., 2021), o mecanismo de ação da CoQ10 na epiderme pode estar relacionado ao colesterol presente nesta camada e poderia ser mais bem esclarecido em futuros estudos.

Já foi previamente descrito que a administração oral de CoQ10 é capaz de elevar os níveis epidérmicos desta coenzima e possui ação de produção de energia celular além de antioxidante na pele (Ashida, 2009). Além disso, um dos principais mecanismos de ação sugerido para ação antienvhecimento cutâneo da CoQ10 está relacionado à proteção dos queratinócitos contra radiação UV (Inui, 2008), apesar de dose de 50mg e 150mg por dia não terem demonstrado alterações significativas na dose eritematosa mínima, que reflete apenas proteção anti-UVB (Žmitek et al., 2017)

Em ensaios clínicos, os efeitos da CoQ10 nas células epidérmicas são pouco descritos, pois a maioria dos estudos não realizam biopsias cutâneas (Žmitek et al., 2017; Žmitek et al., 2020). Assim, estudos complementares futuros analisando expressões de importantes estruturas epidérmicas como involucrina, loricrina e filagrina poderiam ser realizados para melhor esclarecer o papel da CoQ10 na barreira cutânea de idosos.

### 6.2.1.2 Extensão da junção dermo-epidérmica (JDE) e razão entre JDE e superfície da epiderme

A medida do comprimento da JDE isoladamente ou corrigida pela razão com a superfície epidérmica do fragmento de pele representado na histologia não demonstrou alteração significativa após suplementação em nenhum dos grupos.

No envelhecimento cutâneo, a redução de colágeno VII evidenciada nas rugas parece estar relacionada à JDE aplanada, que altera a conexão entre a derme e a epiderme (El-Domyati, 2014). Como estudos com suplementação oral de CoQ10 já demonstraram melhora das rugas faciais, com doses de 50mg e 150mg diários (Žmitek et al., 2017), esta análise histológica foi realizada no intuito de revelar este possível mecanismo de ação. Como tal efeito não foi demonstrado, podemos levantar a hipótese de que a melhora das rugas possa acontecer pela recuperação da barreira cutânea epidérmica, demonstrada no nosso estudo.

## 6.2.2 Picrosirius vermelho

### 6.2.2.1 Picrosirius vermelho sem polarização

A primeira avaliação histológica de colágeno pré e pós suplementação foi realizada pela coloração de picrosirius vermelho (PSV), com quantificação da área marcada, que não evidenciou resposta significativa na derme superficial e profunda. Entretanto, durante estas análises, foram observadas imagens microscópicas que sistematicamente apresentavam finos prolongamentos das fibras de colágeno. Considerando que na pele as fibrilas de colágeno são dispostas de forma dispersa, com o objetivo de conferir resistência a deformações em diversas direções (Flynn, 2014), diferente das fibrilas dos tendões, que são perfeitamente alinhadas em um único eixo (Chavaunne; Hazel, 2016), consideramos que poderiam representar o início da produção de colágeno novo. Porém, por representarem uma área extremamente pequena comparada com a área total de fibras colágenas, os resultados não foram representativos.

Historicamente, as colorações para colágeno possuem como principal desvantagem a baixa detecção de fibras finas (Rich; Whittaker, 2005). Uma comprovação disto é a falta de precisão em detectar fibras muito finas de colágeno demonstradas na microscopia eletrônica (Liu et. al, 2021b). Desta forma, a quantificação de colágeno é subestimada. Em busca de um método capaz de quantificar melhor estas fibras, surgiu o PSV (Sweat et al., 1964), um método que foi progressivamente aprimorado e difundido por pesquisadores brasileiros, que utilizaram a polarização da luz para melhorar os resultados (Junqueira; Bignolas; Brentani, 1979; Vidal; Mello; Pimentel, 1982). Apesar de toda especificidade conferida pela combinação de PSV e luz polarizada, o método ainda hoje não é amplamente explorado, pois muitos estudos usam a microscopia de campo claro, em vez da polarização circular, para detectar colágeno corado por PSV quantificado por programas de computador, subestimando a contagem de fibras mais finas (Rich; Whittaker, 2005).

Colorações amplamente utilizadas para detecção de colágeno, como o tricrômio de Mason e o pentacromo de Movat, possuem especificidade limitada e maior probabilidade de desaparecer ao longo do tempo, quando comparadas ao PSV (Greiner et al., 2021). Além disso, a coloração verde da fibra colágena marcada com PSV polarizado torna-se vermelha quando progride de fibra fina para espessa (Rich; Whittaker, 2005). O PSV é, portanto, um dos melhores e mais específicos métodos histoquímicos para detectar estas fibras, quando combinado com a microscopia de luz polarizada (Liu et al., 2021b).

Esta baixa capacidade de detecção de fibras finas, mesmo através de análises histológicas, pode explicar por que ensaios clínicos prévios com objetivo de avaliar rejuvenescimento da pele através da suplementação oral de colágeno não demonstraram melhora da espessura ou densidade dérmica, quando avaliadas exclusivamente por USG após 12 semanas de suplementação (Žmitek et al., 2017; Žmitek et al., 2020).

### 6.2.2.2 Picrosirius vermelho com polarização

Tornou-se de extrema importância para nosso estudo a melhor caracterização das fibras de colágeno com a técnica de polarização circular da luz na coloração de picrosirius vermelho, no intuito de identificar se novas fibras haviam sido formadas em algum dos grupos. Ao proceder este refinamento da análise, houve resultado significativo de 40,6% de aumento do colágeno novo, na derme profunda, no grupo CoQ10 100mg. Neste mesmo grupo, foi evidenciada redução também significativa de 58,8% do colágeno antigo na derme profunda. Estes resultados sugerem, portanto, a recuperação do processo de biossíntese de colágeno, caracteristicamente reduzido no envelhecimento (Quan; Fisher, 2015).

Apesar do grupo CoQ10 200mg apresentar aumento de colágeno novo na derme profunda correspondente a um valor 72% maior que a tendência de aumento observada no grupo placebo (Tabela 24), não houve diferença significativa. O aumento do número de participantes poderia evidenciar melhor este dado.

Na derme superficial, apesar da tendência observada de redução de colágeno novo no grupo placebo e aumento nos grupos suplementados com CoQ10, não houve significância (Apêndice AF e AG). Como as fibras de colágeno I na derme papilar já são finas e convolutas fisiologicamente, enquanto na derme reticular são espessas e organizadas (Kröger et al., 2021), o surgimento destas fibras finas pode ter sido mais bem diferenciado na marcação da derme profunda.

Além disso, a distância entre as fibras de colágeno I é maior na derme reticular enquanto a densidade destas fibras é menor, quando comparadas com a derme papilar (Kröger et al., 2021), podendo facilitar a representatividade numérica na quantificação destes valores na camada mais profunda da derme. Assim, análises qualitativas da estrutura de colágeno na derme reticular e papilar poderiam ser incluídas para detalhar melhor estas possíveis alterações.

Quando analisados resultados de tratamentos consagrados para envelhecimento cutâneo, como a luz intensa pulsada, a melhora vascular e pigmentar é praticamente imediata, como observamos neste estudo, enquanto a resposta de estímulo à produção de colágeno é tardia, com resultados perceptíveis

entre 3 e 12 meses após o tratamento (Ganceviciene et al., 2012). Assim, o tempo de suplementação pode ter sido suficiente para demonstrar apenas o início da indução do processo de formação de colágeno, mas insuficiente para evidenciar fibras novas completamente constituídas. Portanto, mais tempo de suplementação poderia demonstrar maiores benefícios.

O tempo exato para construção de novas fibras de colágeno na pele ainda não está bem definido (Revell et al., 2021). A formação de feixes de fibrilas colágenas acontece inicialmente no espaço intracelular, através da produção de monômeros, numa velocidade de  $2 \times 10^5$  por hora (Calverley et al., 2020). Posteriormente há a montagem da tripla hélice, realizada em segundos, e o transporte e distribuição destas estruturas até a membrana plasmática, durante minutos (Revell et al., 2021). A migração celular, por sua vez, favorece a disposição e alinhamento de feixes de fibrilas vizinhas, para que aconteça a fusão de suas extremidades, num processo de aumento do comprimento destas estruturas (Graham et al., 2000), cuja duração ainda não está bem definida, podendo levar dias ou meses (Revell et al., 2021).

Sequencialmente, a estrutura do procolágeno tem seus domínios globulares terminais, conhecidos como N- e C-propeptídeos, removidos de forma enzimática para formar o colágeno (Bekhouche; Colige, 2015). O colágeno une-se então para construir fibras estriadas, por meio de ligações covalentes estabilizadas através da enzima lisil oxidase (Shoulders; Raines, 2009). Assim, por depender de uma reação de oxidação para manter estas estruturas estáveis, talvez a maior dose de CoQ10 testada, ao predispor a processo mais intenso de antioxidação, não tenha induzido formação de colágeno tão significativa quanto a menor dose utilizada em nosso estudo.

Ainda considerando o processo fisiológico de síntese de colágeno, outra possibilidade é que no grupo tratado com CoQ10 200mg, eventualmente, possam ter sido incluídas mais participantes com deficiência de vitamina C, que é fundamental na etapa de ação da lisil oxidase e na hidroxilação. Apesar da CoQ10, na forma reduzida de ubiquinol, ser capaz de regenerar antioxidantes importantes como tocoferol e vitamina C (Marcheggiani et al., 2019), as participantes podem ter

iniciado o estudo com níveis séricos basais diferentes destes antioxidantes. Neste estudo, por limitações de custos, a dosagem sérica de vitamina C não foi realizada. O baixo nível sérico de vitamina C poderia ser acrescentado como critério de exclusão para próximos estudos.

Esta ação de estímulo de produção de colágeno evidenciada na derme profunda do grupo CoQ10 100mg, já foi anteriormente descrita em estudos pré-clínicos. Em cultura de células, a CoQ10 foi capaz de induzir proliferação de fibroblastos, aumentar a expressão de colágeno tipo IV e reduzir MMP-1 induzida pela radiação UV (Zhang et al., 2012). Neste mesmo sentido, o tratamento de fibroblastos com CoQ10 inibiu o aumento de PGE-2, IL-6 e MMP-1 pós irradiação UV (Fuller et al., 2006).

Em ensaio clínico, por sua vez, a CoQ10 na dose de 180mg por dia, durante 28 dias, foi capaz de reduzir significativamente uma hidroquinona oxidase relacionada ao envelhecimento celular (Morré et al., 2008). Assim, os mecanismos sugeridos para ação antienvhecimento da CoQ10 na pele estão relacionados à proliferação de fibroblastos, aumento dos constituintes da membrana basal e ação antioxidante capaz de proteger o dano celular que induz a pigmentação da pele (Ashida, 2009).

### **6.2.3 Weigert**

Tanto na derme papilar quanto na reticular, houve redução significativa da área ocupada por fibras elásticas no grupo placebo e CoQ10, sendo até mais proeminente na derme reticular. No grupo CoQ10 200mg, esta redução não ocorreu. O afinamento e a fragmentação das fibras elásticas é uma das características do processo de envelhecimento, gerando comprometimento da função destas fibras (Heinz, 2021). Este processo de perda de elasticidade cutânea manifesta-se clinicamente como flacidez (Ganceviciene et al., 2012).

Além da pele, outros tecidos de vital importância presentes no sistema cardiovascular, respiratório e oftalmológico (Robert; Robert; Fülöp, 2008) são

acometidos, tornando este processo de vital importância. O aumento da regulação de lisil oxidase (LOX), por exemplo, induz estresse oxidativo responsável pelo remodelamento de elastina e consequente rigidez vascular nos hipertensos (Martínez-Revelles et al., 2017).

Molecularmente, o envelhecimento da elastina e das fibras elásticas envolve mecanismos de degradação enzimática, dano oxidativo, glicação e peroxidação lipídica, dentre outros (Heinz, 2021). Mesmo um estilo de vida saudável não é capaz de prevenir este processo de envelhecimento intrínseco onde a elastina acumula danos progressivamente, com o passar do tempo (Robert; Robert; Fülöp, 2008). Acredita-se que o envelhecimento da elastina seja, portanto, o fator limitante da expectativa de vida em humanos (Robert; Robert; Fülöp, 2008).

Além disso, considerando que a amostra de pele analisada foi retirada da região fotoexposta do antebraço, é importante ressaltar que o envelhecimento extrínseco promovido pela radiação UV aumenta a degradação enzimática de elastina e de fibrilina-1 (Mora Huertas et al., 2016; Eckersley et al., 2020). No processo de fotoenvelhecimento, os aldeídos da peroxidação lipídica, principalmente o 4-hidroxinonenal (HNE) e a acroleína conectam-se à elastina e contribuem na formação do material elastótico na pele (Tanaka et al., 2001) associado a elastose solar e à presença de rugas profundas (Larroque-Cardoso et al., 2015).

Assim, o mecanismo pelo qual a CoQ10 evitou a redução de fibras elásticas pode estar relacionado tanto a mecanismos de envelhecimento intrínseco quanto extrínseco, pois os resultados foram observados na derme papilar e reticular. Em estudo realizado com cultura de células, o tratamento com CoQ10 foi capaz de induzir a expressão do gene de elastina nos fibroblastos e diminuir a produção de IL-1 $\alpha$  induzida pela radiação UV na linhagem de queratinócitos HaCat (Zhang et al., 2012), mecanismo que poderia explicar o resultado encontrado neste ensaio clínico. Outros estudos clínicos já demonstraram o papel da suplementação oral na melhora de rugas faciais (Žmitek et al., 2017, Žmitek et al., 2020).

## 6.2.4 EXPRESSÃO DE PROTÉINAS POR IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

### 6.2.4.1 Nrf2

O envelhecimento estudado em órgãos como o fígado evidencia distúrbios celulares induzidos pela ativação de ROS e produção de citocinas inflamatórias (Kim; Kisseleva; Brenner, 2015), culminando em alterações de superfície do retículo endoplasmático e do número de mitocôndrias (Liochev, 2013). Em modelo animal de envelhecimento hepático induzido por D-galactose, os polifenóis de chá verde administrados por via oral foram capazes de atenuar o envelhecimento do fígado através da via NRF2, suprimindo o estresse oxidativo e os marcadores inflamatórios. No estudo citado, houve estímulo da superóxido desmutase, catalase e glutathione S-transferase, além de supressão de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, de importantes marcadores do estresse oxidativo como malondialdeído e óxido nítrico e de relevantes marcadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Wang et al., 2022).

De forma análoga, avaliamos a via NRF2 no intuito de buscar a potencial ação antienvelhecimento da CoQ10. Neste sentido, estudos de mecanismos fisiológicos de envelhecimento evidenciaram a reduzida capacidade de acúmulo intranúcleo de NRF2, como um dos sinais de envelhecimento em diferentes tecidos (Suh et al., 2004; Ungvari et al., 2011; Muthusamy et al., 2012), sugerindo a alteração desta via de sinalização como importante característica do complexo processo de envelhecimento celular (Yates et al., 2007).

O NRF2 é, portanto, um fator chave no processo de antioxidação, regulando mais de 90% dos genes envolvidos (Lisk et al., 2013), capaz de prevenir a senescência celular (Sheriman et al., 2022). Regula a adaptação das mitocôndrias no estresse oxidativo, processo conhecido como mitohormese, a síntese de glutathione, o reparo de DNA, a produção de NADPH e a proteostase (Musci; Hamilton; Linden, 2019; Yu; Xiao, 2021).

Ao considerarmos o provável mecanismo de ação da CoQ10 junto à via NRF2, tomamos como referência outras análises que já demonstraram, por exemplo, que exercício físico induz mitohormese através do estímulo da via de

NRF2 (Sheriman et al., 2022). De forma possivelmente complementar, a CoQ10 poderia estimular esta via, uma vez que já foi demonstrado que a suplementação da coenzima Q10 após atividade física aumenta a expressão de NFκB, IκB, NRF2 e HO-1 (Pala et al., 2016).

Entretanto, a ativação de NRF2 é extremamente sensível a variações como duração e intensidade da atividade física realizada. Quanto maior a duração e intensidade, mais intensa a resposta da via NRF2 (Sheriman et al., 2022). Assim, a ativação de NRF2 na pele, através da suplementação oral de CoQ10, também poderia seguir este padrão dose dependente, uma vez que o grupo CoQ10 200mg apresentou, ao final do estudo, valores superiores ao grupo placebo e CoQ10 100mg. Um aumento da população do estudo poderia ser suficiente para demonstrar esta tendência.

Outro fator importante na ativação de NRF2 é que o excesso de ROS ativa a MAPK10, proteína quinase 10 ativada por mitógeno, que por sua vez regula a expressão e translocação intranúcleo do NRF2. Consequentemente, inúmeros genes relacionados a antioxidação são transcritos (Atyah et al., 2022). As enzimas antioxidantes ativadas pela via NRF2 incluem NAD(P)H desidrogenase quinona 1 (NQO1), heme oxigenase-1 (HO-1), peroxirredoxina 1 (Prdx1), superóxido dismutase-1 (SOD-1) e diversas enzimas relacionadas à síntese de glutathione, como glutathione S-transferases (GSTs) e modificador de glutamato-cisteína ligase (GCLM) (Bruns et al., 2015). A ampliação do estudo, por imuno-histoquímica com marcadores para fatores antioxidantes poderia revelar quais genes são ativados na pele, após a suplementação de CoQ10, via NRF2.

Além disso, o NRF2 é capaz de realizar autorregulação, intensificando sua própria expressão no intuito de elaborar uma resposta celular extremamente eficaz ao estresse oxidativo (Bruns et al., 2015). Assim, a suplementação oral ofertada por um período maior poderia evidenciar níveis mais significativos de NRF2 no grupo CoQ10 200mg através desta potencial autorregulação.

A opção de prolongar o tempo de suplementação para idosas parece mais benéfica dermatologicamente que aumentar a dose de CoQ10 além de 200mg por

dia, uma vez que a superexpressão de NRF2 pode induzir descamação e ressecamento da pele (Schäfer et al., 2012). Em casos extremos, onde existe uma mutação capaz de manter NRF2 permanentemente ativo, a análise histológica evidencia espessamento da epiderme, com acantose e hiperqueratose, mostrando clinicamente a pele descamativa e extremamente seca (Schäfer et al., 2012).

Além da dose e tempo de suplementação, a grande miscigenação da população brasileira pode refletir diferentes graus de resposta à ativação de NRF2, uma vez que existem vários polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs, do inglês “single nucleotide polymorphism”) documentados no locus NRF2, situado no cromossomo 2q31.2. A frequência do alelo menor de NRF2 617 C>A, por exemplo, é alta entre asiáticos, reduzindo progressivamente em europeus e africanos (Edamitsu et al., 2022).

A característica cor da pele, considerada na classificação de Fitzpatrick utilizada em nosso estudo como critério de inclusão, para estimar ancestralidade individual, pode ser inadequada para brasileiros (Parra et al., 2003). Isto acontece porque diversas etnias, como ameríndia, caucasiana e africana, contribuíram para a imensa miscigenação da nossa população, desde a colonização do Brasil. Particularmente na cidade de São Paulo, onde o estudo foi realizado, há grande influência de italianos, espanhóis e alemães, além de indígenas e africanos (Oliveira et al., 2011). Assim, apesar do critério de inclusão limitar categorias de Fitzpatrick, a ativação de NRF2 pode ter sofrido variações étnicas.

Um outro desafio encontrado para ativação de NRF2 na faixa etária do nosso estudo é o fato de estímulos não patológicos, que sabidamente aumentam a sinalização nuclear de NRF2, apresentarem resposta reduzida em idosos, devido à diminuída capacidade de realizar importação nuclear de NRF2 no envelhecimento (Done; Gage; Nieto, 2016). Isto acontece, por exemplo, na resposta de NRF2 induzida por exercício aeróbico submáximo, quando comparada entre homens jovens com média de idade de 23 anos e idosos com média de 63 anos de idade. O exercício induz expressão gênica de HMOX1, enzima de fase II, nas células mononucleares do sangue periférico dos jovens, gerando acúmulo de NRF2

intranúcleo, enquanto tal resposta está reduzida nos idosos (Done; Gage; Nieto, 2016).

Esta mesma resposta reduzida de NRF2 é observada em diferentes estruturas ao longo do processo de envelhecimento, como músculo esquelético, músculo cardíaco e fígado, gerando aumento de radicais livres e depleção de glutathione. Por isso, acredita-se que intervenções capazes de ativar NRF2 podem impactar positivamente no controle do envelhecimento e longevidade (Bruns et al., 2015). O aumento de expressão de NRF2 induziu aumento de longevidade em diferentes espécies de animais como ratos, nematódeos e moscas (Bruns et al., 2015).

Neste sentido, estudos com indivíduos centenários especulam que a via de sinalização NRF2 é constitutivamente regulada positivamente em humanos longevos, proporcionando extensão da expectativa de vida. Tal idéia vem do fato da alimentação de muitos centenários ser extremamente rica em fitoquímicos, como flavonóides e polifenóis. A ação antienvelhecimento gerada pela ingestão de fitoquímicos decorre provavelmente da indução de resposta adaptativa ao estresse, conhecida por hormese, envolvendo a ativação da via NRF2 (Davinelli; Willcox; Scapagnini, 2012). De forma análoga, o estudo detalhado da hormese após suplementação oral de CoQ10 poderia contribuir para evidenciar possíveis mecanismos de ação antienvelhecimento.

Apesar da função do NRF2 reduzir progressivamente com o aumento da idade, as células neoplásicas, mesmo no envelhecimento, são capazes de burlar este mecanismo, mantendo elevados níveis de NRF2, para garantir a sobrevivência. Assim, são capazes de assegurar significativa resistência terapêutica e comportamento mais agressivo (Atyah et al., 2022).

Em condições gerais, o NRF2 protege as células do organismo das transformações carcinogênicas através de mecanismos da imunidade celular e da antioxidação (Atyah et al., 2022). Porém, inúmeros estudos já sugeriram os elevados índices neoplásicos de NRF2 como marcadores de mau prognóstico para câncer de pulmão (Romero et al., 2017), esôfago (Shibata et al., 2011), cabeça e

pescoço (Martinez et al., 2015) e fígado (Raghunath et al., 2018). Assim, paradoxalmente, o NRF2 induz proteção nos hepatócitos saudáveis enquanto propicia mais agressividade para células de hepatocarcinoma (Raghunath et al., 2018). Portanto, é necessário ter cautela antes de suplementar com antioxidantes pacientes com diagnóstico de câncer.

Na direção oposta, a supressão da via NRF2 está associada ao aumento do estresse oxidativo e envelhecimento prematuro, como na Síndrome de Hutchinson-Gilford ou progeria (Kubben et al., 2016). Portanto, o equilíbrio entre ativação e supressão da via NRF2 pode definir o tênue limiar entre a longevidade e o pior prognóstico neoplásico.

Assim, no estudo do envelhecimento, talvez seja mais relevante administrar pequenas doses de substâncias capazes de modular sistemas intracelulares específicos de defesa e antioxidação do que suplementar grandes quantidades de antioxidantes para atingir níveis intracelulares significativos capazes de induzir o efeito de combate ao estresse oxidativo (Boo, 2020). Uma vez que, dentre as inúmeras vias celulares de resposta ao estresse oxidativo na pele, a via NRF2 é reconhecida como a mais importante (Boo, 2020), um estudo com maior número de participantes suplementadas com placebo, 100mg e 200mg diários seria relevante para definir a dose mais apropriada para idosas.

Em nosso estudo, considerando as idosas dos grupos placebo e CoQ10 100mg, esta importante via de antioxidação não foi suficientemente ativada nem na superfície nem na camada profunda da pele, apresentando resultados decrescentes após os 3 meses de avaliação. Entretanto com 200mg diários de CoQ10 foi possível observar tendência de aumento da resposta NRF2.

Outro risco de ter esta via não apropriadamente ativada na faixa etária estudada está relacionado ao fato de a redução da resposta intracelular de NRF2 também já ter sido associada à patogênese da Doença de Parkinson, considerada a segunda principal causa de distúrbio neurodegenerativo relacionado ao envelhecimento (Anandhan et al., 2021). O potencial terapêutico do NRF2 nos processos neurodegenerativos (Calkins et al., 2009) e oncológicos (Saw; Kong,

2011) já está bem estabelecido. Neste sentido, a via de NRF2 é estimulada por intervenções relacionadas a longevidade em diferentes espécies, pois o estresse oxidativo está presente em inúmeras doenças crônicas (Bruns et al., 2015).

Além disso, o NRF2 é importante para respostas imunes tipo 2 locais ou sistêmicas e estimula defesas epidérmicas antioxidantes (Ogawa et al., 2020). A redução da atividade de NRF2 nos queratinócitos, por exemplo, prejudica a memória das células T citotóxicas (Ogawa et al., 2020).

Quando consideramos apenas as camadas profundas da pele, a suplementação oral de CoQ10 200mg por dia foi capaz de evitar a significativa redução de NRF2 apresentada nos grupos placebo (56%) e CoQ10 100mg (58%) ao longo dos 3 meses. O grupo CoQ10 200mg manteve os níveis de NRF2 nas camadas mais profundas da pele, com tendência a aumento, embora não significativo.

Ao analisarmos as camadas mais superficiais, houve redução nos grupos placebo e CoQ10 100mg, sendo significativa neste último grupo. Já o grupo CoQ10 200mg, assim como nas análises da derme profunda, apresentou tendência a aumento de NRF2. Acreditamos que um aumento da população do estudo poderia evidenciar significativamente esta tendência, uma vez que o conteúdo de CoQ10 na epiderme corresponde a dez vezes mais que o detectado na derme (Marcheggiani et al., 2019).

Na superfície da pele, o NRF2 é um fator de transcrição capaz de induzir a expressão de inúmeros genes citoprotetores que codificam enzimas antioxidantes e desintoxicantes, em resposta a estímulos externos, desempenhando papel fundamental na barreira cutânea e homeostase epidérmica (Edamitsu et al., 2022). Por este motivo, a camada superficial da pele foi analisada separadamente em relação à profunda, mas não houve diferença significativa nos resultados.

#### 6.2.4.2 p53

A análise de expressão da proteína p53 na epiderme mostrou redução nos grupos CoQ10 100mg e CoQ10 200mg, sendo mais significativa quando foram

combinados além do percentual, a intensidade de marcação imuno-histoquímica, seguindo classificação previamente descrita (Liang et al., 1999). O grupo placebo, por sua vez, mostrou uma tendência oposta aos grupos suplementados, com aumento dos valores.

Já foi descrito que a CoQ10 induz apoptose em células neoplásicas de linhagens cutâneas, como melanoma e carcinoma espinocelular, mantendo intactas as células normais da pele (Persaud et al., 2008). Quando aplicada topicamente na concentração de 1 a 1,5% em base lipossomal, durante 30 dias, a CoQ10 induziu redução de 55% do tamanho do tumor do tipo melanoma, em estudo pré-clínico (Persaud et al., 2006). Uma possível explicação para este resultado está no fato de mais da metade dos melanomas apresentarem desregulação dos genes *mdm2* e *p14ARF*, relacionados ao controle da *p53*, que também pode ser responsável pela resistência a quimioterápicos (Persaud et al., 2008).

Em outro estudo, a dieta mediterrânea, quando suplementada com 200mg diários de CoQ10, reduziu o dano oxidativo do DNA e diminuiu a oxidação celular em idosos através da redução citoplasmática e nuclear de *p53* em células mononucleares do sangue periférico (Gutierrez-Mariscal et al, 2012), em consonância ao observado na pele no nosso estudo. Analogamente, em células tronco mesenquimais, a CoQ10 reduziu a expressão de *p53*, *p21* e *p16* no grupo tratado com d-galactose, mostrando proteção destas células contra o estresse oxidativo e sugerindo papel relevante da via Akt/mTOR na prevenção da senescência celular (Zhang et al., 2015).

De maneira oposta, a suplementação de CoQ10 em animais orquiectomizados aumentou a expressão gênica de *p53*, sugerindo potenciais efeitos no controle da imunossenescência no sexo masculino (Souri; Bidmeshki-Pour; Karimi, 2017). Quando consideradas células neoplásicas, muitas análises demonstraram aumento da expressão de *p53* induzida pela CoQ10. Em linhagem celular de hepatocarcinoma humano, por exemplo, a CoQ10 combinada com piperina foi responsável pela ativação de *bcl-2*, *caspase-3*, *caspase-9* e *p53*, demonstrando potencial efeito anticâncer (Al-Johani et al, 2022). Em cultura de células de câncer colorretal humano, a CoQ10 inibiu o crescimento de células

neoplásicas através da produção de óxido nítrico regulada pela sinalização apoptótica de Bax, Bcl-2, p21 e p53 (Jang et al., 2017).

Em duas linhagens celulares humanas de câncer de pâncreas, o excesso de CoQ10 induziu apoptose das células neoplásicas através do aumento de EROs, mostrando que o estado pró-oxidativo é essencial neste tipo de atividade anticâncer (Dadali et al., 2021). Tanto a deficiência quanto o excesso de CoQ10 aumentam os níveis de EROs, induzindo disfunção mitocondrial, culminando em morte celular. Níveis normais de CoQ10 mitocondrial favorecem a homeostase e a sobrevivência celular. O limite de excesso de CoQ10 mitocondrial que gera morte celular varia em diferentes tipos de células (Dadali et al., 2021). Em nosso estudo, as doses de 100mg e 200mg não pareceram representar excessos para as células cutâneas.

A ação antiproliferativa mediada pela ativação de p53, que em células neoplásicas é fundamental para a supressão tumoral, pode afetar a função de auto renovação das células progenitoras, favorecendo o envelhecimento (Zhao et al., 2018). Em humanos, o polimorfismo de nucleotídeo único no códon 72 do gene TP53, que regula a atividade da p53, influencia o envelhecimento e a longevidade através da função de auto renovação das células tronco (Zhao et al., 2018). Enquanto o polimorfismo Pro/Arg no codon 72 da p53 altera o potencial de indução de apoptose (Ou; Schumacher, 2018). Por sua vez, em uma meta-análise foi demonstrado que portadores da forma menos potente de ativação da apoptose da p53, a Pro/Pro, possuem maior longevidade apesar de alta mortalidade por câncer (van Heemst et al., 2005).

Estudos em animais mostram que a permanente ativação da p53 no organismo pode evitar o câncer, porém confere uma expectativa de vida menor ao propiciar a atrofia precoce dos tecidos (Tyner et al, 2002). Como a longevidade é o equilíbrio entre a supressão tumoral e a renovação tecidual (Campisi, 2003), acredita-se que a p53 proteja humanos do surgimento de neoplasias, mas às custas do encurtamento da longevidade (van Heemst et al., 2005).

De acordo com estas evidências, a CoQ10 parece aumentar a ativação da p53 em células neoplásicas, enquanto reduz em células saudáveis, podendo

representar um papel importante neste equilíbrio entre a supressão tumoral e manutenção da longevidade.

## 6.3 PARÂMETROS LABORATORIAIS

### 6.3.1 Exames bioquímicos

Em consonância com outros estudos clínicos envolvendo suplementação oral de CoQ10 (Shults et al., 2002; Shults, 2003; Chew; Watts, 2004; Galpern; Cudkowicz, 2007, Matthews-Brzozowska; Kurhańska-Flisykowska; Stop, 2007, Kumar et al., 2009; Gao et al., 2012; Lafuente et al., 2013; Mortensen et al, 2014), não houve alterações deletérias das funções hematológicas, hepáticas ou renais, corroborando com a segurança do uso desta substância.

### 6.3.2 Dosagem de citocinas séricas por *Cytometric Bead Array* (CBA)

As citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 $\beta$  não foram detectáveis no soro das participantes, tanto antes quanto após suplementação de CoQ10. Estas citocinas estão elevadas e suficientemente detectáveis no sangue em estados inflamatórios intensos, como sepse, quando os pacientes reduzem os níveis séricos de CoQ10 (Donnino et al., 2011). Mas, mesmo em ensaios clínicos com suplementação de CoQ10 em pacientes sépticos, não houve diferença significativa nos níveis séricos de TNF após uso de CoQ10 (Donnino et al., 2015). Assim, níveis séricos indetectáveis de TNF e IL-1 $\beta$  são plausíveis em idosas saudáveis e não demonstraram relevância para a população de interesse deste estudo, podendo ser excluídas de análises futuras com participantes saudáveis.

Por outro lado, as citocinas IL-6 e IL-10 apresentaram níveis séricos detectáveis e podem representar correlações com respostas a suplementação de CoQ10. Na população analisada, não houve significância. Já foi demonstrada correlação inversa entre níveis séricos de IL-10 e de CoQ10, sugerindo que a

CoQ10 pode desempenhar papel importante na resposta inflamatória (Donnino et al., 2011).

Em ensaio clínico com 200mg/dia de Ubiquinol, a forma reduzida de CoQ10, os pacientes sépticos mostram aumento de IL-6 sérica, sem alterar níveis séricos de IL-10, TNF e IL-2 após suplementação. O motivo desta alteração permanece inexplicado (Donnino et al., 2015). Analogamente, alguns estudos mostram redução dos níveis séricos de fatores inflamatórios como óxido nítrico, lactato e piruvato após suplementação com doses maiores de CoQ10, como 400mg/dia (Nattagh-Eshtivani et al., 2018). Deste modo, a análise de IL-6 e IL-10 podem representar dados relevantes em futuros estudos.

Alguns ensaios clínicos recentes também avaliaram TNF e IL-6. Quando suplementados com CoQ10 100mg/dia por 8 semanas, pacientes com artrite reumatóide apresentaram redução significativa nos níveis séricos de TNF-alfa, enquanto a IL-6 permaneceu inalterada (Abdollahzad et al., 2015). Da mesma forma, pacientes com esteatose hepática não-alcoólica suplementados com CoQ10 100mg/dia por 3 meses mostraram níveis séricos diminuídos de TNF-alfa, sem demonstrar alterações da IL-6 (Farsi et al., 2016). Por outro lado, quando doses maiores de CoQ10 foram administradas, como 500mg/dia por 12 semanas em indivíduos com esclerose múltipla, houve significativa queda dos marcadores inflamatórios plasmáticos, IL-6 e TNF- $\alpha$  (Sanoobar et al., 2015).

Ante o exposto, é relevante destacar que diferentes estudos indicaram boa tolerância a ingestões diárias de CoQ10 de 400mg, 600mg, 800mg e até 1.200mg em pacientes com doença de Parkinson, por exemplo, e indicaram melhores respostas à medida em que a dose diária ofertada foi aumentada (Shults et al., 1998; Shults et al., 2002). Portanto, novo grupo de intervenção, com dose mais elevada da suplementação oral, poderá ser considerado em futuros estudos.

### **6.3.3 Dosagem de coenzima Q10 sérica (ELISA)**

Não houve diferença significativas nos níveis séricos de CoQ10 entre os grupos no período pré e pós suplementação.

A curva farmacocinética da concentração plasmática de CoQ10, descrita em inúmeros estudos, mostra um padrão bifásico com primeiro pico por volta 6h e segundo entre 10 e 24 horas após administração oral (Bhagavan; Chopra, 2007; Constantinescu et al., 2007; Evans et al., 2009; Pravst et al, 2020; Beaulieu et al., 2022). Este padrão é explicado pela redistribuição de CoQ10 nos tecidos e recirculação entero-hepática pós-prandial mediada por LDL e VLDL, que precede estes dois picos séricos (Pravst et al, 2020).

Em nosso estudo, as medidas séricas de CoQ10 foram realizadas nas amostras de sangue colhidas antes de iniciar a suplementação e após 24h da administração da última dose oral, ao final dos três meses. Assim, os picos séricos nos grupos suplementados com CoQ10 podem não ter sido detectados.

Alguns ensaios clínicos com CoQ10 controlam a alimentação das participantes, fornecendo a mesma dieta no período do estudo ou até mesmo internando-as durante os dias do estudo, pois a CoQ10 administrada via oral pode ser armazenada no fígado ou em outros tecidos ricos em lipídeos, sendo distribuída na circulação sanguínea após alimentação, variando de acordo com o teor lipídico da dieta (Pravst et al, 2020; Beaulieu et al., 2022). Por questões de limitações de recursos financeiros, as participantes não receberam alimentação padronizada, o que pode ter contribuído para a variabilidade nos níveis séricos.

Além disso, para obter quantificações séricas mais homogêneas após administração oral de CoQ10, alguns estudos admitem como critério de exclusão a presença de comorbidades e o uso de quaisquer medicamentos (Pravst et al, 2020). Em nosso recrutamento, com os critérios de exclusão selecionados, houve dificuldade de inclusão de mulheres idosas que concordassem com a realização de biopsias cutâneas. Assim, acrescentar mais critérios de exclusão dificultaria ainda mais a obtenção de população de tamanho satisfatório para a pesquisa.

Ademais, poucos estudos de biodisponibilidade da CoQ10 incluem idosos, apesar de ser a faixa etária que provavelmente mais se beneficiaria desta suplementação, uma vez que sua biossíntese é reduzida no envelhecimento (Pravst et al, 2020). Apesar disto, sabe-se que existe uma grande variabilidade

individual na resposta plasmática à suplementação oral de CoQ10. Alguns dos principais fatores como idade e gênero (Beaulieu et al., 2022) foram controlados no nosso estudo. Entretanto, outros fatores como ingestão diária de lipídeos, estado redox, fatores genéticos e comorbidades (Molyneux et al., 2008; Pravst et al, 2020) não foram controlados, podendo explicar a ausência de diferença significativa nos níveis séricos de CoQ10 pós suplementação nos 3 grupos.

Outro fator que pode explicar a uniformidade de resultados séricos pós suplementação é o fato de que apesar de ser consumida como ubiquinona, a CoQ10 aparece no plasma quase exclusivamente na sua forma reduzida, o ubiquinol (Pravst et al, 2020). Para futuros estudos, a forma reduzida de CoQ10 pode ser separada da oxidada através da metodologia de HPLC com o método gradiente de metanol-propanol e detecção eletroquímica (Rodríguez-Aguilera et al., 2017).

#### **6.3.4 Expressão dos genes por PCR em tempo real (q-RT-PCR) para metaloproteinases, proto-oncogenes e fatores antioxidantes na pele**

A análise por Q-RT-PCR da expressão de RNAm de MMP-9 foi detectável na pele das participantes, pré e pós suplementação, mas não mostrou diferenças. Em estudo recente, foi demonstrada redução de MMP-9 no sangue dos pacientes suplementados com CoQ10 400mg/dia (Nattagh-Eshtivani et al., 2018), mas não foram realizadas análises cutâneas diretas. O fato de níveis séricos estarem reduzidos em outros estudos não indica necessariamente resultado semelhante nas células cutâneas. Assim, o aumento do número de participantes em futuros estudos poderia demonstrar, com mais clareza, o efeito da suplementação oral na MMP-9 da pele.

A expressão das demais metaloproteinases avaliadas, MMP-1 e MMP-3, foram indetectáveis antes e após a suplementação, demonstrando não serem parâmetros relevantes para futuras análises.

As frações C-JUN e FOS do AP-1, assim como TGF-beta e TGF BR II, importantes fatores atuantes nas vias moleculares do processo de envelhecimento, foram detectados em todas as participantes. Estudos mais detalhados podem ser conduzidos com estes proto-oncogenes e antioxidantes no futuro.

Os fatores antioxidantes avaliados, SOD, catalase e peroxirredoxina 6 não mostraram diferenças significativas nos períodos pré e pós suplementação, em nenhum dos grupos. O aumento era esperado nos grupos suplementados com CoQ10, devido à atuação desta coenzima na cadeia transportadora de elétrons mitocondriais, com importante papel protetor na função de antioxidante celular (Shen; Pierce, 2015). Estes dados, entretanto, não foram significantes, provavelmente pelo tamanho da população estudada.

Outros estudos já demonstraram benefícios da CoQ10 em idosos ao prevenir o estresse oxidativo associado a doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Gonzalez-Guardia et al., 2015). Além disso, a CoQ10 desempenha papel chave na via mitocondrial transportadora de elétrons para produção de energia, durante a fosforilação oxidativa. Pode carregar 1 a 2 elétrons nesta cadeia transportadora e, portanto, ser completamente oxidada, parcialmente oxidada ou completamente reduzida, na forma de ubiquinona, ubisemiquinona ou ubiquinol, respectivamente. Deste modo, age como antioxidante celular, neutralizando radicais livres (Aberg et al., 1992). Portanto, a avaliação do sistema redox nas células cutâneas, até o presente momento não relatada na literatura, poderá indicar relevantes ações dermatológicas da suplementação oral de CoQ10.

A análise de Q-RT-PCR indica o transcrito de RNA mensageiro, mas não evidencia a proteína. Assim, para alguns dos fatores analisados nesta metodologia, como aqueles do sistema redox (SOD, catalase e peroxirredoxina 6), seria interessante complementar as possíveis evidências com a pesquisa da própria proteína através da imunohistoquímica, para dar mais suporte aos futuros estudos.

#### 6.4 CORRELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS

As correlações analisadas entre as variáveis estudadas não demonstraram resultados relevantes, uma vez que as principais, tanto positivas quanto negativas, foram estabelecidas apenas entre variáveis que utilizaram medidas semelhantes de quantificação.

## 7 CONCLUSÃO

A suplementação oral de CoQ10 mostrou benefício cutâneo em idosas saudáveis, sobretudo na dose diária de 200mg. Nos aspectos clínicos, melhorou o eritema facial, a hiperpigmentação e a viscoelasticidade. Nos critérios histológicos, evidenciou resposta no aumento da área de epiderme celular, na síntese de colágeno, na preservação de fibras elásticas, na manutenção do fator antioxidante Nrf2 e na redução da proteína indutora de apoptose p53. Nos parâmetros laboratoriais, demonstrou segurança clínica nas funções hepática, renal e hematológica, sem efeitos adversos ou toxicidade evidentes no período do estudo.

Nos demais parâmetros avaliados, como autopercepção de melhora estética global, hidratação, TEWL, espessura e densidade dérmica à USG, extensão da JDE, expressão de citocinas séricas (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10), níveis séricos de CoQ10, expressão de genes por RT-qPCR de MMPs (MMP-1, MMP-3, MMP-9), proto-oncogenes (c-JUN, FOS) e antioxidantes (TGF-beta, receptor II de TGF-beta e SOD), não houve diferenças em relação ao placebo. As correlações de Spearman não evidenciaram correlações independentes fortes.

Assim, a CoQ10 demonstrou contribuir para a saúde da pele em diferentes mecanismos relacionados ao envelhecimento, de modo seguro e acessível, tornando-se um suplemento oral a ser considerado para a população idosa, mantendo a individualização da indicação de acordo com comorbidades e medicamentos em uso, para evitar efeitos adversos.

## 8 REFERÊNCIAS

Abdollahzad H, Aghdashi MA, Asghari Jafarabadi M, Alipour B. Effects of Coenzyme Q10 supplementation on inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6) and oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: a randomized controlled trial. *Arch Med Res.* 2015;46(7):527-33.

Aberg F, Appelkvist EL, Dallner G, Ernster L. Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues. *Arch Biochem Biophys.* 1992;295(2):230–4.

Adarsh K, Kaur H, Mohan V. Coenzyme Q 10 (CoQ 10 ) in isolated diastolic heart failure in hypertrophic cardiomyopathy (HCM). *Biofactors.* 2008;32:145–9.

Albanes D, Heinonen OP, Huttunen JK, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK, et al. Effects of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on cancer incidence in the Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *Am J Clin Nutr.* 1995;62(Suppl 6):1427S–1430S.

Albanes D, Heinonen OP, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK, Rautalahti M, et al. Alpha-Tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: effects of base-line characteristics and study compliance. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(21):1560-70.

Al-Johani NS, Al-Zharani M, Almutairi B, Aljarba NH, Alhoshani NM, Alkeraishan N, et al. Protective effect of coenzyme-10 and piperine against cyclophosphamide-induced cytotoxicity in human cancer HuH-7 cells. *J King Saud Univ - Sci.* 2022;34(4):102009.

Anandhan A, Nguyen N, Syal A, Dreher LA, Dodson M, Zhang DD, et al. NRF2 loss accentuates parkinsonian pathology and behavioral dysfunction in human  $\alpha$ -Synuclein overexpressing mice. *Aging Dis.* 2021;12(4):964-82.

Anderson RN. US Decennial Life Tables for 1989–91. Hyattsville: National Center for Health Statistics; 1999. (vol. 1; no. 4, 7–8).

Ashida Y. Inhibitory Effects of coenzyme Q10 on Skin Aging. In: Tabor A, Blair, RM, editors. *Nutritional cosmetics: beauty from within.* Oxford: William Andrew Publishing; 2009. p. 199–215.

Atyah M, Zhou C, Zhou Q, Chen W, Weng J, Wang P, et al. The age-specific features and clinical significance of NRF2 and MAPK10 expression in HCC patients. *Int J Gen Med.* 2022;15:737-48.

Avery NC, Bailey AJ. Restraining cross-links responsible for the mechanical properties of collagen fibers: natural and artificial. In: Fratzl P. *Collagen: structure and mechanics.* New York: Springer; 2008. p. 81-110.

Bazin R, Fanchon C. Equivalence of face and volar forearm for the testing of moisturizing and firming effect of cosmetics in hydration and biomechanical studies. *Int J Cosmet Sci.* 2006;28(6):453-60.

Beal MF. Coenzyme Q 10 administration and its potential for treatment of neurodegenerative diseases. *Biofactors.* 1999;9:261–6.

Beaulieu S, Vachon A, Plourde M. Women have higher levels of CoQ10 than men when supplemented with a single dose of CoQ10 with monoglycerides omega-3 or rice oil and followed for 48 h: a crossover randomised triple blind controlled study. *J Nutr Sci.* 2022;11:e2.

Bekhouche M, Colige A. The procollagen N-proteinases ADAMTS2, 3 and 14 in pathophysiology. *Matrix Biol.* 2015;44-46:46-53.

Bennett MF, Robinson MK, Baron ED, Cooper KD. Skin Immune Systems and Inflammation: Protector of the Skin or Promoter of Aging?. *Investig Dermatol Symp Proc.* 2008;13(1):15-9.

Bergfeld WF. The aging skin. *Int J Fertil Womens Med.* 1997;42(2):57-66.

Berkman LF, Ertel KA, Glymour MM. Aging and social intervention: life course perspectives. In Binstock RH, George LK, editors. *Handbook of aging and the social sciences.* 7<sup>th</sup> ed. New York: Academic Press; 2011. p. 337–351.

Berna C, Kirsch I, Zion SR, Lee YC, Jensen KB, Sadler P, et al. Side effects can enhance treatment response through expectancy effects: an experimental analgesic randomized controlled trial. *Pain* 2017;158:1014.

Bernstein MH, Locher C, Kube T, Buergler S, Stewart-Ferrer S, Blease C. Putting the 'Art' Into the 'Art of Medicine': The Under-Explored Role of Artifacts in Placebo Studies. *Front Psychol.* 2020;11:1354.

Bhagavan HN, Chopra RK. Coenzyme Q 10: absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free Radic Res.* 2006;40:445–53.

Bhagavan HN, Chopra RK. Plasma coenzyme Q10 response to oral ingestion of coenzyme Q10 formulations. *Mitochondrion.* 2007;7(Suppl):S78–S88.

Bissett DL, Miyamoto K, Sun P, Li J, Berge CA. Topical niacinamide reduces yellowing, wrinkling, red blotchiness, and hyperpigmented spots in aging facial skin. *Int J Cosmet Sci.* 2004;26:231-8.

Blease CR. The role of placebos in family medicine: 'Implications of evidence and ethics for general practitioners'. *Aust J Gen Pract.* 2019;48:700.

Bogdan Allemann I, Baumann L. Antioxidants used in skin care formulations. *Skin Therapy Lett.* 2008;13(7):5–9.

Bonakdar RA, Guarneri E. Coenzyme Q 10. *Am Fam Physician.* 2005;72:1065-70.

Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(12):786–801.

Boo YC. Natural Nrf2 Modulators for Skin Protection. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(9):812.

Bor-Jen L, Yi-Chin L, Yi-Chia H, Ya-Wen K, Simon H, Ping-Ting L. The relationship between coenzyme Q10, oxidative Stress, and antioxidant enzymes activities and coronary artery disease. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:792756.

Bor-Jen L, Yu-Fen T, Chi-Hua Y, Ping-Ting L. Effects of coenzyme Q10 supplementation (300 mg/day) on antioxidation and anti-inflammation in coronary

artery disease patients during statins therapy: a randomized, placebo-controlled trial. *Nutr J*. 2013;12:142.

Brancalion CL, Gonçalves AC, Candeloro NM, Rossi LA, Guirro ECO. Influence of therapeutic ultrasound on the biomechanical characteristics of the skin. *J Ther Ultrasound*. 2016;4:21.

Brasil. Lei n. 10.741, de 1º de outubro de 2003. Dispõe sobre o estatuto do idoso e dá outras providências. *Diário Oficial da União, Brasília* (2003 out. 03); Sec.1:1.

Bratcher TL, Moran MA, Zimmer WJ. Tables of Sample Sizes in the Analysis of Variance. *Journal of Quality Technology*. 1970;2(3):156-64.

Bruns DR, Drake JC, Biela LM, Peelor FF, Miller BF, Hamilton KL. Nrf2 signaling and the slowed aging phenotype: evidence from long-lived models. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:732596.

Brüünsgaard H, Pedersen BK. Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2003;23(1):15-39.

Caetano VNL, Soares JL, Bagatin E, Miot HA. Reliable assessment of forearm photoageing by high-frequency ultrasound: a cross-sectional study. *Int J Cosmet Sci*. 2016;38(2):170-7.

Calkins MJ, Johnson DA, Townsend JA, Vargas MR, Dowell JA, Williamson TP, et al. The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(3):497-508.

Calverley BC, Kadler KE, Pickard A. Dynamic High-Sensitivity Quantitation of Procollagen-I by Endogenous CRISPR-Cas9 NanoLuciferase Tagging. *Cells*. 2020;9(9):2070.

Campisi J. Cancer and ageing: rival demons?. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):339-49.

Campos J. Projeto de lei 5383/2019. Altera as Leis nº 10.741 de 1º de outubro de 2003 e 10.048, de 8 de novembro de 2000, para mudar de 60 (sessenta) para 65 (sessenta e cinco) anos a idade da pessoa idosa [Internet]. Brasília: Câmara dos Deputados; 2019 [citado 2022 ago 01]. Disponível em: <https://www.camara.leg.br/propostas-legislativas/2223942>).

Carvalho PRS, Sumita JM, Soares JLM, Sanudo A, Bagatin E. Forearm skin aging: characterization by instrumental measurements. *Int J Cosmet Sci*. 2017;39(5):564-71.

Castelo-Branco C, Figueras F, Osaba MJM, Vanrell JA. Facial wrinkling in postmeno-pausal women. Effects of smoking status and hormone replacement therapy. *Maturitas*. 1998;29:75–86.

Celik T, Iyisoy A. Coenzyme Q 10 and coronary artery bypass surgery: what we have learned from clinical trials. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2009;23(6):935-6.

Chambers ES, Vukmanovic-Stejic M. Skin barrier immunity and ageing. *Immunology*. 2020;160:116–25.

Charruyer A, Weisenberger T, Li H, Khalifa A, Schroeder AW, Belzer A, et al. Decreased p53 is associated with a decline in asymmetric stem cell self-renewal in aged human epidermis. *Aging Cell*. 2021;20(2):e13310.

- Chavaunne TT, Hazel RC. Screen, tendon structure and composition. In: Paul W. Ackermann PQ, Hart DA, editors. *Metabolic influences on risk for tendon disorders*. New York: Springer; 2016. p. 3–10.
- Chen H, Wang X, Han J, Fan Z, Sadia S, Zhang R, et al. AKT and its related molecular feature in aged mice skin. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178969.
- Chen J, Liu Y, Zhao Z, Qiu J. Oxidative stress in the skin: Impact and related protection. *Int J Cosmet Sci*. 2021;43(5):495-509.
- Chen X, Song M, Zhang B, Zhang Y. Reactive oxygen species regulate T cell immune response in the tumor microenvironment. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1580967.
- Chew GT, Watts GF. Coenzyme Q10 and diabetic endotheliopathy: oxidative stress and the 'recoupling hypothesis'. *QJM*. 2004;97(8):537-48.
- Choi JW, Kwon SH, Huh CH, Park KC, Youn SW. The influences of skin visco-elasticity, hydration level and aging on the formation of wrinkles: a comprehensive and objective approach. *Skin Res Technol*. 2013;19(1):e349-e355.
- Choi SY, Bin BH, Kim W, Lee E, Lee TR, Cho EG. Exposure of human melanocytes to UVB twice and subsequent incubation leads to cellular senescence and senescence-associated pigmentation through the prolonged p53 expression. *J Dermatol Sci*. 2018;90(3):303-12.
- Chung L, Dinakarbandian D, Yoshida N, Lauer-Fields JL, Fields GB, Visse R, et al. Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. *EMBO J*. 2004;23(15):3020-30.
- Ciriolo MR, Marasco MR, Iannone M, Nistico G, Rotilio G. Decrease of immunoreactive catalase protein in specific areas of ageing rat brain. *Neurosci Lett*. 1997;228(1):21–24.
- Comfort A. *The biology of senescence*. 3<sup>rd</sup> ed. Edinburgh; London: Churchill Livingstone; 1979.
- Constantinescu R, McDermott MP, Dicenzo R, Blicke EA, Hyson HC, Beal MF, et al. A randomized study of the bioavailability of different formulations of coenzyme Q(10) (ubiquinone). *J Clin Pharmacol*. 2007;47(12):1580-6.
- Cooper JM, Korlipara LV, Hart PE, Bradley JL, Schapira AH: Coenzyme Q 10 and vitamin E deficiency in Friedreich's ataxia: predictor of efficacy of vitamin E and coenzyme Q 10 therapy. *Eur J Neurol*. 2008;15:1371–9.
- Cordero MD, Miguel M, Moreno Fernández AM, Carmona López IM, Garrido Maraver J, et al: Mitochondrial dysfunction and mitophagy activation in blood mononuclear cells of fibromyalgia patients: implications in the pathogenesis of the disease. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(1):R17.
- Costa A, Pereira ESP, Assumpção EC, Santos FBC, Ota FS, Pereira MO, et al. Assessment of clinical effects and safety of an oral supplement based on marine protein, vitamin C, grape seed extract, zinc, and tomato extract in the improvement of visible signs of skin aging in men. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2015;8:319-28.

- Coulmas F. Population decline and ageing in Japan: the social consequences. London: Routledge; 2007.
- Cox SE, Finn JC, Stetler L, Mackowiak J, Kowalski JW. Development of the facial lines treatment satisfaction questionnaire and initial results for botulinum toxin type a-treated patients. *Dermatol Surg.* 2003;29(5):444-9; discussion 449.
- Crane FL, Hatefi Y, Lester RL, Widmer C. Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1957;25(1):220-1
- Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q 10. *J Am Coll Nutr.* 2001;20: 591–8.
- Crisan D, Lupsor M, Boca A, Crisan M, Badea R. Ultrasonographic assessment of skin structure according to age. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2012;78(4):519.
- Dąbrowska M, Mielcarek A, Nowak I. Evaluation of sex-related changes in skin topography and structure using innovative skin testing equipment. *Skin Res Technol.* 2018;24(4):614-20.
- Dadali T, Diers AR, Kazerounian S, Muthuswamy SK, Awate P, Ng R, et al. Elevated levels of mitochondrial CoQ10 induce ROS-mediated apoptosis in pancreatic cancer. *Sci Rep.* 2021;11(1):5749.
- Davinelli S, Willcox DC, Scapagnini G. Extending healthy ageing: nutrient sensitive pathway and centenarian population. *Immun Ageing.* 2012;9:9.
- Del Bino S, Duval C, Bernerd F. Clinical and Biological Characterization of skin pigmentation diversity and its consequences on UV impact. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9):2668.
- Del Pozo-Cruz J, Rodríguez-Bies E, Navas-Enamorado I, Del Pozo-Cruz B, Navas P, López-Lluch G. Relationship between functional capacity and body mass index with plasma coenzyme Q10 and oxidative damage in community-dwelling elderly-people. *Exp Gerontol.* 2014;52:46-54.
- Done AJ, Gage MJ, Nieto NC, Traustadóttir T. Exercise-induced Nrf2-signaling is impaired in aging. *Free Radic Biol Med.* 2016;96:130-8.
- Donnino MW, Cocchi MN, Saliccioli JD, Kim D, Naini AB, Buettner C, et al. Coenzyme Q10 levels are low and may be associated with the inflammatory cascade in septic shock. *Crit Care.* 2011;15:R189.
- Donnino MW, Mortensen SJ, Andersen LW, Chase M, Berg KM, Balkema J, et al. Ubiquinol (reduced Coenzyme Q10) in patients with severe sepsis or septic shock: a randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial. *Crit Care.* 2015;19:275.
- Draelos ZD, Donald A. The effect of an anti-inflammatory botanical cleanser/night mask combination on facial redness Reduction. *J Drugs Dermatol.* 2018;17(6):671-6.
- Ebert T, Neytchev O, Witasp A, Kublickiene K, Stenvinkel P, Shiels PG. Inflammation and oxidative stress in chronic kidney disease and dialysis patients. *Antioxid Redox Signal.* 2021;35(17):1426-48.

- Eckersley A, Ozols M, O'Cualain R, Keevill EJ, Foster A, Pilkington S, et al. Proteomic fingerprints of damage in extracellular matrix assemblies. *Matrix Biol Plus*. 2020;5:100027.
- Edamitsu T, Taguchi K, Okuyama R, Yamamoto M. AHR and NRF2 in skin homeostasis and atopic dermatitis. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(2):227.
- El Kahky H, Diab H, Ali A. Clinical patterns of facial aging among egyptian females. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 2018;72(11): 5634-9.
- El-Domyati M, Medhat W, Abdel-Wahab HM, Mofteh NH, Nasif GA, Hosam W. Forehead wrinkles: a histological and immunohistochemical evaluation. *J Cosmet Dermatol*. 2014;13(3):188-94.
- Eldridge SM, Chan CL, Campbell MJ, Bond CM, Hopewell S, Thabane L, et al. CONSORT 2010 statement: extension to randomised pilot and feasibility trials. *Pilot Feasibility Stud*. 2016;2:64.
- Elias PM. Stratum corneum architecture, metabolic activity and interactivity with subjacent cell layers. *Exp Dermatol*. 1996;5(4):191-201.
- Evans M, Baisley J, Barss S, Guthrie N. A randomized, double-blind trial on the bioavailability of two CoQ10 formulations. *J Funct Foods*. 2009;1(1):65–73.
- Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Functional and physiological characteristics of the aging skin. *Aging Clin Exp Res*. 2008;20(3):195-200.
- Farsi F, Mohammadshahi M, Alavinejad P, Rezazadeh A, Zarei M, Engali KA. Functions of coenzyme Q10 supplementation on liver enzymes, markers of systemic inflammation, and adipokines in patients affected by nonalcoholic fatty liver disease: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Am Coll Nutr*. 2016;35(4):346-53.
- Fatma N, Singh DP, Shinohara T, Chylack Jr LT. Transcriptional regulation of the antioxidant protein 2 gene, a thiol-specific antioxidant, by lens epithelium-derived growth factor to protect cells from oxidative stress. *J Biol Chem*. 2001;276(52):48899-907.
- Fatma N, Singh P, Chhunchha B, Kubo E, Shinohara T, Bhargavan B, et al. Deficiency of Prdx6 in lens epithelial cells induces ER stress response-mediated impaired homeostasis and apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;301(4):C954-C967.
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000;408(6809):239-47.
- Fischer A, Onur S, Niklowitz P, Menke T, Laudes M, Rimbach G, et al. Coenzyme Q10 status as a determinant of muscular strength in two independent cohorts. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167124.
- Fisher AB. Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A<sub>2</sub> activities. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(3):831-44.
- Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. 1988;124(6):869-71.
- Flatt T. A new definition of aging?. *Front Genet*. 2012;23(3):148.

- Flynn C, Fiber-matrix models of the dermis. In: Querleux B. Computational biophysics of the skin. Singapore: Jenny Stanford Publishing; 2014. p. 133-160.
- Friedman O. Changes associated with the aging face. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2005;13(3):371-80.
- Fuller B, Smith D, Howerton A, Kern D. Anti-inflammatory effects of CoQ10 and colorless carotenoids. *J Cosmet Dermatol.* 2006;5(1):30-8.
- Galpern WR, Cudkowicz ME. Coenzyme Q treatment of neurodegenerative diseases of aging. *Mitochondrion.* 2007;7 Suppl:S146-53.
- Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC. Skin anti-aging strategies. *Dermatoendocrinol.* 2012;4(3):308-19.
- Gao L, Mao Q, Cao J, Wang Y, Zhou X, Fan L. Effects of coenzyme Q10 on vascular endothelial function in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis.* 2012;221(2):311-6.
- Gilchrest BA. A review of skin ageing and its medical therapy. *Br J Dermatol.* 1996;135(6):867-75.
- Glogau RG. Physiologic and structural changes associated with aging skin. *Dermatol Clin.* 1997;15(4):555-9.
- Golbidi S, Ebadi SA, Laher I. Antioxidants in the treatment of diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2011;7(2):106-25.
- González-Guardia L, Yubero-Serrano EM, Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Garcia-Rios A, Marin C, et al. Effects of the Mediterranean diet supplemented with coenzyme q10 on metabolomic profiles in elderly men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2015;70(1):78-84.
- Goralczyk R. Beta-carotene and lung cancer in smokers: review of hypotheses and status of research. *Nutr Cancer.* 2009;61(6):767-74.
- Gorbunova V, Rezazadeh S, Seluanov A. Dangerous entrapment for NRF2. *Cell.* 2016;165(6):1312-3.
- Goukassian DA, Gilchrest BA. The interdependence of skin aging, skin cancer, and DNA repair capacity: a novel perspective with therapeutic implications. *Rejuvenation Res.* 2004;7(3):175-85.
- Graham HK, Holmes DF, Watson RB, Kadler KE. Identification of collagen fibril fusion during vertebrate tendon morphogenesis. The process relies on unipolar fibrils and is regulated by collagen-proteoglycan interaction. *J Mol Biol.* 2000;295(4):891-902.
- Gray-Schopfer VC, Cheong SC, Chong H, Chow J, Moss T, Abdel-Malek ZA, et al. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16?. *Br J Cancer.* 2006;95(4):496-505.
- Greenberg S, Frishman WH. Co-enzyme Q10: a new drug for cardiovascular disease. *J Clin Pharmacol.* 1990;30(7):596-608.
- Greengross S. Age of no concern. *Nurs Times.* 1997;93(8):22.

- Greenwald MBY, Frušić-Zlotkin M, Soroka Y, Ben Sasson S, Bitton R, Bianco-Peled H, et al. Curcumin Protects Skin against UVB-Induced Cytotoxicity via the Keap1-Nrf2 pathway: the use of a microemulsion delivery system. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:5205471.
- Greiner C, Grainger S, Farrow S, Davis A, Su JL, Saybolt MD, et al. Robust quantitative assessment of collagen fibers with picosirius red stain and linearly polarized light as demonstrated on atherosclerotic plaque samples. *PLoS One*. 2021;16(3):e0248068
- Groneberg DA, Kindermann B, Althammer M, Klapper M, Vormann J, Littarru GP, et al: Coenzyme Q 10 affects expression of genes involved in cell signalling, metabolism and transport in human CaCo-2 cells. *Int J Biochem Cell Biol*.2005;37:1208–18.
- Guimarães CO, Bagatin E, Guadanhim LR, Sternberg F, Picosse FR, Nunes G, et al . Development and validation of a clinical scale for the evaluation of forearm skin photoaging. *Cutan Med Surg*. 2015;19(4):380-7.
- Gutierrez-Mariscal FM, Cruz-Ares S, Torres-Peña JD, Alcalá-Díaz JF, Yubero-Serrano EM, López-Miranda J. Coenzyme Q10 and Cardiovascular Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(6):906.
- Gutierrez-Mariscal FM, Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, Yubero-Serrano EM, Camargo A, Delgado-Casado N, et al. Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 induces postprandial changes in p53 in response to oxidative DNA damage in elderly subjects. *Age (Dordr)*. 2012;34(2):389-403.
- Guzman E, Langowski JL, Owen-Schaub L. Mad dogs, Englishmen and apoptosis: the role of cell death in UV-induced skin cancer. *Apoptosis*. 2003;8(4):315-25.
- Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res*. 2000;77:81-137.
- Hamilton WD. The moulding of senescence by natural selection. *J Theor Biol*. 1966;12(1):12-45.
- Hammerberg C, Duraiswamy N, Cooper KD. Active induction of unresponsiveness (tolerance) to DNFB by in vivo ultraviolet-exposed epidermal cells is dependent upon infiltrating class II MHC+ CD11bbright monocytic/macrophagic cells. *J Immunol*. 1994;153(11):4915-24.
- Hargreaves I, Heaton RA, Mantle D. Disorders of human coenzyme Q10 metabolism: an overview. *Int J Mol Sci*. 2020;21(18):6695.
- Hathcock JN, Shao A: Risk assessment for coenzyme Q 10 (Ubiquinone). *Regul Toxicol Pharmacol*. 2006;45:282–8.
- Hayflick L. The future of ageing. *Nature*. 2000;408(6809):267-9.
- Heinrich U, Koop U, Leneveu-Duchemin MC, Osterrieder K, Bielfeldt S, Chkarnat C, et al. Multicentre comparison of skin hydration in terms of physical-, physiological- and product-dependent parameters by the capacitive method (Corneometer CM 825). *Int J Cosmet Sci*. 2003;25(1-2):45-53.
- Heinz A. Elastases and elastokines: elastin degradation and its significance in

- health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2020;55(3):252-73.
- Heinz A. Elastic fibers during aging and disease. *Ageing Res Rev.* 2021;66:101255.
- Henchcliffe C, Beal MF: Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nat Clin Pract Neurol.* 2008;4(11):600-9.
- Hernández-Camacho JD, Bernier M, López-Lluch G, Navas P. Coenzyme Q<sub>10</sub> supplementation in aging and disease. *Front Physiol.* 2018;9:44.
- Hernandez-Pigeon H, Jean C, Charruyer A, Haure MJ, Baudouin C, Charveron M, *et al.* UVA induces granzyme B in human keratinocytes through MIF: implication in extracellular matrix remodeling. *J Biol Chem.* 2007;282(11):8157-64.
- Hexsel D, Caspary P, Dini TDF, Schilling-Souza J, Siega C. Variation of melanin levels in the skin in areas exposed and not exposed to the sun following winter and summer. *Surg Cosmet Dermatology.* 2013;5:298–301.
- Hidaka T, Fujii K, Funahashi I, Fukutomi N, Hosoe K. Safety assessment of coenzyme Q 10 (CoQ 10 ). *Biofactors.* 2008;32:199–208.
- Hodgson JM, Watts GF, Playford DA, Burke V, Croft KD. Coenzyme Q 10 improves blood pressure and glycaemic control: a controlled trial in subjects with type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr.* 2002;56(11):1137–42.
- Holmes DJ, Austad SN. Birds as animal models for the comparative biology of aging: a prospectus. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1995;50(2):B59-B66.
- Hosoe K, Kitano M, Kishida H, Kubo H, Fujii K, Kitahara M. Study on safety and bioavailability of ubiquinol (Kaneka QH) after single and 4-week multiple oral administration to healthy volunteers. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2007;47(1):19-28.
- Hseu YC, Ho YG, Mathew DC, Yen HR, Chen XZ, Yang HL. The in vitro and in vivo depigmenting activity of coenzyme Q10 through the down-regulation of  $\alpha$ -MSH signaling pathways and induction of Nrf2/ARE-mediated antioxidant genes in UVA-irradiated skin keratinocytes. *Biochem Pharmacol.* 2019;164:299-310.
- Hseu YC, Vudhya Gowrisankar Y, Chen XZ, Yang YC, Yang HL. The antiaging activity of ergothioneine in UVA-irradiated human dermal fibroblasts via the inhibition of the AP-1 pathway and the activation of Nrf2-mediated antioxidant genes. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:2576823.
- Hu XF, Yao J, Gao SG, Wang XS, Peng XQ, Yang YT, *et al.* Nrf2 overexpression predicts prognosis and 5-FU resistance in gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(9):5231-5.
- Hung L, Kempen G, Vries N. Cross-cultural comparison between academic and lay views of healthy ageing: a literature review. *Ageing Soc.* 2010;30(8):1373-91.
- Hwang K, Kim DJ, Kim SK. Does the upper eyelid skin become thinner with age?. *J Craniofac Surg.* 2006;17(3):474-6.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico: Brasil 2010. Rio de Janeiro: IBGE; 2013.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeção da população: tabela 7362 - esperança de vida ao nascer e taxa de mortalidade infantil, por sexo [Internet].

Rio de Janeiro: IBGE; 2021 [citado 2021 nov 09]. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/7362>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sinopse do Censo Demográfico, 2010. Rio de Janeiro: IBGE; 2011.

Inui M, Ooe M, Fujii K, Matsunaka H, Yoshida M, Ichihashi M. Mechanisms of inhibitory effects of CoQ10 on UVB-induced wrinkle formation in vitro and in vivo. *Biofactors*. 2008;32(1-4):237-43.

Johansson P, Dahlström Ö, Dahlström U, Alehagen U. Improved health-related quality of life, and more days out of hospital with supplementation with selenium and coenzyme Q10 combined. Results from a double blind, placebo-controlled prospective study. *J Nutr Health Aging*. 2015;19(9):870-7.

Joselow A, Lynn D, Terzian T, Box NF. Senescence-like phenotypes in human nevi. *Methods Mol Biol*. 2017;1534:175-84.

Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11(4):447-55.

Kammeyer A, Luiten RM. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev*. 2015;21:16-29.

Kapeta S, Chondrogianni N, Gonos ES. Nuclear Erythroid Factor 2-mediated Proteasome Activation Delays Senescence in Human Fibroblasts. *J Biol Chem*. 2010;285:8171–84.

Kawamukai M. Biosynthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2016;80(1):23-33.

Kennedy C, Bastiaens MT, Bajdik CD, Willemze R, Westendorp RG, Bouwes Bavinck JN; et al. Effect of smoking and sun on the aging skin. *J Invest Dermatol*. 2003;120(4):548-54.

Kerr DS. Treatment of mitochondrial electron transport chain disorders: a review of clinical trials over the past decade. *Mol Genet Metab*. 2010;99:246-55.

Kim DW, Hwang IK, Kim DW, Yoo KY, Won CK, Moon WK, et al. Coenzyme Q10 effects on manganese superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the hairless mouse skin induced by ultraviolet B irradiation. *Biofactors*. 2007;30(3):139-47.

Kim IH, Kisseleva T, Brenner DA. Aging and liver disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015;31:184–91.

Kim J, Shin W. How to Do Random Allocation (Randomization). *Clin Orthop Surg*. 2014;6(1):103-9.

Kim S, Kim SN, An S, Yeon JH, Wang XM, Li L, et al. Ageing-related features of hair and scalp in Chinese women by Clinical Evaluation Study. *J Cosmet Dermatol Sci Appl*. 2007;7(3):245-57.

Kim S, Kim SN, An S, Yeon JH, Wang XM, Li L, et al. Ageing-Related Features of Hair and Scalp in Chinese Women by Clinical Evaluation Study. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*. 2017;7:245-57.

- Kirkwood TB, Austad SN. Why do we age?. *Nature*. 2008;408(6809):233-8.
- Kishi T, Watanabe T, Folkers K. Bioenergetics in clinical medicine XV. Inhibition of coenzyme Q 10 -enzymes by clinically used adrenergic blockers of beta-receptors. *Res Commun Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1977;17(1):157-64.
- Kishida KT, Klann E. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(2):233-44.
- Klein EA, Thompson Jr IM, Tangen CM, Crowley JJ, Lucia MS, Goodman PJ, et al. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the selenium and vitamin E cancer prevention trial (SELECT). *JAMA*. 2011;306(14):1549-56.
- Knoops B, Argyropoulou V, Becker S, Ferte L, Kuznetsova O. Multiple roles of peroxiredoxins in inflammation. *Mol Cells*. 2016;39(1):60-4.
- Kohandel Z, Farkhondeh T, Aschner M, Samarghandian S. Nrf2 a molecular therapeutic target for Astaxanthin. *Biomed Pharmacother*. 2021;137:111374.
- Kröger M, Schleusener J, Jung S, Darvin ME. Characterization of collagen I fiber thickness, density, and orientation in the human skin in vivo using second-harmonic generation imaging. *Photonics*. 2021;8(9):404.
- Krueger N, Lueberding S, Oltmer M, Streker M, Kerscher M. Age-related changes in skin mechanical properties: a quantitative evaluation of 120 female subjects. *Skin Res Technol*. 2011;17(2):141–8.
- Kubben N, Zhang W, Wang L, Voss TC, Yang J, Qu J, et al. Repression of the antioxidant NRF2 pathway in premature aging. *Cell*. 2016;165(6):1361-74.
- Kumar A, Kaur H, Devi P, Mohan V. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome. *Pharmacol Ther*. 2009;124(3):259-68.
- Kunz M, Seifert B, Trüeb RM. Seasonality of hair shedding in healthy women complaining of hair loss. *Dermatology*. 2009;219(2):105-10.
- Kupper TS. The utility of transgenic mouse models in the study of cutaneous immunology and inflammation. *J Dermatol*. 1996;23(11):741-5.
- Kwong LK, Kamzalov S, Rebrin I, Bayne AC, Jana CK, Morris P, et al: Effects of coenzyme Q 10 administration on its tissue concentrations, mitochondrial oxidant generation, and oxidative stress in the rat. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(5):627-38.
- Lafuente R, González-Comadrán M, Solà I, López G, Brassesco M, Carreras R, et al. Coenzyme Q10 and male infertility: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(9):1147-56.
- Landau M. Exogenous factors in skin aging. *Curr Probl Dermatol*. 2007;35:1-13.
- Larroque-Cardoso P, Camaré C, Nadal-Wollbold F, Grazide MH, Pucelle M, Garoby-Salom S, et al. Elastin Modification by 4-Hydroxynonenal in hairless mice exposed to UV-A. Role in photoaging and actinic elastosis. *J Invest Dermatol*. 2015;135(7):1873-81.
- Le Quéré S, Lacan D, Lemaire B, Carillon J, Schmitt K. The role of superoxide dismutase (SOD) in skin disorders. *Nutrafoods*. 2014;13:13–27.

- Lee BJ, Tseng YF, Yen CH, Lin PT. Effects of coenzyme Q10 supplementation (300 mg/day) on antioxidation and anti-inflammation in coronary artery disease patients during statins therapy: a randomized, placebo-controlled trial. *Nutr J*. 2013;12(1):142.
- Lee J, Boo JH, Ryu H. The failure of mitochondria leads to neurodegeneration: Do mitochondria need a jump start?. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(14):1316-23.
- Lee Y, Hwang K. Skin thickness of Korean adults. *Surg Radiol Anat*. 2002;24(3-4):183-9.
- Leibowitz KA, Hardebeck EJ, Goyer JP, Crum AJ. The role of patient beliefs in open-label placebo effects. *Health Psychol*. 2019;38(7):613-22.
- Lenart P, Bienertová-Vašků J, Berec L. Evolution favours aging in populations with assortative mating and in sexually dimorphic populations. *Sci Rep*. 2018;8(1):16072.
- Leow YH, Maibach HI. Cigarette smoking, cutaneous vasculature, and tissue oxygen. *Clin Dermatol*. 1998;16(5):579-84.
- Liang J, Luo B. Toward a discourse shift in social gerontology: from successful aging to harmonious aging. *J Aging Stud*. 2012;26(3):327-34.
- Liang SB, Ohtsuki Y, Furihata M, Takeuchi T, Iwata J, Chen BK, et al. Sun-exposure- and aging-dependent p53 protein accumulation results in growth advantage for tumour cells in carcinogenesis of nonmelanocytic skin cancer. *Virchows Arch*. 1999;434(3):193-9.
- Libertini G. Aging definition. In: Gu D, Dupre ME, editors. *Encyclopedia of gerontology and population aging*. New York: Springer Cham; 2019. p. 1-10.
- Libertini G. An adaptive theory of increasing mortality with increasing chronological age in populations in the wild. *J Theor Biol*. 1988;132(2):145-62.
- Lima KC, Mendes TCO. What is the ideal age limit for a person to be considered an older adult today?. *Rev Bras Geriatr Gerontol*. 2019;22(5):e190298.
- Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol Med*. 2013;60:1-4.
- Lisk C, McCord J, Bose S, Sullivan T, Loomis Z, Nozik-Grayck E, et al. Nrf2 activation: a potential strategy for the prevention of acute mountain sickness. *Free Radic Biol Med*. 2013;63:264-73.
- Littarru GP, Tiano L. Clinical aspects of coenzyme Q10: an update. *Nutrition*. 2010;26(3):250-4.
- Liu HT, Cheng SB, Huang YC, Huang YT, Lin PT. Coenzyme Q10 and oxidative stress: inflammation status in hepatocellular carcinoma patients after surgery. *Nutrients*. 2017;9(1):29.
- Liu HT, Huang YC, Cheng SB, Huang YT, Lin PT. Effects of coenzyme Q10 supplementation on antioxidant capacity and inflammation in hepatocellular carcinoma patients after surgery: a randomized, placebo-controlled trial. *Nutr J*. 2016;15(1):85.
- Liu P, Ma D, Wang P, Pan C, Fang Q, Wang J. Nrf2 overexpression increases risk

- of high tumor mutation burden in acute myeloid leukemia by inhibiting MSH2. *Cell Death Dis.* 2021a;12(1):20.
- Liu J, Xu MY, Wu J, Zhang H, Yang L, Lun DX, et al. Picrosirius-polarization method for collagen fiber detection in tendons: a mini-review. *Orthop Surg.* 2021b;13(3):701-7.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
- López-Armada MJ, Riveiro-Naveira RR, Vaamonde-García C, Valcárcel-Ares MN. Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response. *Mitochondrion.* 2013;13(2):106-18.
- Loureiro JB, Abrantes M, Oliveira PA, Saraiva L. P53 in skin cancer: from a master player to a privileged target for prevention and therapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2020;1874(2):188438.
- Lubov JE, Cvammen W, Kemp MG. The Impact of the Circadian Clock on Skin Physiology and Cancer Development. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):6112.
- Lyu MS, Rhee SG, Chae HZ, Lee TH, Adamson MC, Kang SW, et al. Genetic mapping of six mouse peroxiredoxin genes and fourteen peroxiredoxin related sequences. *Mamm Genome.* 1999;10(10):1017-9.
- Ma X, Schickel ME, Stevenson MD, Sarang-Sieminski AL, Gooch KJ, Ghadiali SN, et al. Fibers in the extracellular matrix enable long-range stress transmission between cells. *Biophys J.* 2013;104(7):1410-8.
- Makrantonaki E, Zouboulis CC, German National Genome Research Network 2. The skin as a mirror of the aging process in the human organism--state of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). *Exp Gerontol.* 2007;42(9):879-86.
- Mancini A, Balercia G. Coenzyme Q(10) in male infertility: physiopathology and therapy. *Biofactors.* 2011;37(5):374-80.
- Marcheggiani F, Cirilli I, Orlando P, Silvestri S, Vogelsang A, Knott A, et al. Modulation of coenzyme Q10 content and oxidative status in human dermal fibroblasts using HMG-CoA reductase inhibitor over a broad range of concentrations. From mitohormesis to mitochondrial dysfunction and accelerated aging. *Aging (Albany NY).* 2019;11(9):2565-82.
- Martinez VD, Vucic EA, Thu KL, Pikor LA, Lam S, Lam WL. Disruption of KEAP1/CUL3/RBX1 E3-ubiquitin ligase complex components by multiple genetic mechanisms: Association with poor prognosis in head and neck cancer. *Head Neck.* 2015;37(5):727-34.
- Martínez-Revelles S, García-Redondo AB, Avendaño MS, Varona S, Palao T, Orriols M, et al. Lysyl Oxidase Induces Vascular Oxidative Stress and Contributes to Arterial Stiffness and Abnormal Elastin Structure in Hypertension: Role of p38MAPK. *Antioxid Redox Signal.* 2017;27(7):379-97.
- Masiero E, Souza LCL. Mapping humidity plume over local climate zones in a high-altitude tropical climate city, Brazil. *Ambient Constr.* 2018;18(4):1-12.

Matthews-Brzozowska T, Kurhańska-Flisykowska A, Stop J. Healing of periodontal tissue assisted by Coenzyme Q10 with Vitamin E - clinical and laboratory evaluation. *Pharmacol Reports*. 2007;59(Suppl 1):257-60.

Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling in skin: stromal to epithelial cross-talk. *J Invest Dermatol*. 2009;129(1):7-9.

McCallion R, Po ALW. Dry and photo-aged skin: manifestations and management. *J Clin Pharm Ther*. 1993;18(1):15-32.

McGrath JA, Robinson MK, Binder RL. Skin differences based on age and chronicity of ultraviolet exposure: results from a gene expression profiling study. *Br J Dermatol*. 2012;166(Suppl 2):9-15.

Mercado-Sáenz S, Ruiz-Gómez MJ, Morales-Moreno F, Martínez-Morillo M. Cellular aging: theories and technological influence. *Braz Arch Biol Technol*. 2010;53(6):1319-32.

Meunier L, Bata-Csorgo Z, Cooper KD. In human dermis, ultraviolet radiation induces expansion of a CD36+ CD11b+ CD1- macrophage subset by infiltration and proliferation; CD1+ Langerhans-like dendritic antigen-presenting cells are concomitantly depleted. *J Invest Dermatol*. 1995;105(6):782-8.

Middha P, Weinstein SJ, Männistö S, Albanes D, Mondul AM.  $\beta$ -Carotene supplementation and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: the role of tar and nicotine. *Nicotine Tob Res*. 2019;21(8):1045-50.

Miles MV, Patterson BJ, Schapiro MB, Hickey FJ, Chalfonte-Evans M, Horn PS, et al. Coenzyme Q10 absorption and tolerance in children with Down syndrome: a dose-ranging trial. *Pediatr Neurol*. 2006;35(1):30-7.

Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med*. 2005;142(1):37-46.

Molyneux SL, Young JM, Florkowski CM, Lever M, George PM. Coenzyme Q10: is there a clinical role and a case for measurement?. *Clin Biochem Rev*. 2008;29(2):71-82.

Mora Huertas AC, Schmelzer CE, Hoehenwarter W, Heyroth F, Heinz A. Molecular-level insights into aging processes of skin elastin. *Biochimie*. 2016;128-129:163-73.

Moreno-Fernández AM, Cordero MD, Garrido-Maraver J, Alcocer-Gómez E, Casas-Barquero N, Carmona-López MI, et al. Oral treatment with amitriptyline induces coenzyme Q deficiency and oxidative stress in psychiatric patients. *J Psychiatr Res*. 2012;46(3):341-5.

Morré DM, Morré DJ, Rehmus W, Kern D. Supplementation with CoQ10 lowers age-related (ar) NOX levels in healthy subjects. *Biofactors*. 2008;32(1-4):221-30.

Mortensen SA, Leth A, Agner E, Rohde M. Dose-related decrease of serum coenzyme Q10 during treatment with HMG-CoA reductase inhibitors. *Mol Aspects Med*. 1997;18(Suppl):S137-S144.

Mortensen SA, Rosenfeldt F, Kumar A, Dolliner P, Filipiak KJ, Pella D, et al. The effect of coenzyme Q10 on morbidity and mortality in chronic heart failure: results from Q-SYMBIO: a randomized double-blind trial. *JACC Heart Fail.* 2014;2(6):641-9.

Mukaka MM. Statistics corner: a guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J.* 2012;24(3):69-71.

Musci RV, Hamilton KL, Linden MA. Exercise-induced mitohormesis for the maintenance of skeletal muscle and healthspan extension. *Sports (Basel).* 2019;7(7):170.

Muthusamy VR, Kannan S, Sadhaasivam K, Gounder SS, Davidson CJ, Boehme C, et al. Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(2):366-76.

Nattagh-Eshtivani E, Dahri M, Hashemilar M, Tarighat-Esfanjani A. The effect of Coenzyme Q10 supplementation on serum levels of lactate, pyruvate, matrix metalloproteinase 9 and nitric oxide in women with migraine. A double blind, placebo, controlled randomized clinical trial. *Eur J Integr Med.* 2018;21:70-6.

Niamtu J. *The art and science of facelift surgery.* New York: Elsevier; 2019. p. 6-20.

Noh YH, Kim KY, Shim MS, Choi SH, Choi S, Ellisman MH, et al. Inhibition of oxidative stress by coenzyme Q10 increases mitochondrial mass and improves bioenergetic function in optic nerve head astrocytes. *Cell Death Dis.* 2013;4(10):e820.

O'goshi K. Suction cup method for measurement of skin mechanical properties: the cutometer. In: Serup J, Jemec GBE, editors. *Handbook of Non-invasive Methods and the Skin.* Boca Raton: CRC Press; 1995. p. 579–82.

Ochiai A, Itagaki S, Kurokawa T, Kobayashi M, Hirano T, Iseki K. Improvement in intestinal coenzyme q10 absorption by food intake. *Yakugaku Zasshi.* 2007;127(8):1251-4.

Ogawa T, Ishitsuka Y, Nakamura Y, Kubota N, Saito A, Fujisawa Y, et al. NRF2 Augments Epidermal Antioxidant Defenses and Promotes Atopy. *J Immunol.* 2020;205(4):907-14.

Ogrin M, Ogrin D, Rodman N, Močnik M, Vengar R, Smolej A, et al. Climate change and the future of winter tourism in Slovenia. *Hrvatski Geografski Glasnik.* 2011;73(1):215-28.

Okwundu N, Cline A, Feldman SR. Difference in vasoconstrictors: oxymetazoline vs. brimonidine. *J Dermatolog Treat.* 2021;32(2):137-43.

Oliveira LC, Ramasawmy R, Borges JD, Marin MLC, Muller NG, Kalil J, et al. Frequência de polimorfismo de nucleotídeo único de alguns genes da resposta imune em amostra populacional da cidade de São Paulo, Brasil. *Einstein (São Paulo).* 2011;9(3):359-66.

Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, et al. Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-

- Carotene and Retinol Efficacy Trial. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(21):1550-9.
- Oriá RB, Ferreira FVA, Santana EN, Fernandes MR, Brito GAC. Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histo-morfometria e autofluorescência. *An Bras Dermatol.* 2003;78(4):425-34.
- Ou HL, Schumacher B. DNA damage responses and p53 in the aging process. *Blood.* 2018;131(5):488-95.
- Overall JE, Doyle SR. Estimating sample sizes for repeated measurement designs. *Control Clin Trials.* 1994;15(2):100-23.
- Pala R, Orhan C, Tuzcu M, Sahin N, Ali S, Cinar V, et al. Coenzyme Q10 supplementation modulates NFκB and Nrf2 pathways in exercise training. *J Sports Sci Med.* 2016;15(1):196-203.
- Palamakula A, Soliman M, Khan MM. Regional permeability of coenzyme Q10 in isolated rat gastrointestinal tracts. *Pharmazie.* 2005;60(3):212-4.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(1):177-82.
- Pelman GR, Morrison CJ, Overall CM. Pivotal molecular determinants of peptidic and collagen triple helix activities reside in the S3' subsite of matrix metalloproteinase 8 (MMP-8): the role of hydrogen bonding potential of ASN188 and TYR189 and the connecting cis bond. *J Biol Chem.* 2005;280(3):2370-7.
- Persaud I, Lindley L, Sloan A, McCook J, Narain N. Induction of p53 by Coenzyme Q10 via modulation of mdm2 and p14. *Cancer Res.* 2008;68(Suppl 9):1819.
- Persaud I, Narain NR, Woan W, Russell KJ, Malik LH, Ricotti CA, et al. Attenuation of tumor angiogenesis in murine melanoma model using liposomal formulation of Coenzyme Q10. *Cancer Res.* 2006;66(Suppl 8):230.
- Pillai S, Oresajo C, Hayward J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *Int J Cosmet Sci.* 2005;27(1):17-34.
- Pirie K, Peto R, Reeves GK, Green J, Beral V. The 21st century hazards of smoking and benefits of stopping: a prospective study of one million women in the UK. *Lancet.* 2013;381(9861):133-41.
- Powell JT, Vine N, Crossman M. On the accumulation of D-aspartate in elastin and other proteins of the ageing aorta. *Atherosclerosis.* 1992;97(2-3):201-8.
- Prakash S, Sunitha J, Hans M. Role of coenzyme Q(10) as an antioxidant and bioenergizer in periodontal diseases. *Indian J Pharmacol.* 2010;42(6):334-7.
- Prašnikar E, Borišek J, Perdih A. Senescent cells as promising targets to tackle age-related diseases. *Ageing Res Rev.* 2021;66:101251.
- Pravst I, Rodríguez Aguilera JC, Cortes Rodríguez AB, Jazbar J, Locatelli I, Hristov H, et al. Comparative bioavailability of different coenzyme Q10 formulations in healthy elderly individuals. *Nutrients.* 2020;12(3):784.

- Quan T, Fisher GJ. Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: a mini-review. *Gerontology*. 2015;61(5):427-34.
- Quinzii CM, Hirano M. Primary and secondary CoQ(10) deficiencies in humans. *Biofactors*. 2011;37(5):361-5.
- Raghunath A, Sundarraj K, Arfuso F, Sethi G, Perumal E. Dysregulation of Nrf2 in hepatocellular carcinoma: role in cancer progression and chemoresistance. *Cancers (Basel)*. 2018;10(12):481.
- Rankin EF, Tracy RJ. Residual gain as a measure of individual differences in reading improvement. *Journal of Reading*. 1965;8(4):224-33.
- Rao VB, Cavalcanti IFA, Hada K. Annual variation of rainfall over Brazil and water vapor characteristics over South America. *J Geophys Res D: Atmospheres*. 1996;101(21): 26539-51.
- Rehn J, Schuster K. Clinic design as placebo-using design to promote healing and support treatments. *Behav Sci (Basel)*. 2017;7(4):77.
- Revell CK, Jensen OE, Shearer T, Lu Y, Holmes DF, Kadler KE. Collagen fibril assembly: new approaches to unanswered questions. *Matrix Biol Plus*. 2021;12:100079.
- Rhee SG. Overview on peroxiredoxin. *Mol Cells*. 2016;39(1):1-5.
- Rich L, Whittaker P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz J Morphol Sci*. 2005; 22(2):97–104.
- Robert L, Robert AM, Fülöp T. Rapid increase in human life expectancy: will it soon be limited by the aging of elastin?. *Biogerontology*. 2008;9(2):119-33.
- Robinson MK. Population differences in skin structure and physiology and the susceptibility to irritant and allergic contact dermatitis: implications for skin safety testing and risk assessment. *Contact Dermatitis*. 1999;41(2):65-79.
- Rockstein M, Chesky JA, Sussman ML. Comparative biology and evolution of aging. In: Finch CE, Hayflick L, editors. *Handbook of the biology of aging*. New York: Van Nostrand Reinhold; 1977. p. 3–34.
- Rodríguez-Aguilera JC, Cortés AB, Fernández-Ayala DJ, Navas P. Biochemical assessment of coenzyme Q10 deficiency. *J Clin Med*. 2017;6(3):27.
- Roffe L, Schmidt K, Ernst E. Efficacy of coenzyme Q10 for improved tolerability of cancer treatments: a systematic review. *J Clin Oncol*. 2004;22(21):4418-24.
- Rohani MG, Parks WC. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biol*. 2015;44-46:113-21.
- Romero R, Sayin VI, Davidson SM, Bauer MR, Singh SX, LeBoeuf SE, et al. Keap1 loss promotes Kras-driven lung cancer and results in dependence on glutaminolysis. *Nat Med*. 2017;23(11):1362-8.
- Rosa AC, Corsi D, Cavi N, Bruni N, Dosio F. Superoxide dismutase administration: a review of proposed human uses. *Molecules*. 2021;26(7):1844.

Rose MR, Rauser CL, Benford G, Matos M, Mueller LD. Hamilton's forces of natural selection after forty years. *Evolution*. 2007;61(6):1265-76.

Rose MR. *Evolutionary biology of aging*. Oxford: Oxford University Press; 1991. p. 38.

Rosenfeldt FL, Haas SJ, Krum H, Hadj A, Ng K, Leong JY, et al. Coenzyme Q10 in the treatment of hypertension: a meta-analysis of the clinical trials. *J Hum Hypertens*. 2007;21(4):297-306.

Rowe JW, Kahn RL. Successful aging. *Gerontologist*. 1997;37(4):433-40.

Ryu HS, Joo YH, Kim SO, Park KC, Youn SW. Influence of age and regional differences on skin elasticity as measured by the Cutometer. *Skin Res Technol*. 2008;14(3):354-8.

Sachdeva MM, Cano M, Handa JT. Nrf2 signaling is impaired in the aging RPE given an oxidative insult. *Exp Eye Res*. 2014;119:111-4.

Sahoo A, Chainy GB. Alterations in the activities of cerebral antioxidant enzymes of rat are related to aging. *Int J Dev Neurosci*. 1997;15(8):939-48.

Saini R. Coenzyme Q10: the essential nutrient. *J Pharm Bioallied Sci*. 2011;3(3):466-7.

Sajadimajd S, Khazaei M. Oxidative stress and cancer: the role of Nrf2. *Curr Cancer Drug Targets*. 2018;18(6):538-57.

Sándor PS, Di Clemente L, Coppola G, Saenger U, Fumal A, Magis D, et al. Efficacy of coenzyme Q10 in migraine prophylaxis: a randomized controlled trial. *Neurology*. 2005;64(4):713-5.

Sanoobar M, Eghtesadi S, Azimi A, Khalili M, Khodadadi B, Jazayeri S, et al. Coenzyme Q10 supplementation ameliorates inflammatory markers in patients with multiple sclerosis: a double blind, placebo, controlled randomized clinical trial. *Nutr Neurosci*. 2015;18(4):169-76.

Santos-González M, Gómez Díaz C, Navas P, Villalba JM. Modifications of plasma proteome in long-lived rats fed on a coenzyme Q10-supplemented diet. *Exp Gerontol*. 2007;42(8):798-806.

Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):170-81.

Saw CL, Kong AN. Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 as a chemopreventive target in colorectal cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2011;15(3):281-95.

Schäfer M, Farwanah H, Willrodt AH, Huebner AJ, Sandhoff K, Roop D, et al. Nrf2 links epidermal barrier function with antioxidant defense. *EMBO Mol Med*. 2012;4(5):364-79.

Schall R. Estimation in generalized linear models with random effects. *Biometrika*. 1991;78(4):719-27.

Schmelzer C, Lindner I, Rimbach G, Niklowitz P, Menke T, Döring F: Functions of coenzyme Q 10 in inflammation and gene expression. *Biofactors*. 2008;32(1-4):179-83.

Sciubba JD. Population aging as a global issue. In.: Sandal N, editor. Oxford research encyclopedia: international studies. Oxford: Oxford University Press; 2020. p. 1-18.

Searle T, Al-Niaimi F, Ali FR. The top 10 cosmeceuticals for facial hyperpigmentation. *Dermatol Ther*. 2020;33(6):e14095.

Sedgwick P, Greenwood N. Understanding the Hawthorne effect. *BMJ*. 2015;351:h4672.

Serebruany VL, Ordonez JV, Herzog WR, Rohde M, Mortensen SA, Folkers K, et al. Dietary coenzyme Q10 supplementation alters platelet size and inhibits human vitronectin (CD51/CD61) receptor expression. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997;29(1):16-22.

Shadel GS, Horvath TL. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell*. 2015;163(3):560-9.

Shapiro SD, Endicott SK, Province MA, Pierce JA, Campbell EJ. Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J Clin Invest*. 1991;87(5):1828-34.

Shen Q, Pierce JD. Supplementation of coenzyme Q10 among patients with type 2 diabetes mellitus. *Healthcare (Basel)*. 2015;3(2):296-309.

Sheriman EGM, Hartono Y, Fernanda C, Maya NJ, Widjaja S, Juhanna IV. The exercise increase nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) and correlate with aging: literature review. *Sport and Fitness Journal*. 2022;10(2):148-56.

Shibata T, Kokubu A, Saito S, Narisawa-Saito M, Sasaki H, Aoyagi K, et al. NRF2 mutation confers malignant potential and resistance to chemoradiation therapy in advanced esophageal squamous cancer. *Neoplasia*. 2011;13(9):864-73.

Shiels PG, Painer J, Natterson-Horowitz B, Johnson RJ, Miranda JJ, Stenvinkel P. Manipulating the exposome to enable better ageing. *Biochem J*. 2021;478(14):2889-98.

Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:929-58.

Shults CW, Beal MF, Fontaine D, Nakano K, Haas RH. Absorption, tolerability, and effects on mitochondrial activity of oral coenzyme Q10 in parkinsonian patients. *Neurology*. 1998;50(3):793-5.

Shults CW, Oakes D, Kieburtz K, Beal MF, Haas R, Plumb S, et al. Effects of coenzyme Q10 in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline. *Arch Neurol*. 2002;59(10):1541-50.

Shults CW. Coenzyme Q10 in neurodegenerative diseases. *Curr Med Chem*. 2003;10(19):1917-21.

Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence*. 2014;5:66-72.

Singh U, Devaraj S, Jialal I. Coenzyme Q10 supplementation and heart failure. *Nutr Rev*. 2007;65(6 Pt 1):286-93.

Sohal RS, Forster MJ. Coenzyme Q, oxidative stress and aging. *Mitochondrion*.

2007;7 Suppl(Suppl):S103-11.

Sokoloski L, Borges M, Bagatin E. Lycopene not in pill, nor in natura has photoprotective systemic effect. *Arch Dermatol Res*. 2015;307(6):545-9.

Souri Z, Bidmeshki-Pour A, Karimi I. Effect of coenzyme Q10 supplementation on p53 tumor suppressor gene expression in mouse model of andropause. *Biharean Biol*. 2017;11(1):53-6.

Sparling NE, Phelan SA. Identification of multiple transcripts for antioxidant protein 2 (Aop2): differential regulation by oxidative stress and growth factors. *Redox Rep*. 2003;8(2):87-94.

Stack EC, Matson WR, Ferrante RJ. Evidence of oxidant damage in Huntington's disease: translational strategies using antioxidants. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:79-92.

Stahl W, Heinrich U, Jungmann H, Sies H, Tronnier H. Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(3):795-8.

Stahl W, Sies H.  $\beta$ -Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. *Am J Clin Nutr*. 2012;96(5):1179S-84S.

Steele PE, Tang PH, DeGrauw AJ, Miles MV. Clinical laboratory monitoring of coenzyme Q10 use in neurologic and muscular diseases. *Am J Clin Pathol*. 2004;121 (Suppl):S113-S120.

Stefely JA, Pagliarini DJ. Biochemistry of mitochondrial coenzyme Q biosynthesis. *Trends Biochem Sci*. 2017;42(10):824-843.

Stege H, Roza L, Vink AA, Grewe M, Ruzicka T, Grether-Beck S, et al. Enzyme plus light therapy to repair DNA damage in ultraviolet-B-irradiated human skin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(4):1790-5.

Stenvinkel P, Painer J, Johnson RJ, Natterson-Horowitz B. Biomimetics - Nature's roadmap to insights and solutions for burden of lifestyle diseases. *J Intern Med*. 2020;287(3):238-51.

Stenvinkel P, Shiels PG. Long-lived animals with negligible senescence: clues for ageing research. *Biochem Soc Trans*. 2019;47(4):1157-64.

Südel KM, Venzke K, Mielke H, Breitenbach U, Mundt C, Jaspers S, et al. Novel aspects of intrinsic and extrinsic aging of human skin: beneficial effects of soy extract. *Photochem Photobiol*. 2005;81(3):581-7.

Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, Liu H, Jaiswal AK, Liu RM, Hagen TM. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(10):3381-6.

Sun L, Zhao Q, Xiao Y, Liu X, Li Y, Zhang J, et al. Trehalose targets Nrf2 signal to alleviate d-galactose induced aging and improve behavioral ability. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;521(1):113-9.

Svobodová A, Psotová J, Walterová D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2003;147(2):137-45.

Svobodová A, Walterová D, Vostalova J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2006;150(1):25-38.

Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI. Sirius RED F3BA as a stain for connective tissue. *Arch Pathol.* 1964;78:69-72.

Takahara M, Kang K, Liu L, Yoshida Y, McCormick TS, Cooper KD. iC3b arrests monocytic cell differentiation into CD1c-expressing dendritic cell precursors: a mechanism for transiently decreased dendritic cells in vivo after human skin injury by ultraviolet B. *J Invest Dermatol.* 2003;120(5):802-9.

Takema Y, Yorimoto Y, Kawai M, Imokawa G. Age-related changes in the elastic properties and thickness of human facial skin. *Br J Dermatol.* 1994;131(5):641-8.

Tam EM, Moore TR, Butler GS, Overall CM. Characterization of the distinct collagen binding, helicase and cleavage mechanisms of matrix metalloproteinase 2 and 14 (gelatinase A and MT1-MMP): the differential roles of the MMP hemopexin c domains and the MMP-2 fibronectin type II modules in collagen triple helicase activities. *J Biol Chem.* 2004;279(41):43336-44.

Tam EM, Wu YI, Butler GS, Stack MS, Overall CM. Collagen binding properties of the membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) hemopexin C domain. The ectodomain of the 44-kDa autocatalytic product of MT1-MMP inhibits cell invasion by disrupting native type I collagen cleavage. *J Biol Chem.* 2002;277(41):39005-14.

Tanaka N, Tajima S, Ishibashi A, Uchida K, Shigematsu T. Immunohistochemical detection of lipid peroxidation products, protein-bound acrolein and 4-hydroxynonenal protein adducts, in actinic elastosis of photodamaged skin. *Arch Dermatol Res.* 2001;293(7):363-7.

Teixeira INDO, Neri AL. Envelhecimento bem-sucedido: uma meta no curso da vida. *Psicol USP.* 2008;19(1):81-94.

Teran E, Hernandez I, Nieto B, Tavera R, Ocampo JE, Calle A. Coenzyme Q10 supplementation during pregnancy reduces the risk of pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;105(1):43-5.

Thuault S. Reflections on aging research from within the National Institute on Aging. *Nat Aging.* 2021;1:14-8.

Tiano L, Carnevali P, Padella L, Santoro L, Principi F, Brugè F, et al. Effect of Coenzyme Q10 in mitigating oxidative DNA damage in Down syndrome patients, a double blind randomized controlled trial. *Neurobiol Aging.* 2011;32(11):2103-5.

Toth M, Sohail A, Fridman R. Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. *Methods Mol Biol.* 2012;878:121-35.

Tournas JA, Lin FH, Burch JA, Selim MA, Monteiro-Riviere NA, Zielinski JE, et al. Ubiquinone, idebenone, and kinetin provide ineffective photoprotection to skin when compared to a topical antioxidant combination of vitamins C and E with ferulic acid. *J Invest Dermatol.* 2006;126(5):1185-7.

- Tran SL, Haferkamp S, Scurr LL, Gowrishankar K, Becker TM, Desilva C, et al. Absence of distinguishing senescence traits in human melanocytic nevi. *J Invest Dermatol.* 2012;132(9):2226-34.
- Tsui HS, Pham NVB, Amer BR, Bradley MC, Gosschalk JE, Gallagher-Jones M, et al. Human COQ10A and COQ10B are distinct lipid-binding START domain proteins required for coenzyme Q function. *J Lipid Res.* 2019;60(7):1293-310.
- Tsukahara K, Takema Y, Moriwaki S, Fujimura T, Imokawa G. Dermal fluid translocation is an important determinant of the diurnal variation in human skin thickness. *Br J Dermatol.* 2001;145(4):590-6.
- Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, et al. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature.* 2002;415(6867):45-53.
- Ungvari Z, Bailey-Downs L, Sosnowska D, Gautam T, Koncz P, Losonczy G, et al. Vascular oxidative stress in aging: a homeostatic failure due to dysregulation of NRF2-mediated antioxidant response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(2):H363-72.
- United Nations. Department of Economic and Social Affairs, Population Division. Living arrangements of older persons around the world [Internet]. New York: United Nations; 2019 [cited 2022 aug 02]. Available from: [https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pdf/files/files/documents/2020/Jan/un\\_2019\\_factsheet2.pdf](https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pdf/files/files/documents/2020/Jan/un_2019_factsheet2.pdf)
- United Nations. Department of Economic and Social Affairs, Population Division. World population ageing 2020 highlights: living arrangements of older persons. New York: United Nations; 2020 [cited 2022 aug 02]. Available from: [https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pdf/files/undesa\\_pd-2020\\_world\\_population\\_ageing\\_highlights.pdf](https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pdf/files/undesa_pd-2020_world_population_ageing_highlights.pdf)
- van Heemst D, Mooijaart SP, Beekman M, Schreuder J, Craen AJ, Brandt BW, et al. Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality. *Exp Gerontol.* 2005;40(1-2):11-5.
- Vander-Ark A, Cao J, Li X. TGF- $\beta$  receptors: In and beyond TGF- $\beta$  signaling. *Cell Signal.* 2018;52:112-20.
- Vergilio MM, Vasques LI, Leonardi GR. Characterization of skin aging through high-frequency ultrasound imaging as a technique for evaluating the effectiveness of anti-aging products and procedures: a review. *Skin Res Technol.* 2021;27(5):966-73.
- Vidal BC, Mello ML, Pimentel ER. Polarization microscopy and microspectrophotometry of Sirius Red, Picrosirius and Chlorantine Fast Red aggregates and of their complexes with collagen. *Histochem J.* 1982;14(6):857-78.
- Villanueva C, Kross RD. Antioxidant-induced stress. *Int J Mol Sci.* 2012;13(2):2091-109.
- Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 2000;14(17):2123-33.

- Waller JM, Maibach HI. Age and skin structure and function, a quantitative approach (I): blood flow, pH, thickness, and ultrasound echogenicity. *Skin Res Technol.* 2005;11(4):221-35.
- Wang D, Wang T, Li Z, Guo Y, Granato D. Green tea polyphenols upregulate the nrf2 signaling pathway and suppress oxidative stress and inflammation markers in D-galactose-induced liver aging in mice. *Front Nutr.* 2022;9:836112.
- Wati SM, Matsumaru D, Motohashi H. NRF2 pathway activation by KEAP1 inhibition attenuates the manifestation of aging phenotypes in salivary glands. *Redox Biol.* 2020;36:101603.
- Weber C, Bysted A, Holmer G: Intestinal absorption of coenzyme Q 10 administered in a meal or as capsules to healthy subjects. *Nutr Res.* 1997;17: 941-5.
- Wood LC, Elias PM, Calhoun C, Tsai JC, Grunfeld C, Feingold KR. Barrier disruption stimulates interleukin-1 alpha expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis. *J Invest Dermatol.* 1996;106(3):397-403.
- Wood ZA, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science.* 2003;300(5619):650-3.
- Xu DT, Yan JN, Cui Y, Liu W. Quantifying facial skin erythema more precisely by analyzing color channels of The VISIA Red images. *J Cosmet Laser Ther.* 2016;18(5):296-300.
- Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, Weigand BM, Palmer AK, Weivoda MM, et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med.* 2018;24(8):1246-56.
- Yang G, Seok JK, Kang HC, Cho YY, Lee HS, Lee JY. Skin barrier abnormalities and immune dysfunction in atopic dermatitis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):2867.
- Yarosz EL, Chang CH. The role of reactive oxygen species in regulating T cell-mediated immunity and disease. *Immune Netw.* 2018;18(1):e14.
- Yates MS, Tauchi M, Katsuoka F, Flanders KC, Liby KT, Honda T, et al. Pharmacodynamic characterization of chemopreventive triterpenoids as exceptionally potent inducers of Nrf2-regulated genes. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(1):154-62.
- Yilmaz E, Borchert HH. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema--an in vivo study. *Int J Pharm.* 2006;307(2):232-8.
- Yoshida Y, Kang K, Berger M, Chen G, Gilliam AC, Moser A, et al. Monocyte induction of IL-10 and down-regulation of IL-12 by iC3b deposited in ultraviolet-exposed human skin. *J Immunol.* 1998;161(11):5873-9.
- Yu C, Xiao JH. The Keap1-Nrf2 system: a mediator between oxidative stress and aging. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:6635460.
- Yuan H, Xu Y, Luo Y, Wang NX, Xiao JH. Role of Nrf2 in cell senescence regulation. *Mol Cell Biochem.* 2021;476(1):247-59.

Zhang D, Yan B, Yu S, Zhang C, Wang B, Wang Y, et al. Coenzyme Q10 inhibits the aging of mesenchymal stem cells induced by D-galactose through Akt/mTOR signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:867293.

Zhang M, Dang L, Guo F, Wang X, Zhao W, Zhao R. Coenzyme Q(10) enhances dermal elastin expression, inhibits IL-1 $\alpha$  production and melanin synthesis in vitro. *Int J Cosmet Sci*. 2012;34(3):273-9.

Zhang Y, Aberg F, Appelkvist EL, Dallner G, Ernster L. Uptake of dietary coenzyme Q supplement is limited in rats. *J Nutr*. 1995;125(3):446-53.

Zhao Y, Wu L, Yue X, Zhang C, Wang J, Li J, et al. A polymorphism in the tumor suppressor p53 affects aging and longevity in mouse models. *Elife*. 2018;7:e34701.

Zhuang Y, Lyga J. Inflammaging in skin and other tissues - the roles of complement system and macrophage. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2014;13(3):153-61.

Žmitek K, Pogačnik T, Mervic L, Žmitek J, Pravst I. The effect of dietary intake of coenzyme Q10 on skin parameters and condition: Results of a randomised, placebo-controlled, double-blind study. *Biofactors*. 2017;43(1):132-40.

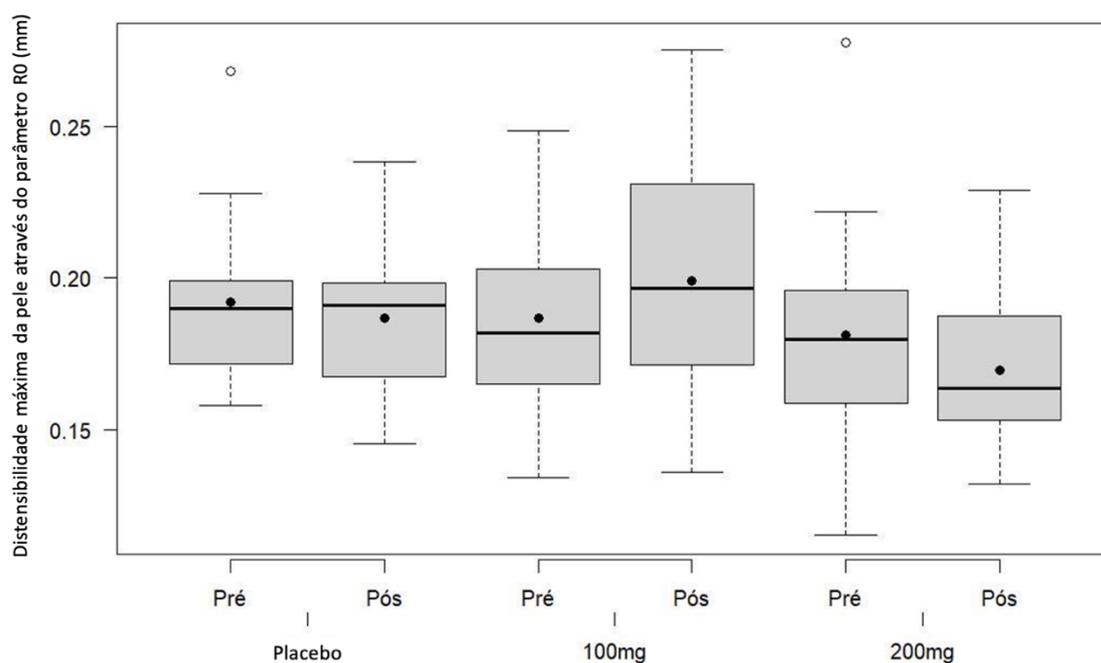
Žmitek K, Žmitek J, Rogl Butina M, Pogačnik T. Effects of a Combination of Water-Soluble CoenzymeQ10 and Collagen on Skin Parameters and Condition:Results of a Randomised, Placebo-Controlled, Double-Blind Study. *Nutrients*. 2020;12(3):618.

Zs-Nagy I, Steiber J, Jeney F. Induction of age pigment accumulation in the brain cells of young male rats through iron-injection into the cerebrospinal fluid. *Gerontology*. 1995;41(Suppl 2):145-58.

Zuo L, Prather ER, Stetskiv M, Garrison DE, Meade JR, Peace TI, Zhou T. Inflammaging and Oxidative Stress in Human Diseases: From Molecular Mechanisms to Novel Treatments. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4472.

## APÊNDICES

APÊNDICE A - *Boxplot* evidenciando o parâmetro de viscoelasticidade R0, que representa distensibilidade máxima da pele, em milímetros, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



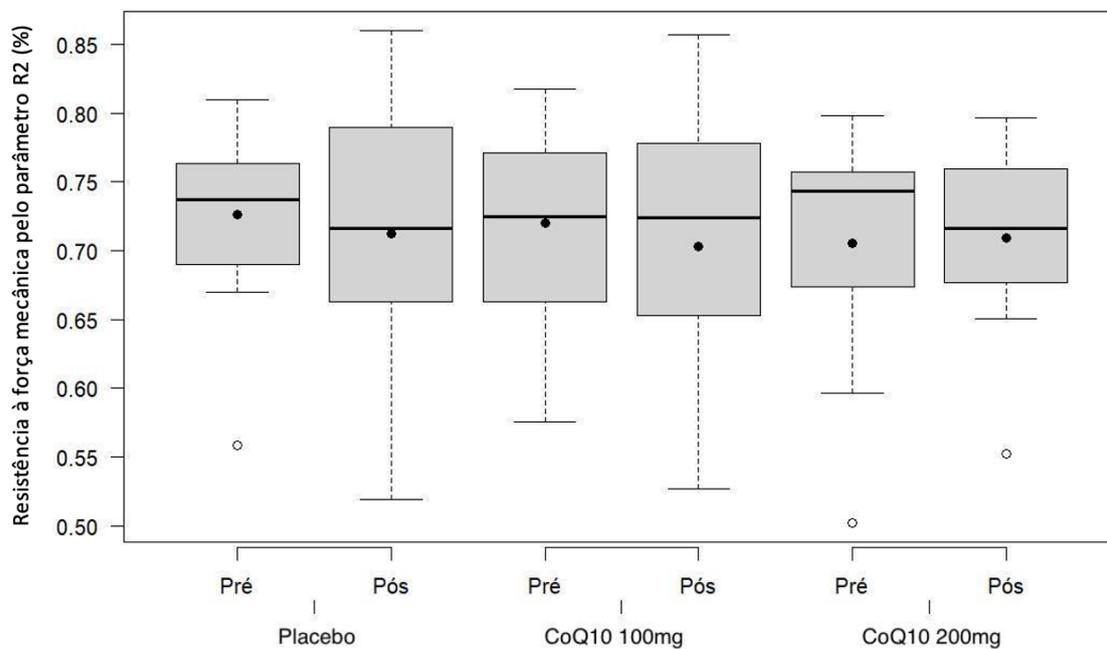
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE B - Diferença entre médias do parâmetro de viscoelasticidade R0, que representa distensibilidade máxima da pele, em milímetros, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

Suplemento	Comparação entre Tempos	Diferença	IC(95%)		EP	GL	Valor t	p-valor
<b>PLACEBO</b>	PÓS - PRÉ	-0.006	-0.024	0.013	0.009	36	-0.6	0.5542
100MG	PÓS - PRÉ	0.012	-0.006	0.030	0.009	36	1.36	0.1819
200MG	PÓS - PRÉ	-0.012	-0.029	0.006	0.009	36	-1.35	0.1866

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE C - *Boxplot* evidenciando o parâmetro de viscoelasticidade R2, que representa a resistência à força mecânica, em percentual, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



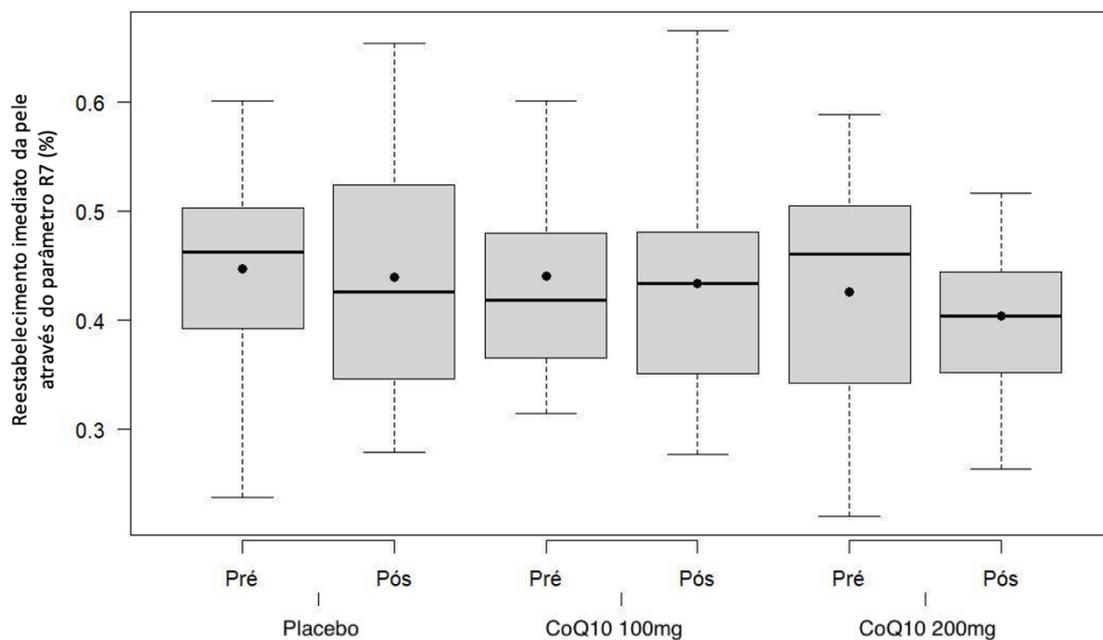
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE D - Diferença entre médias do parâmetro de viscoelasticidade R2, que representa a resistência à força mecânica, em percentual, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

Suplemento	Comparação entre Tempos		Diferença	IC(95%)		EP	GL	Valor t	p-valor
<b>PLACEBO</b>	PÓS	- PRÉ	-0.011	-0.039	0.018	0.014	36	-0.76	0.4529
100MG	PÓS	- PRÉ	-0.017	-0.045	0.010	0.014	36	-1.28	0.2091
200MG	PÓS	- PRÉ	0.004	-0.023	0.030	0.013	36	0.28	0.7774

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE E - *Boxplot* evidenciando o parâmetro de viscoelasticidade R7, que representa o restabelecimento imediato da pele após sucção, em percentual, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



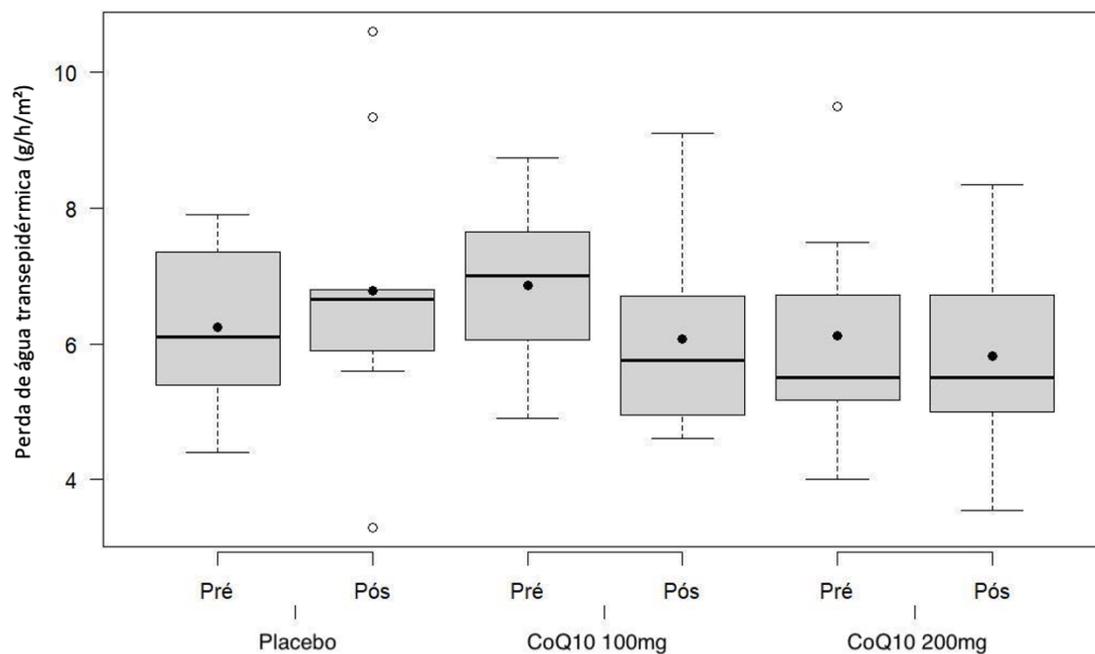
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE F - Diferença entre médias do parâmetro de viscoelasticidade R7, que representa o restabelecimento imediato da pele após sucção, em percentual, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

<b>Suplemento</b>	<b>Comparação entre Tempos</b>	<b>Diferença</b>	<b>IC(95%)</b>		<b>EP</b>	<b>GL</b>	<b>Valor t</b>	<b>p-valor</b>
PLACEBO	PÓS - PRÉ	-0.006	-0.042	0.029	0.018	36	-0.37	0.7157
100MG	PÓS - PRÉ	-0.006	-0.040	0.029	0.017	36	-0.35	0.7289
200MG	PÓS - PRÉ	-0.022	-0.055	0.011	0.016	36	-1.34	0.1896

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE G - *Boxplot* evidenciando a perda de água transepidermica ou *transepidermal water loss* (TEWL), em  $\text{g/h/m}^2$ , nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=10), CoQ10 100mg (n=10) e CoQ10 200mg (n=11)

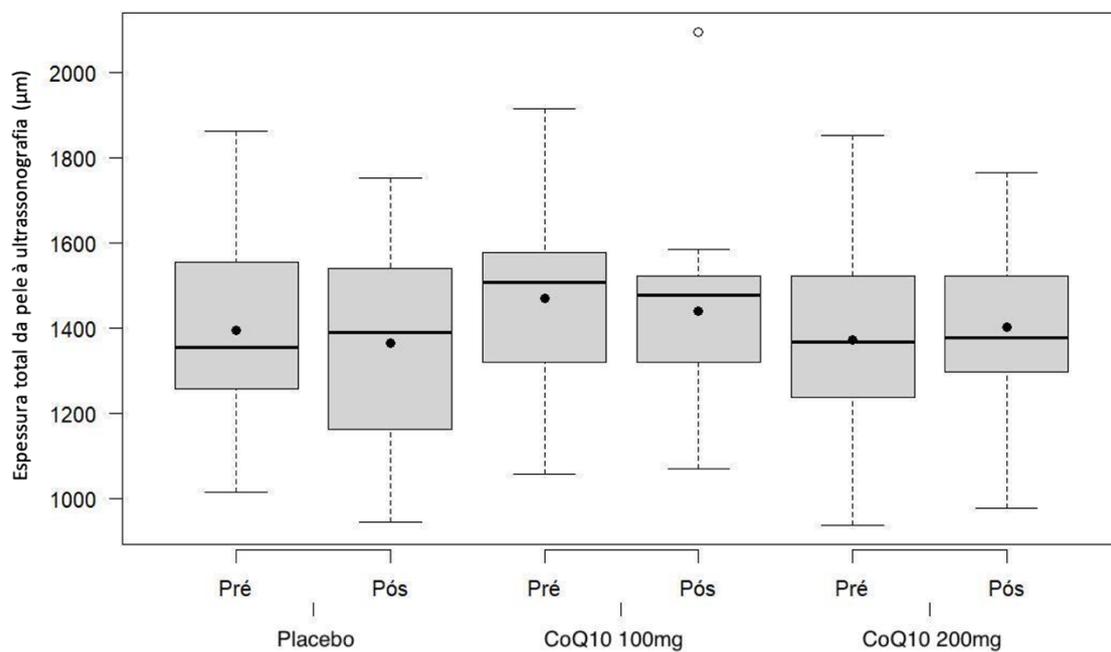


Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE H - Diferença entre médias das medidas de perda de água transepidérmica ou *transepidermal water loss* (TEWL), em g/h/m<sup>2</sup>, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

Suplemento	Comparação entre Tempos	Diferença	IC(95%)		EP	GL	Valor t	p-valor
AMIDO	PÓS - PRÉ	0.537	-0.390	1.464	0.453	28	1.19	0.2456
100MG	PÓS - PRÉ	-0.795	-1.733	0.143	0.458	28	-1.74	0.0935
200MG	PÓS - PRÉ	-0.291	-1.185	0.603	0.437	28	-0.67	0.5106

APÊNDICE I - *Boxplot* evidenciando a espessura total da pele à USG, incluindo epiderme e derme total, em micrômetros, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



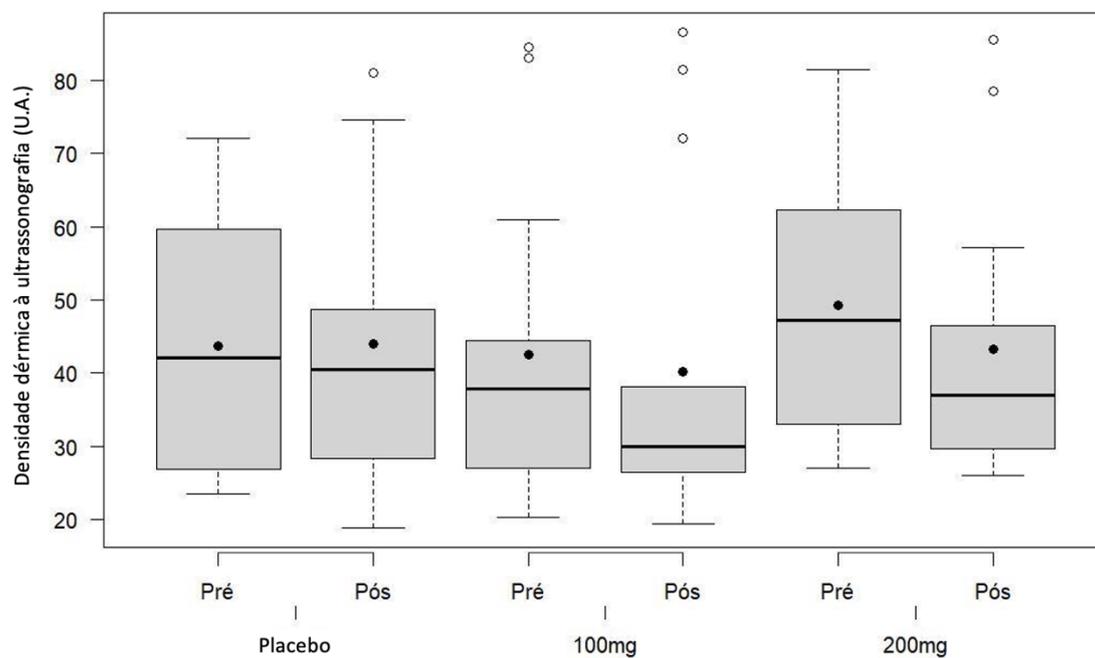
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE J - Diferença entre médias de espessura total da pele à USG, incluindo epiderme e derme total, em micrômetros, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

<b>Suplemento</b>	<b>Comparação entre Tempos</b>	<b>Diferença</b>	<b>IC(95%)</b>		<b>EP</b>	<b>GL</b>	<b>Valor t</b>	<b>p-valor</b>
AMIDO	PÓS - PRÉ	-17.099	-88.635	54.437	35.306	37	-0.48	0.631
100MG	PÓS - PRÉ	-28.769	-100.480	42.944	35.393	37	-0.81	0.4215
200MG	PÓS - PRÉ	29.929	-39.176	99.033	34.105	37	0.88	0.3859

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE K - *Boxplot* evidenciando a densidade dérmica à USG, em unidades arbitrárias (U.A.), nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



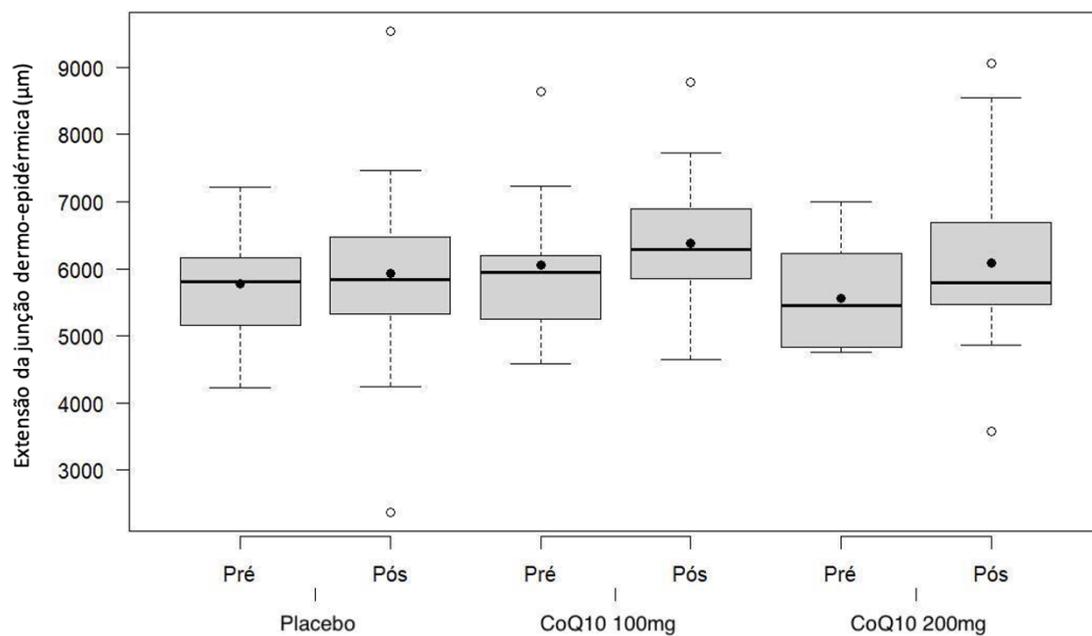
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE L - Diferença entre médias de densidade dérmica à USG, em unidades arbitrárias (U.A.), pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

<b>Suplemento</b>	<b>Comparação entre Tempos</b>	<b>Diferença</b>	<b>IC(95%)</b>		<b>EP</b>	<b>GL</b>	<b>Valor t</b>	<b>p-valor</b>
AMIDO	PÓS - PRÉ	-0.747	-6.723	5.230	2.947	36	-0.25	0.8015
100MG	PÓS - PRÉ	-2.325	-8.318	3.667	2.955	36	-0.79	0.4364
200MG	PÓS - PRÉ	-4.413	-10.390	1.564	2.947	36	-1.5	0.143

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE M - *Boxplot* evidenciando a extensão da junção dermo-epidérmica (JDE), medida em micrômetros, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



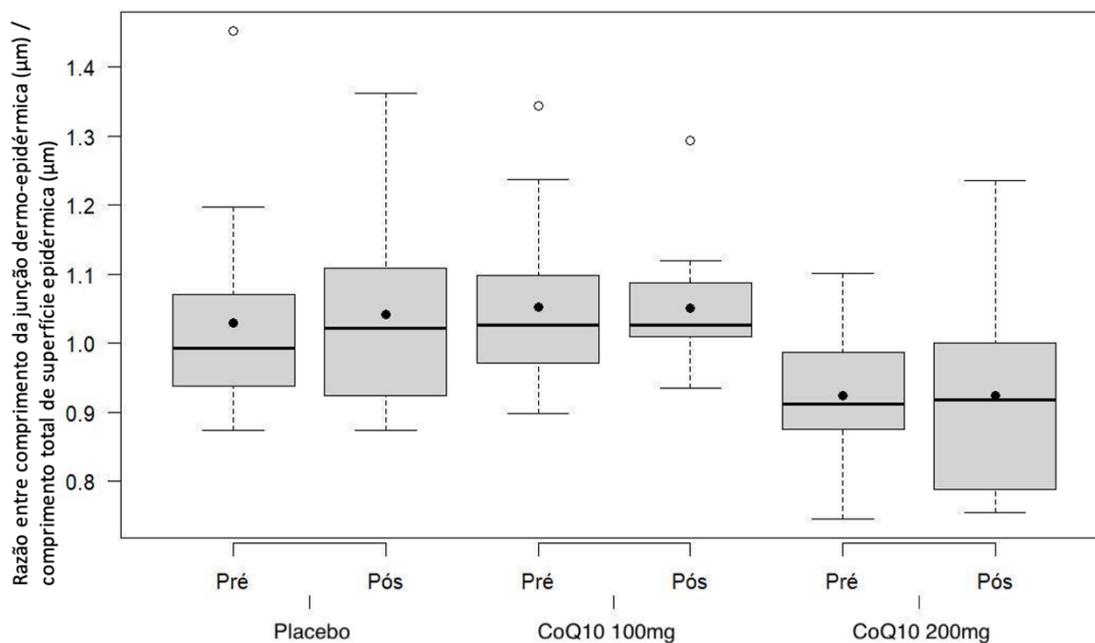
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE N - Diferença entre médias da extensão da junção dermo-epidérmica (JDE), medida em micrômetros, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

<b>Suplemento</b>	<b>Comparação entre Tempos</b>	<b>Diferença</b>	<b>IC(95%)</b>		<b>EP</b>	<b>GL</b>	<b>Valor t</b>	<b>p-valor</b>
AMIDO	PÓS - PRÉ	138.1	-639.99	916.19	384.02	37	0.36	0.7212
100MG	PÓS - PRÉ	323.15	-465.02	1111.33	388.99	37	0.83	0.4114
200MG	PÓS - PRÉ	516.79	-242.72	1276.29	374.84	37	1.38	0.1763

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE O - *Boxplot* evidenciando a razão entre os comprimentos da junção dermo-epidérmica (JDE), em micrômetros, e da superfície da epiderme, em micrômetros, pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



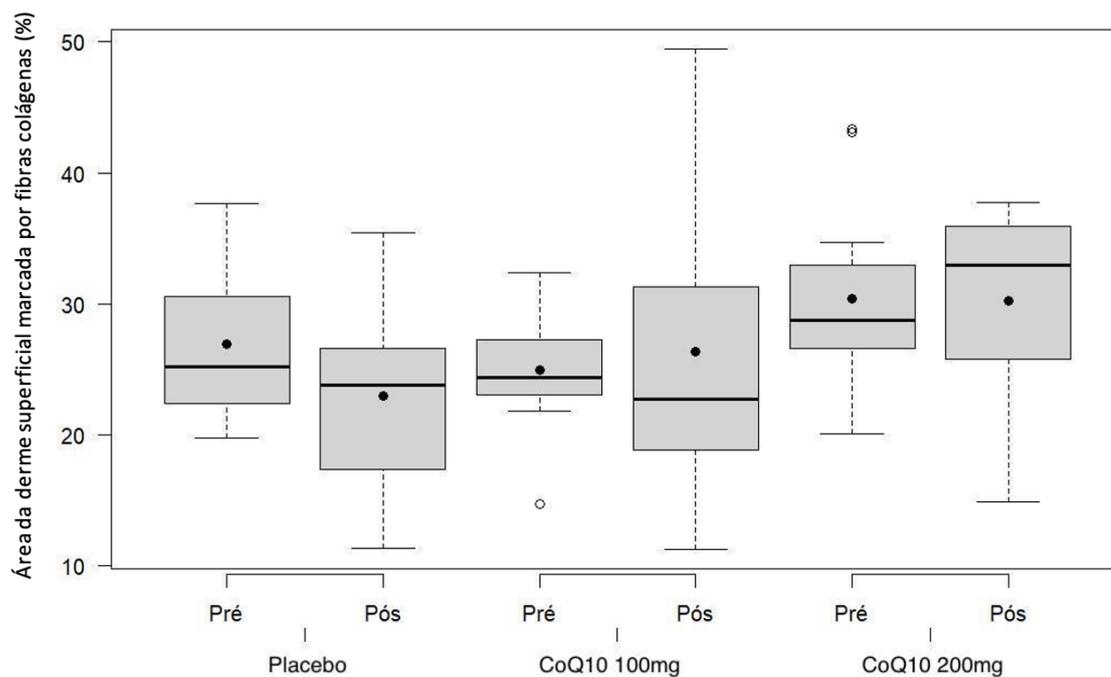
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE P - Diferença entre médias da razão entre o comprimento da junção dermo-epidérmica (JDE), em micrômetros, e da superfície da epiderme, em micrômetros, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

<b>Suplemento</b>	<b>Comparação entre Tempos</b>	<b>Diferença</b>	<b>IC(95%)</b>		<b>EP</b>	<b>GL</b>	<b>Valor t</b>	<b>p-valor</b>
AMIDO	PÓS - PRÉ	0.008	-0.056	0.073	0.032	37	0.26	0.7927
100MG	PÓS - PRÉ	-0.001	-0.066	0.064	0.032	37	-0.03	0.9726
200MG	PÓS - PRÉ	0.000	-0.063	0.063	0.031	37	0	0.9969

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE Q - *Boxplot* evidenciando o percentual da área da derme superficial marcada por fibras colágenas, pela coloração de picrosirius vermelho sem polarização, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



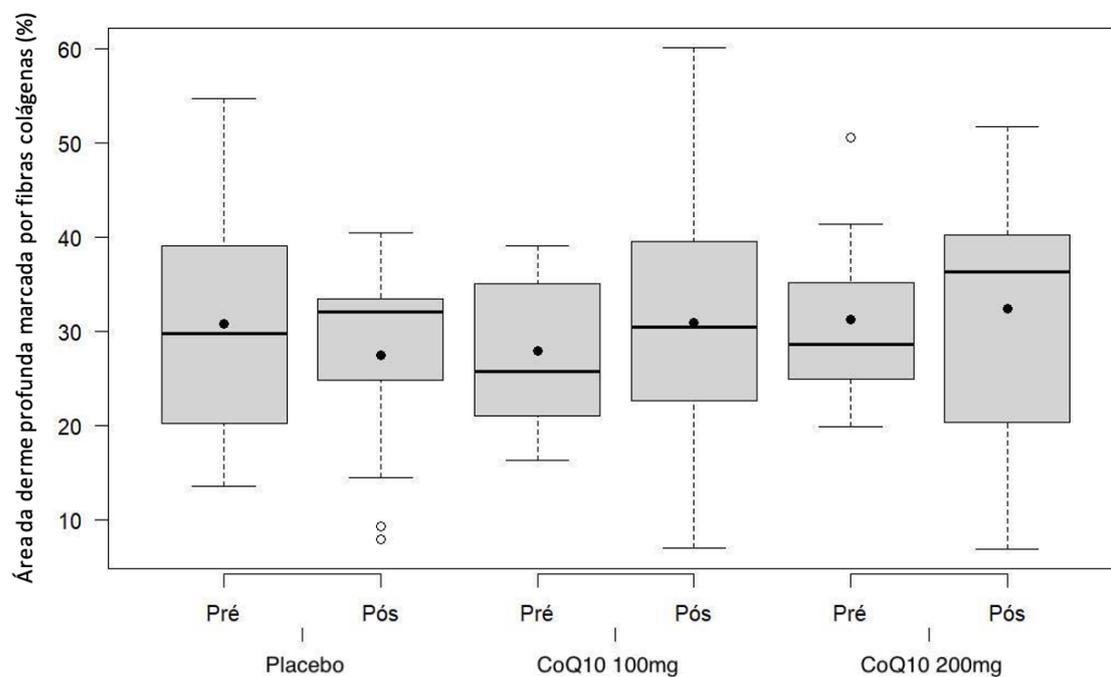
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE R - Diferença entre médias do percentual da área da derme superficial marcada por picosirius vermelho sem polarização, que evidencia fibras colágenas, nos tempos pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

Suplemento	Comparação		Diferença	IC(95%)		EP	GL	Valor t	p-valor
	entre Tempos								
AMIDO	PÓS	- PRÉ	-3.933	-8.947	1.080	2.474	37	-1.59	0.1204
100MG	PÓS	- PRÉ	1.362	-3.718	6.443	2.507	37	0.54	0.5902
200MG	PÓS	- PRÉ	-0.226	-5.122	4.669	2.416	37	-0.09	0.9258

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE S - *Boxplot* evidenciando o percentual da área da derme profunda marcada por fibras colágenas, pela coloração de picrosirius vermelho sem polarização, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



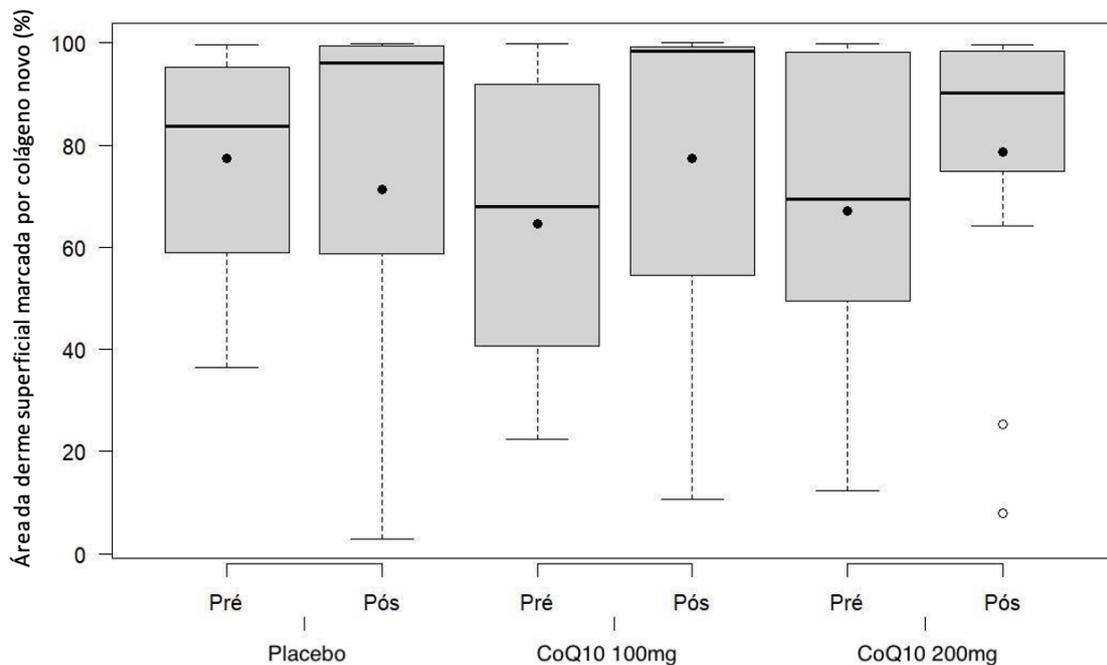
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE T - Diferença entre médias do percentual da área da derme profunda marcada por picosirius vermelho sem polarização, que evidencia fibras colágenas, nos tempos pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

<b>Suplemento</b>	<b>Comparação entre Tempos</b>	<b>Diferença</b>	<b>IC(95%)</b>		<b>EP</b>	<b>GL</b>	<b>Valor t</b>	<b>p-valor</b>
AMIDO	PÓS - PRÉ	-3.316	-11.357	4.725	3.969	37	-0.84	0.4088
100MG	PÓS - PRÉ	2.948	-5.214	11.109	4.028	37	0.73	0.4689
200MG	PÓS - PRÉ	1.165	-6.700	9.030	3.882	37	0.3	0.7658

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE U - *Boxplot* evidenciando o percentual da área da derme superficial marcada por colágeno novo, pela coloração de picosirius vermelho com polarização, nos tempos pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



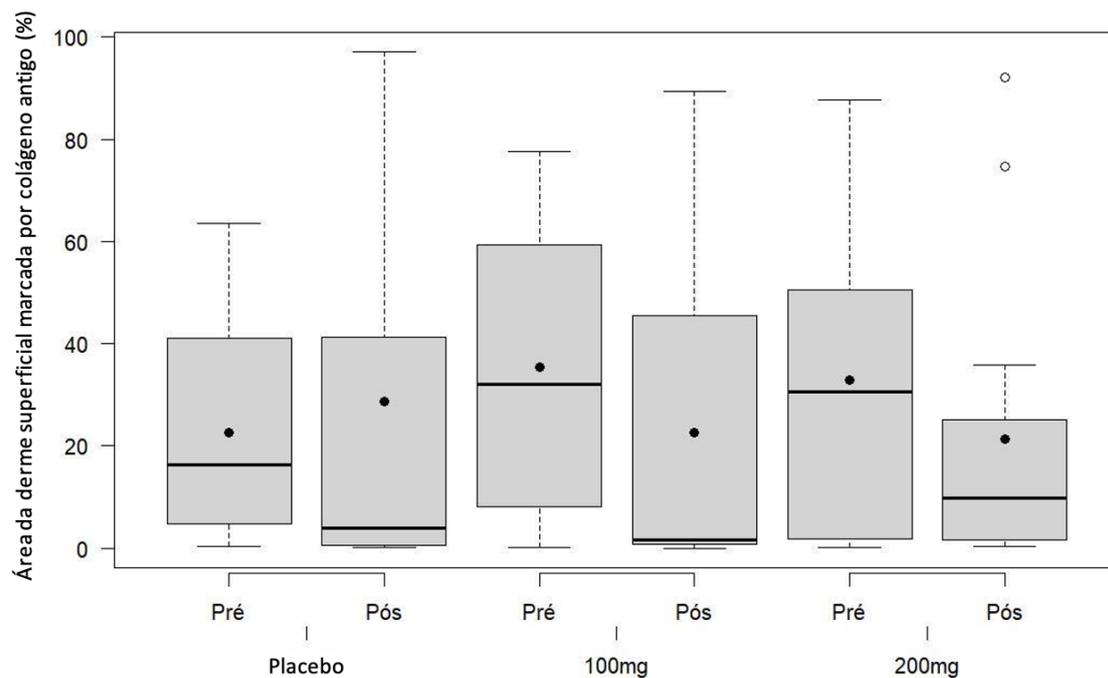
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE V - Diferença entre médias do percentual da área da derme superficial marcada por colágeno novo, pela coloração de picrosirius vermelho com polarização, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

<b>Suplemento</b>	<b>Comparação entre Tempos</b>	<b>Diferença</b>	<b>IC(95%)</b>		<b>EP</b>	<b>GL</b>	<b>Valor t</b>	<b>p-valor</b>
AMIDO	PÓS - PRÉ	-5.724	-25.869	14.420	9.942	37	-0.58	0.5683
100MG	PÓS - PRÉ	12.911	-7.493	33.314	10.070	37	1.28	0.2078
200MG	PÓS - PRÉ	11.616	-8.045	31.278	9.704	37	1.2	0.2389

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE W - *Boxplot* evidenciando o percentual da área da derme superficial marcada por colágeno antigo, pela coloração de picosirius vermelho com polarização, pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=13), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE X - Diferença entre médias do percentual da área da derme superficial marcada por colágeno antigo, pela coloração de picrosirius vermelho com polarização, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

<b>Suplemento</b>	<b>Comparação entre Tempos</b>	<b>Diferença</b>	<b>IC(95%)</b>		<b>EP</b>	<b>GL</b>	<b>Valor t</b>	<b>p-valor</b>
AMIDO	PÓS - PRÉ	5.724	-14.420	25.869	9.942	37	0.58	0.5683
100MG	PÓS - PRÉ	-12.911	-33.314	7.493	10.070	37	-1.28	0.2078
200MG	PÓS - PRÉ	-11.616	-31.278	8.045	9.704	37	-1.2	0.2389

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE Y - Resultados dos parâmetros bioquímicos séricos analisados em cada grupo, no período pré e pós suplementação. Os valores estão expressos em média e desvio padrão (DP)

Variável	Tempo	Amido			CoQ10 100 mg			CoQ10 200 mg		
		n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP
APO A1 (mg/dL)	Pré	14	176,929	26,069	13	189,846	29,277	14	172	25,477
	Pós	13	159,077	18,127	13	182,077	26,566	14	153,143	24,688
APO B (mg/dL)	Pré	14	115,421	20,248	13	102,015	26,83	14	108,936	17,46
	Pós	13	115,392	21,119	13	107,469	17,282	14	108,114	17,856
LIPO A (nmol/L)	Pré	13	67,692	112,777	13	71,231	99,855	13	38,308	46,212
	Pós	13	60,846	103,534	13	69,231	87,19	14	45,143	55,901
ALT (U/L)	Pré	14	15,929	5,622	13	17,692	4,07	14	17,214	5,087
	Pós	14	15,857	4,33	13	20,077	6,344	14	18,143	8,264
AST (U/L)	Pré	14	17,714	5,757	13	18,538	4,789	14	16,429	3,673
	Pós	14	17,786	3,906	13	20,308	4,191	14	17,571	3,524
GGT (U/L)	Pré	14	23,643	14,031	13	20,538	6,253	14	22,286	8,371
	Pós	14	25,857	18,157	13	22,231	7,715	14	22,357	10,097
FA (U/L)	Pré	13	79,231	17,055	13	67,846	25,638	14	68,5	12,101
	Pós	13	77,615	14,609	13	68,615	19,94	14	64,571	9,581
BI (mg/dL)	Pré	14	0,324	0,242	13	0,202	0,103	14	0,264	0,138
	Pós	13	0,333	0,296	13	0,232	0,102	14	0,268	0,154
BD (mg/dL)	Pré	14	0,234	0,13	13	0,174	0,046	14	0,205	0,062
	Pós	13	0,241	0,135	13	0,188	0,048	14	0,204	0,059
BT (mg/dL)	Pré	14	0,557	0,369	13	0,376	0,144	14	0,469	0,195
	Pós	13	0,574	0,427	13	0,419	0,145	14	0,472	0,21
UR (mg/dL)	Pré	14	31,857	9,494	13	34,538	7,568	14	33,929	9,747
	Pós	14	30,857	10,904	13	36,308	8,616	14	33,786	6,518
CR (mg/dL)	Pré	14	0,7	0,133	13	0,733	0,089	14	0,704	0,136

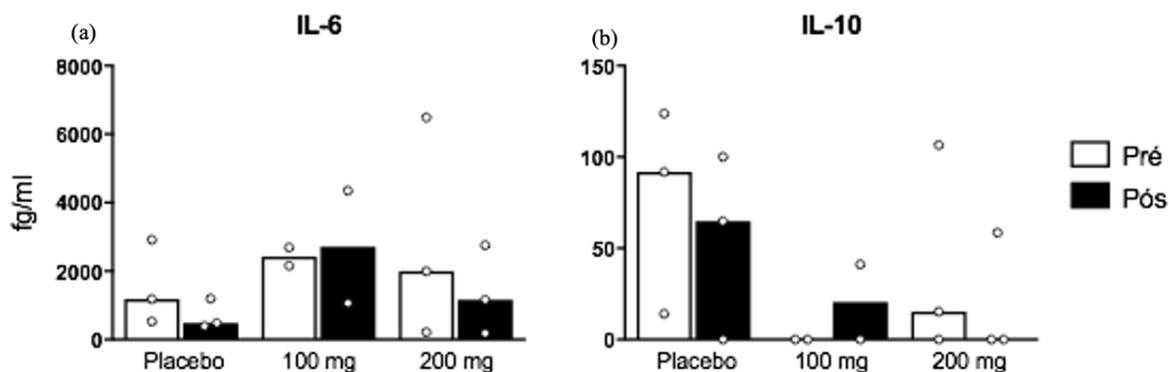
Variável	Tempo	Amido			CoQ10 100 mg			CoQ10 200 mg		
		n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP
	Pós	14	0,716	0,148	13	0,733	0,052	14	0,675	0,098
GLI (mg/dL)	Pré	14	93,714	32,946	13	78,923	11,317	14	83,429	11,732
	Pós	14	94,714	30,183	13	82,462	11,155	14	82,643	10,653
INSUL (μU/mL)	Pré	14	10	3,58	13	10,038	3,577	13	14,015	11,472
	Pós	13	10,562	5,103	13	11,592	5,158	14	12,143	6,438
HBA1C (%)	Pré	14	6,036	1,345	13	5,608	0,617	14	5,386	0,33
	Pós	14	5,957	1,372	13	5,615	0,713	14	5,329	0,345
HB (g/dL)	Pré	14	13,543	1,023	13	13,562	1,286	14	13,936	0,763
	Pós	14	13,486	1,091	13	13,562	0,964	14	13,743	0,844
HT (%)	Pré	14	40,5	2,997	13	40,654	2,898	14	41,564	2,341
	Pós	14	39,943	3,337	13	40,685	2,286	14	40,8	2,149
LEUCO (mil/mm <sup>3</sup> )	Pré	14	6,44	1,578	13	5,645	1,357	14	6,698	2,175
	Pós	14	6,421	1,259	13	6,192	1,104	14	6,322	1,965
NEUTRO (mil/mm <sup>3</sup> )	Pré	14	3,549	0,998	13	3,055	0,997	14	3,82	1,554
	Pós	14	3,469	0,768	13	3,419	0,849	14	3,544	1,432
EOS (mil/mm <sup>3</sup> )	Pré	14	0,14	0,082	13	0,144	0,091	14	0,126	0,077
	Pós	14	0,131	0,086	13	0,157	0,085	14	0,15	0,07
BASO (mil/mm <sup>3</sup> )	Pré	14	0,032	0,017	13	0,032	0,013	14	0,031	0,019
	Pós	14	0,035	0,025	13	0,039	0,014	14	0,029	0,014
LINFO (mil/mm <sup>3</sup> )	Pré	14	2,213	0,758	13	1,975	0,447	14	2,194	0,975
	Pós	14	2,317	0,785	13	2,109	0,453	14	2,098	0,915
MONO (mil/mm <sup>3</sup> )	Pré	14	0,506	0,138	13	0,44	0,12	14	0,527	0,21
	Pós	14	0,694	0,786	13	0,468	0,139	14	0,502	0,212
PLQ (mil/mm <sup>3</sup> )	Pré	14	254,714	36,979	13	253,846	43,944	14	232,214	53,786
	Pós	14	249,357	33,621	13	272,615	50,150	14	233,785	48,939
COL (mg/dL)	Pré	14	216,071	27,139	13	202,769	38,717	14	205,643	20,883
	Pós	13	212,308	37,252	13	212,615	35,25	14	199,786	29,699

Variável	Tempo	Amido			CoQ10 100 mg			CoQ10 200 mg		
		n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP
COL NAO-HDL (mg/dL)	Pré	14	156,786	31,716	13	137,308	36,723	14	147,143	22,685
	Pós	13	155,462	33,972	13	146,923	30,625	14	144,286	28,784
HDL (mg/dL)	Pré	14	59,286	13,035	13	65,462	15,349	14	58,5	14,821
	Pós	13	56,846	11,216	13	65,692	14,273	14	55,5	13,288
LDL (mg/dL)	Pré	14	132,571	23,761	13	114,231	33,402	14	125,071	21,858
	Pós	13	133,538	32,564	13	121,231	27,572	14	123,429	27,394
VLDL (mg/dL)	Pré	14	24,214	8,622	13	23,077	5,823	14	22,143	5,112
	Pós	13	21,923	5,22	13	25,769	8,398	14	20,429	5,316
TGL (mg/dL)	Pré	14	124,286	54,464	13	126,462	43,882	14	113	36,61
	Pós	13	111,692	40,432	13	143,769	67,902	14	100,571	40,563
PT (g/dL)	Pré	6	6,817	0,256	4	7,05	0,238	5	7,04	0,428
	Pós	10	6,62	0,278	9	7,033	0,642	11	6,8	0,486
ALB (g/dL)	Pré	6	4,433	0,151	4	4,625	0,275	5	4,48	0,286
	Pós	10	4,27	0,125	9	4,4	0,335	11	4,255	0,163
GLOB (g/dL)	Pré	6	2,383	0,293	4	2,425	0,506	5	2,56	0,329
	Pós	10	2,35	0,299	9	2,633	0,55	11	2,545	0,437

Legenda: APO A1: Apolipoproteína A1; APO B: Apolipoproteína B; LIPO A: Lipoproteína A; ALT: Alanina Aminotransferase; AST: Aspartato Aminotransferase; GGT: Gama Glutamil Transferase; FA: Fosfatase Alcalina; BI: Bilirrubina Indireta; BD: Bilirrubina Direta; BT: Bilirrubina Total; UR: Uréia; CR: Creatinina; GLI: Glicose; INSUL: Insulina; HBA1C: Hemoglobina Glicada; HB: Hemoglobina; HT: Hematócrito; LEUCO: Leucócitos; NEUTRO: Neutrófilos; EOS: Eosinófilos; BASO: Basófilos; LINFO: Linfócitos; MONO: Monócitos; PLQ: Plaquetas; COL: Colesterol Total; COL NÃO-HDL: Colesterol não-HDL; HDL: *High Density Level* Colesterol; LDL: *Low Density Level* Colesterol; VLDL: *Very Low Density Level* Colesterol; TGL: Triglicérides; PT: Proteínas Totais; ALB: Albumina; GLOB: Globulina.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

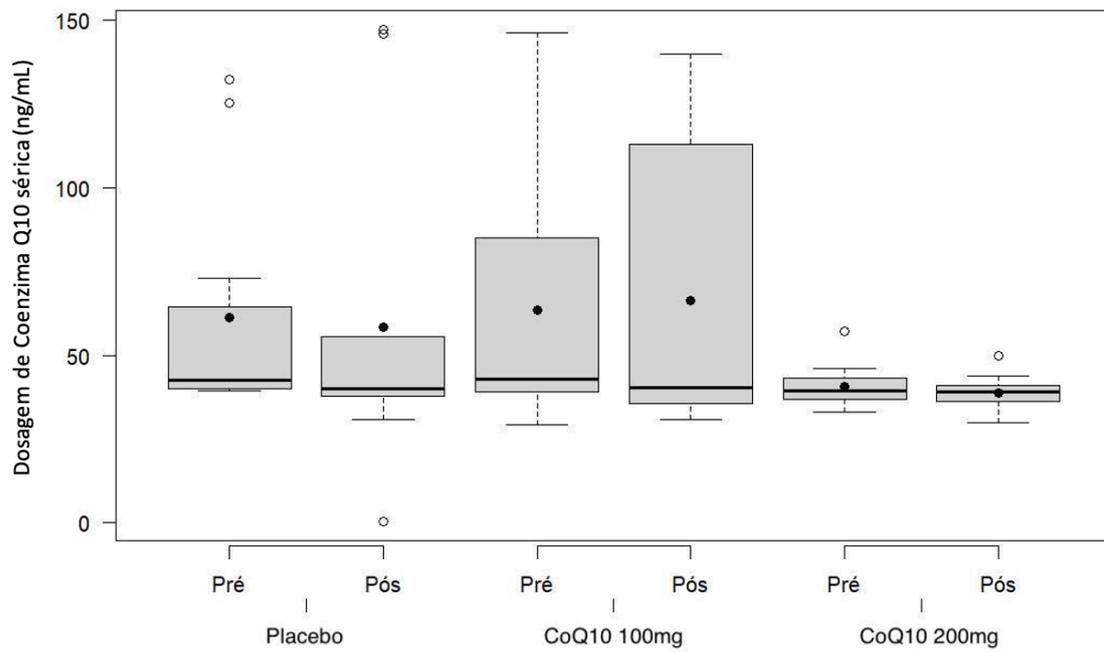
APÊNDICE Z - Níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias. Os níveis séricos de (a) IL-6 e (b) IL-10 foram avaliadas no período pré e pós suplementação oral, dos grupos placebo (n=3), CoQ10 100mg (n=2) e CoQ10 200mg (n=3) por citometria de fluxo, utilizando o método de *Cytometric bead array*



Legenda: Os pontos representam valores absolutos em fg/ml. A barra da coluna indica a mediana de cada grupo. Os limites de detecção utilizados foram: IL-6 = 68,4 fg/mL e IL-10 = 13,7 fg/mL.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE AA - *Boxplot* evidenciando dosagem de CoQ10 sérica, por ELISA, em ng/ml, nos tempos pré e pós suplementação, para os grupos placebo (n=10), CoQ10 100mg (n=13) e CoQ10 200mg (n=14)



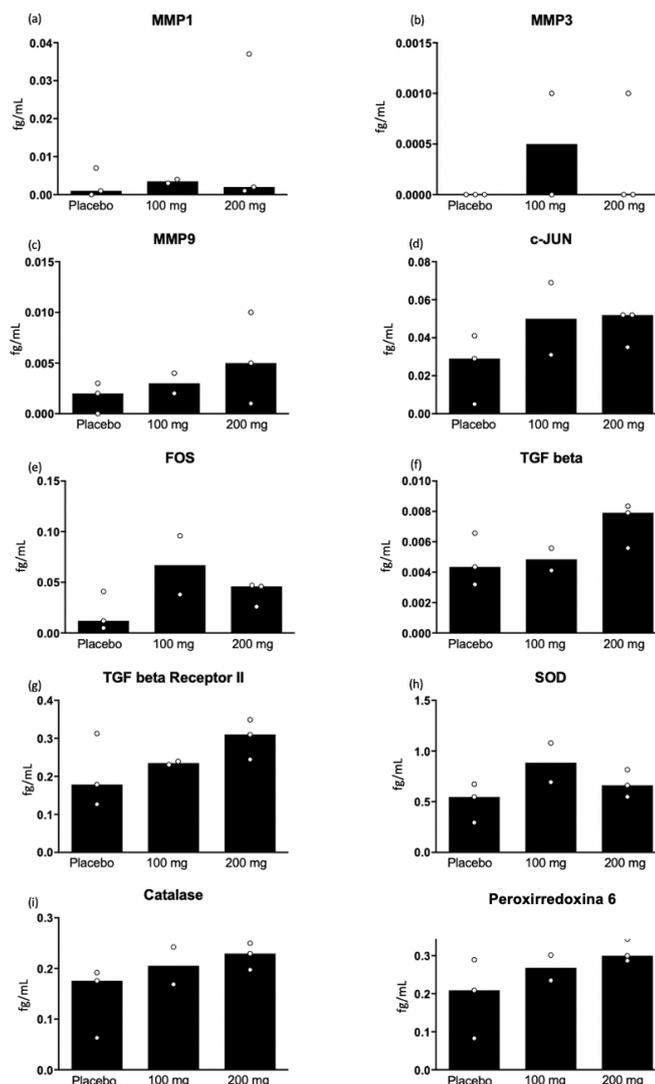
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE AB - Diferença entre médias da dosagem de CoQ10 sérica, por ELISA, em ng/ml, pré e pós suplementação, comparada nos grupos placebo, CoQ10 100mg e CoQ10 200mg

<b>Suplemento</b>	<b>Comparação entre Tempos</b>	<b>Diferença</b>	<b>IC(95%)</b>			<b>EP</b>	<b>GL</b>	<b>Valor t</b>	<b>p-valor</b>
AMIDO	PÓS - PRÉ	3,538	-6,926	14,003	5,149	34	0.69	0.4966	
100MG	PÓS - PRÉ	2,597	-6,604	11,799	4,528	34	0.57	0.57	
200MG	PÓS - PRÉ	-1,881	-10,748	6,986	4,363	34	-0.43	0.6691	

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE AC - Expressão de transcritos de RNAm na pele de participantes, por q-RT-PCR, de MMPs, proto-oncogenes e fatores antioxidantes, no período pós suplementação oral, comparada nos grupos placebo (n=3), CoQ10 100mg (n=2) e CoQ10 200mg (n=3)



Legenda: Os gráficos representam níveis de (a) metaloproteinase 1 (MMP-1); (b) metaloproteinase 3 (MMP-3); (c) metaloproteinase 9 (MMP-9); (d) ativador de proteína 1, fração c-JUN (AP-1, cJUN); (e) ativador de proteína 1, fração fos (AP-1, fos); (f) fator de crescimento tumoral beta (TGF-beta); (g) receptor II de TGF beta (TGF-BRII); (h) superóxido dismutase (SOD); (i) catalase; (j) peroxirredoxina 6. Os pontos representam valores absolutos em fg/ml. A barra da coluna indica a mediana de cada grupo. O limite de detecção variou de 0,5ng/mL a 180ng/mL, com sensibilidade de 0,23ng/mL.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE AD - Variáveis codificadas de 1 a 39 para utilização do coeficiente de Spearman

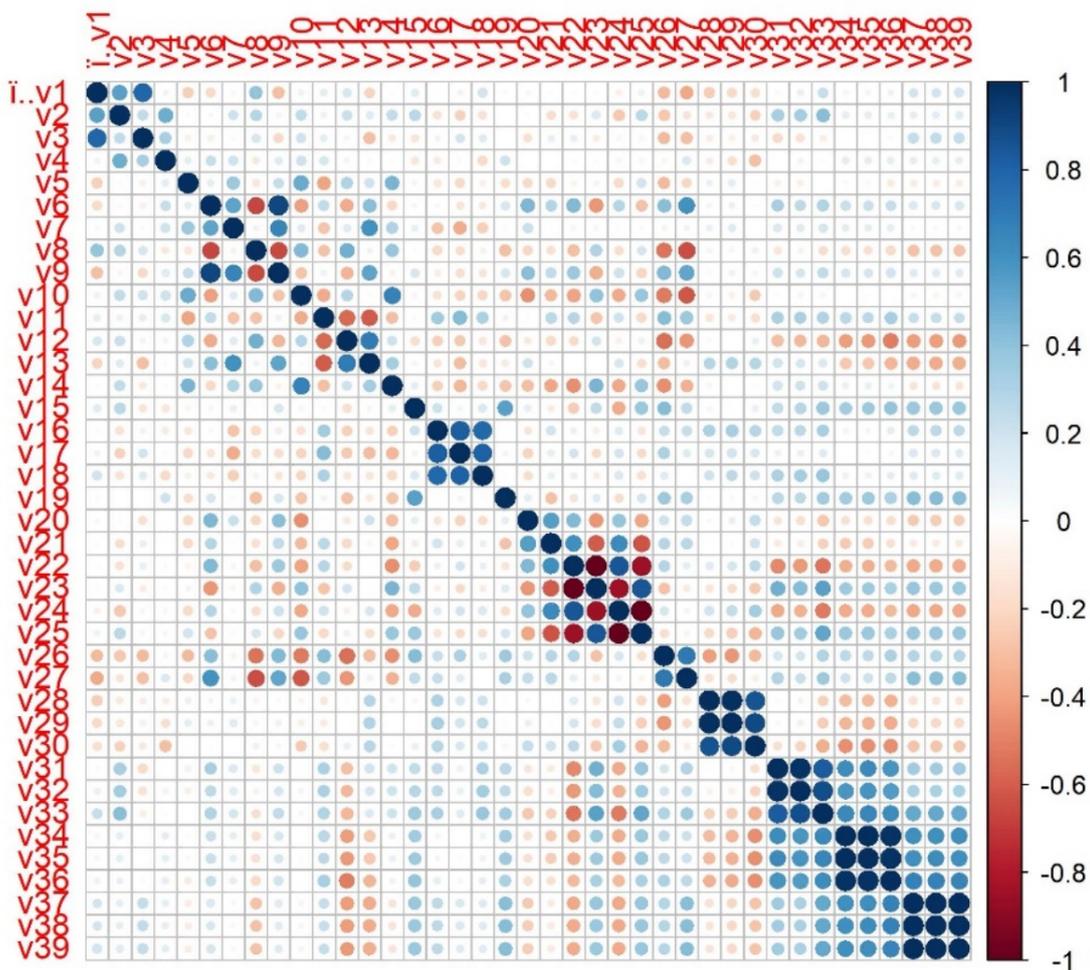
código	Variável
v1	área total de epiderme celular
v2	extensão da JDE
v3	Razão entre área de epiderme celular e superfície epidérmica
v4	Razão entre JDE e superfície epidérmica
v5	viscoelasticidade R0
v6	viscoelasticidade R2
v7	viscoelasticidade R5
v8	viscoelasticidade R6
v9	viscoelasticidade R7
v10	viscoelasticidade R9
v11	espessura total da pele à USG
v12	densidade dérmica à USG
v13	densidade dérmica automática à USG
v14	densidade da derme automática à USG
v15	TEWL

v16	classificação em 4 graus para p53
v17	classificação de Liang para p53
v18	percentual de núcleos epidérmicos positivos para p53
v19	dosagem de CoQ10 sérica (ELISA)
v20	percentual da área dérmica superficial marcada por picrosirius vermelho sem polarização
v21	percentual da área dérmica profunda marcada por picrosirius vermelho sem polarização
v22	percentual de área dérmica superficial de colágeno novo marcada por picrosirius vermelho polarizado
v23	percentual de área dérmica superficial de colágeno antigo marcada por picrosirius vermelho polarizado
v24	percentual de área dérmica profunda de colágeno novo marcada por picrosirius vermelho polarizado
v25	percentual de área dérmica profunda de colágeno antigo marcada por picrosirius vermelho polarizado
v26	percentual de área dérmica superficial de fibras elásticas coradas por Weigert
v27	percentual de área dérmica profunda de fibras elásticas marcadas por Weigert
v28	Intensidade da área da face marcada por vasos sanguíneos, através da estereofotogrametria
v29	percentual da área da face marcada por vasos sanguíneos, através da estereofotogrametria

v30	razão entre percentual da área da face marcada por vasos sanguíneos e a intensidade da marcação, através da estereofotogrametria
v31	Intensidade da área da face marcada por hiperpigmentações, através da estereofotogrametria
v32	percentual de área da face marcada por hiperpigmentações, através da estereofotogrametria
v33	razão entre percentual da área da face marcada por hiperpigmentações e a intensidade da marcação, através da estereofotogrametria
v34	intensidade da área cutânea superficial corada por NRF2, por IHQ
v35	percentual da área cutânea superficial corada por NRF2, por IHQ
v36	razão entre percentual da área cutânea superficial corada por NRF2 e intensidade da marcação, por IHQ
v37	intensidade da área cutânea profunda corada por NRF2, por IHQ
v38	percentual da área cutânea profunda corada por NRF2, por IHQ
v39	razão entre percentual da área cutânea profunda corada por NRF2 e intensidade da marcação, por IHQ

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

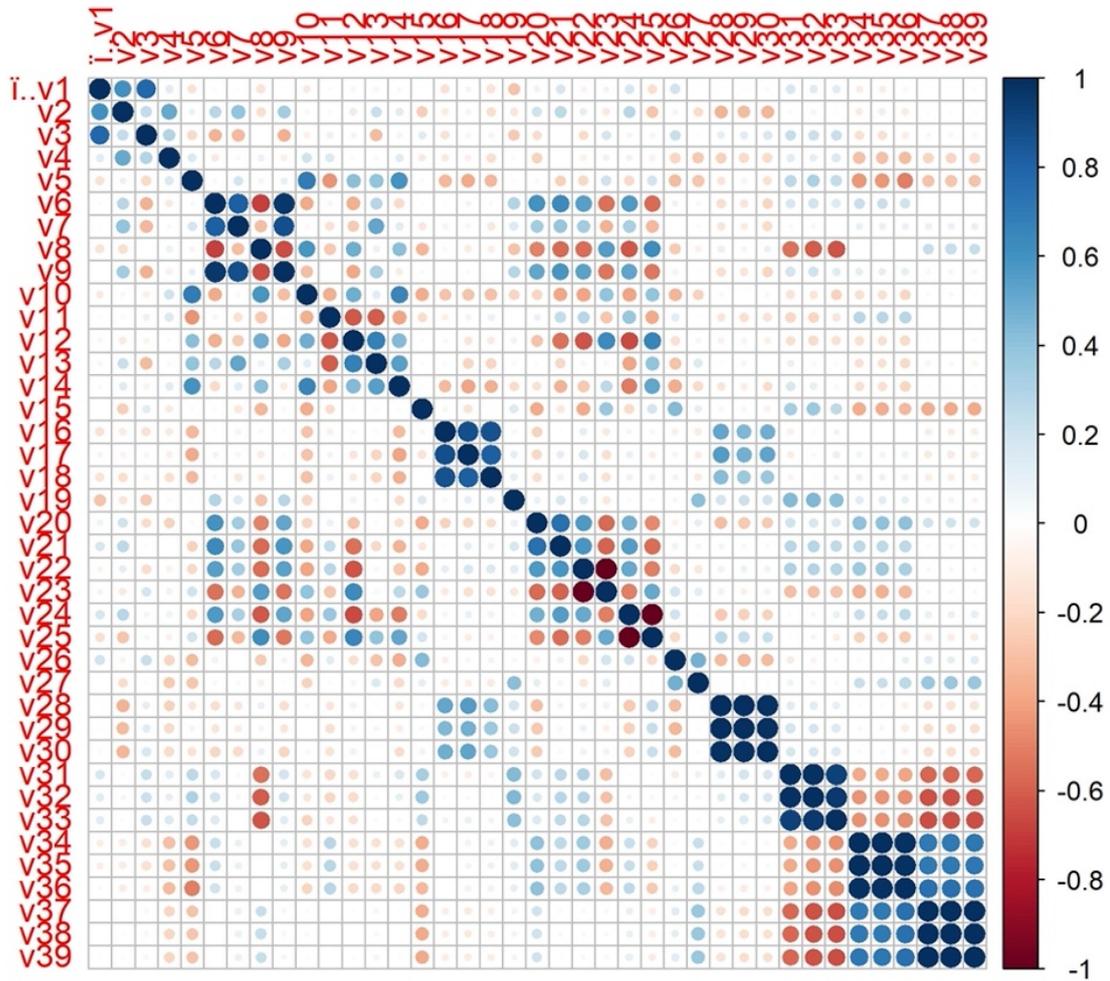
APÊNDICE AE - Correlação de Spearman entre as variáveis quantitativas,  
codificadas por v1 a v39, no período pré suplementação



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.



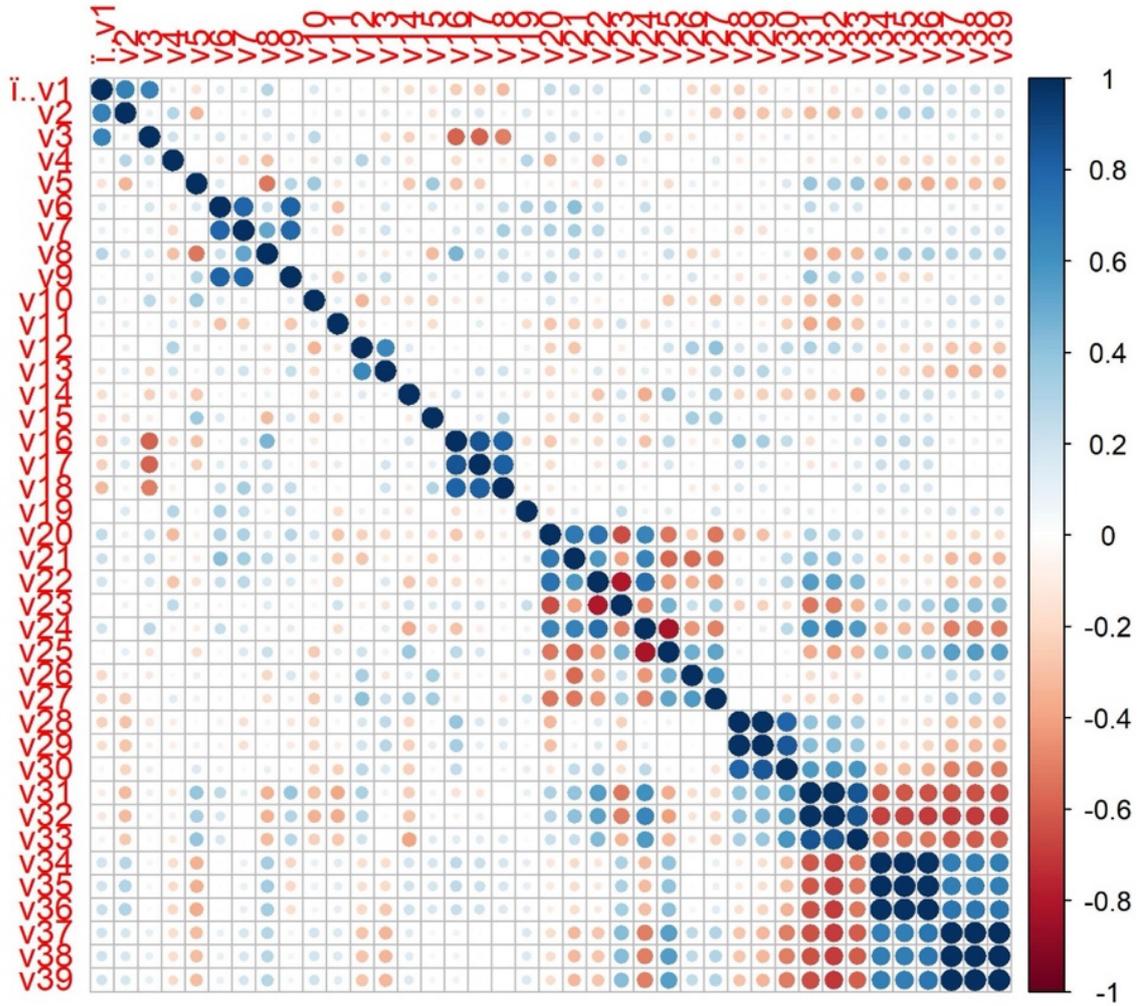
APÊNDICE AG - Correlação de Spearman entre as variáveis quantitativas no período pós suplementação



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.



APÊNDICE AI - Correlação de Spearman dos ganhos residuais entre as variáveis quantitativa

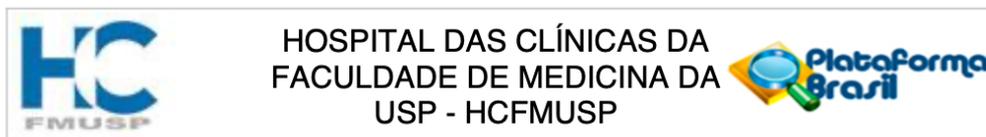


APÊNDICE AJ - Correlação de Spearman dos ganhos residuais entre as variáveis quantitativas

	v1	v2	v3	v4	v5	v6	v7	v8	v9	v10	v11	v12	v13	v14	v15	v16	v17	v18	v19	v20	v21	v22	v23	v24	v25	v26	v27	v28	v29	v30	v31	v32	v33	v34	v35	v36	v37	v38	v39		
v1	1	0,67	0,66	0,09	-	0,13	0,09	0,28	0,02	0,55	0,05	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
v2		1	0	0,18	0,34	0,03	0,06	0,54	0,02	0,04	0,30	0,09	0,11	0,06	0,14	0,15	0,06	0,06	0,15	0,08	0,09	0,05	0,07	0,01	0,11	0,08	0,25	0,29	0,28	0,22	0,32	0,31	0,26	0,24	0,29	0,30	0,17	0,17	0,18		
v3			1	0,20	0,30	0,17	0,50	0,14	0,13	0,27	0,03	0,01	0,18	0,23	0,08	0,58	0,59	0,50	0,01	0,22	0,21	0,16	0,04	0,27	0,11	0,08	0,25	0,29	0,28	0,22	0,09	0,09	0,06	0,02	-	-	-	-	-	-	
v4				1	0,00	-	-	-	0,12	0,12	0,30	0,17	-	0,13	0,01	0,18	0,07	0,08	0,29	0,32	0,07	0,28	0,25	0,06	0,14	0,12	0,02	0,13	0,07	0,09	0,09	0,06	0,02	-	-	-	-	-	-	-	
v5					1	0,14	0,01	0,52	0,29	0,04	0,12	0,30	0,17	-	0,13	0,01	0,18	0,07	0,08	0,29	0,32	0,07	0,28	0,25	0,06	0,14	0,12	0,02	0,13	0,07	0,09	0,09	0,06	0,02	-	-	-	-	-	-	
v6						1	0,79	0,21	0,81	0,54	0,28	0,04	0,15	0,04	0,14	0,04	0,12	0,21	0,31	0,30	0,42	0,23	0,04	0,23	0,04	0,04	0,02	0,04	0,06	0,06	0,08	0,25	0,18	0,17	0,02	0,01	0,01	0,10	0,10	0,10	
v7							1	0,51	0,79	0,09	0,23	0,10	0,20	0,05	0,03	0,13	0,12	0,33	0,23	0,32	0,33	0,27	0,04	0,13	0,14	0,07	0,03	0,15	0,16	0,02	0,09	0,01	0,02	0,09	0,10	0,10	0,18	0,18	0,18		
v8								1	0,01	0,02	0,03	0,11	0,11	0,08	0,32	0,46	0,30	0,22	0,07	0,14	0,26	0,16	0,12	0,04	0,22	0,20	0,15	0,05	0,13	0,09	0,35	0,35	0,32	0,33	0,34	0,33	0,28	0,29	0,29		
v9									1	0,11	0,27	0,17	0,23	0,01	0,16	0,03	0,13	0,24	0,20	0,28	0,20	0,15	0,06	0,12	0,05	0,16	0,06	0,12	0,10	0,04	0,38	0,29	0,28	0,21	0,20	0,17	0,06	0,06	0,06		
v10										1	0,12	0,34	0,17	0,15	0,21	0,11	0,12	0,04	0,01	0,17	0,11	0,08	0,04	0,02	0,25	0,16	0,25	0,19	0,21	0,21	0,29	0,34	0,24	0,10	0,09	0,07	0,19	0,19	0,19		
v11											1	0,12	0,04	0,07	0,18	0,01	0,12	0,03	0,17	0,28	0,24	0,19	0,20	0,18	0,11	0,07	0,12	0,03	0,07	0,22	0,38	0,36	0,25	0,12	0,12	0,11	0,14	0,14	0,14		
v12												1	0,05	0,04	0,04	0,04	0,02	0,00	0,07	0,22	0,23	0,01	0,09	0,01	0,20	0,33	0,41	0,17	0,19	0,26	0,31	0,28	0,20	0,16	0,17	0,20	0,28	0,28	0,28		
v13													1	0,05	0,00	0,06	0,18	0,20	0,09	0,19	0,08	0,15	0,14	0,10	0,09	0,13	0,22	0,25	0,27	0,15	0,08	0,04	0,02	0,18	0,19	0,27	0,33	0,33	0,33		
v14														1	0,10	0,16	0,09	0,08	0,12	0,13	0,09	0,27	0,18	0,36	0,47	0,11	0,32	0,21	0,24	0,24	0,24	0,28	0,39	0,19	0,19	0,21	0,14	0,14	0,14		
v15															1	0,01	0,10	0,29	0,01	0,14	0,21	0,19	0,14	0,14	0,02	0,34	0,34	0,04	0,12	0,05	0,06	0,06	0,14	0,17	0,17	0,16	0,15	0,15	0,15		
v16																1	0,90	0,90	0,16	0,16	0,11	0,18	0,17	0,19	0,27	0,09	0,09	0,38	0,33	0,24	0,14	0,07	0,12	0,25	0,25	0,22	0,07	0,07	0,07		
v17																	1	0,81	0,04	0,17	0,02	0,12	0,17	0,10	0,17	0,04	0,02	0,15	0,10	0,05	0,13	0,10	0,13	0,21	0,22	0,19	0,01	0,01	0,02		
v18																		1	0,07	0,09	0,05	0,07	0,08	0,04	0,01	0,09	0,12	0,14	0,13	0,06	0,00	0,01	0,14	0,18	0,18	0,14	0,00	0,00	0,00		
v19																			1	0,13	0,10	0,01	0,23	0,07	0,11	0,01	0,17	0,05	0,03	0,10	0,10	0,05	0,03	0,11	0,10	0,10	0,15	0,15	0,15		
v20																				1	0,71	0,74	0,05	0,04	0,13	0,24	0,13	0,32	0,29	0,12	0,31	0,29	0,21	0,13	0,12	0,08	0,18	0,18	0,18		
v21																					1	0,58	0,60	0,67	0,18	0,17	0,14	0,04	0,07	0,25	0,40	0,41	0,23	0,18	0,17	0,17	0,12	0,12	0,13		
v22																						1	0,79	0,75	0,44	0,34	0,43	0,13	0,13	0,27	0,56	0,53	0,44	0,12	0,11	0,11	0,28	0,28	0,28		
v23																							1	0,40	0,47	0,21	0,34	0,22	0,23	0,15	0,53	0,50	0,34	0,32	0,31	0,33	0,43	0,43	0,43		
v24																								1	0,41	0,44	0,50	0,04	0,08	0,26	0,61	0,65	0,57	0,31	0,31	0,30	0,50	0,50	0,50		
v25																									1	0,48	0,53	0,06	0,01	0,04	0,37	0,42	0,32	0,40	0,40	0,41	0,55	0,55	0,55		
v26																										1	0,56	0,01	0,01	0,04	0,16	0,14	0,12	0,01	0,01	0,06	0,25	0,25	0,25		
v27																											1	0,01	0,01	0,15	0,19	0,20	0,23	0,10	0,10	0,13	0,30	0,30			
v28																												1	0,98	0,79	0,99	0,40	0,32	0,10	0,10	0,16	0,27	0,27	0,28		
v29																													1	0,84	0,42	0,43	0,37	0,16	0,16	0,21	0,32	0,32	0,33		
v30																														1	0,56	0,57	0,59	0,30	0,30	0,34	0,50	0,50	0,51		
v31																															1	0,98	0,96	0,62	0,62	0,63	0,63	0,63	0,64		
v32																																1	0,87	0,64	0,64	0,69	0,69	0,70			
v33																																		1	0,53	0,53	0,53	0,60	0,60	0,60	
v34																																				1	1,00	0,99	0,64	0,64	0,64
v35																																					1	0,99	0,64	0,64	0,64
v36																																						1	0,74	0,73	0,73
v37																																						1	1,00	1,00	
v38																																						1	1,00		
v39																																						1	1,00		

## ANEXOS

### ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DE METALOPROTEINASES E FATORES OXIDANTES E ANTI-OXIDANTES RELACIONADOS AO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO NA SUPLEMENTAÇÃO ORAL DE COENZIMA Q10 EM IDOSOS

**Pesquisador:** JOSÉ ANTONIO SANCHES JUNIOR

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 58760016.5.0000.0068

**Instituição Proponente:** HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.784.048

##### Apresentação do Projeto:

AVALIAÇÃO DE METALOPROTEINASES E FATORES OXIDANTES E ANTI-OXIDANTES RELACIONADOS AO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO NA SUPLEMENTAÇÃO ORAL DE COENZIMA Q10

##### Objetivo da Pesquisa:

Trata-se de um estudo randomizado duplo cego com objetivo de avaliar o efeito molecular antienvhecimento da suplementação oral de Coenzima Q10 em indivíduos idosos.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: A suplementação oral é comprovadamente segura, mesmo quando utilizadas doses diárias altas (Hidaka, 2008). As doses avaliadas como seguras e bem toleradas são de até 1.200mg/dia em adultos (Hathcock, 2006) e 10mg/kg/dia em crianças (Miles, 2006). Níveis plasmáticos estáveis são obtidos após 3 a 4 semanas de suplementação, quando podem ser medidos no plasma (Hosoe, 2007) e, para estas dosagens de suplementação, variam de 5 a 10mcg/mL (Miles, 2007). Estes valores correspondem a 2,5 a 5 vezes o limite superior da normalidade dos níveis séricos de CoQ10 em indivíduos saudáveis (Steele, 2004). As medidas séricas são amplamente utilizadas para estimar o status de CoQ10 em humanos e, em indivíduos saudáveis não submetidos a suplementação, podem variar de 0,34 a 1,65 mcg/mL (Bhagavan, 2006). Existem evidências de

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar

**CEP:** 05.403-010

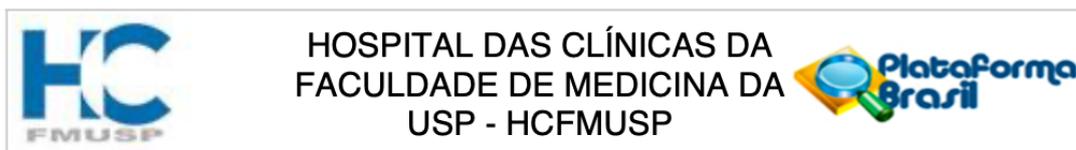
**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2661-7585

**Fax:** (11)2661-7585

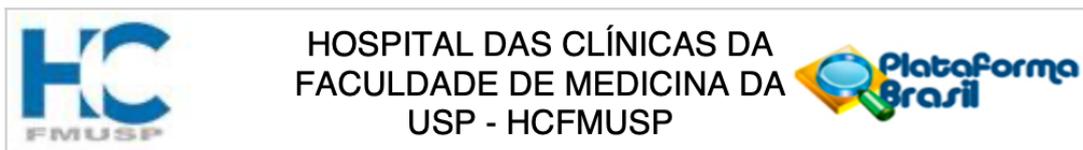
**E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 1.784.048

interações medicamentosas relacionadas a CoQ10, como o uso de estatinas. Estas drogas utilizadas no tratamento de dislipidemias, inibem a HMG-CoA redutase, necessária tanto para síntese de colesterol quanto para de CoQ10. Assim, pacientes em tratamento com lovastatina ou pravastatina, por exemplo, tendem a apresentar níveis séricos reduzidos desta coenzima (Mortensen, 1997) Outras medicações como os betabloqueadores metoprolol e propranolol (Kishi, 1977), além das fenotiazinas e antidepressivos tricíclicos, mostraram inibir as enzimas dependentes de CoQ10 (Moreno-Fernandez, 2012). Em relação à coagulação sanguínea, pacientes que tomam drogas antiplaquetárias, como a aspirina, podem ter alterações na função das plaquetas pela CoQ10, aumentando as chances de sangramentos (Serebruany, 1997). Por outro lado, pacientes que usam anticoagulantes como a warfarina podem apresentar redução do efeito terapêutico pela ação da CoQ10 semelhante à vitamina K (Singh, 2007). Em hipertensos, a CoQ10 pode apresentar efeito hipotensor superajuntado aos anti-hipertensivos orais (Bonakdar, 2005). Nos diabéticos, por sua vez, esta coenzima aumenta a sensibilidade a insulina, ao melhorar a função das células beta pancreáticas, gerando redução da necessidade diária de hipoglicemiantes (Hodgson, 2002). Em relação à toxicidade, a maioria dos ensaios clínicos não demonstrou efeitos adversos significativos, que indicassem a interrupção do tratamento. Os efeitos colaterais registrados são, em geral, de baixa morbidade, como desconforto abdominal, náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, cefaléia e rash cutâneo (Hidaka, 2008). Por ser metabolizada pelo fígado e eliminada através do trato biliar, pode acumular em pacientes com insuficiência hepática ou colestase (Greenberg, 1990). Benefícios: A coenzima Q10 age como mediadora essencial da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, sendo necessária na respiração celular e produção de ATP. É considerada um antioxidante intercelular e sua presença já foi demonstrada em diferentes membranas celulares e no sangue, em lipoproteínas tanto de alta quanto de baixa densidade (Crane, 2001). Evidências mais recentes mostram o efeito desta coenzima também como reguladora da expressão gênica, principalmente relacionada à sinalização celular, metabolismo intermediário, inflamação, controle de transporte e transcrição. Entretanto, os mecanismos moleculares pelos quais exerce estas funções ainda não foram completamente desvendados (Groeneberg; 2005; Schmelzer; 2008; Santos-Gonzalez; 2007). Por estar relacionada à síntese de ATP, afeta o funcionamento de todas as células do organismo, principalmente aquelas que possuem alta demanda energética, tornando-se essencial à saúde dos tecidos e órgãos. É, portanto, o antioxidante endógeno lipossolúvel que previne a oxidação de proteínas, lipídeos e DNA (Littarru, 2010). As comprovadas indicações atuais para suplementação oral de Coenzima Q10 incluem: deficiências primárias e secundárias de CoQ10 (Quinzii, 2011), doenças mitocondriais

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 1.784.048

(Kerr, 2010), fibromialgia (Cordero, 2011, 2012), insuficiência cardíaca (Adarsh, 2008), cardiopatia isquêmica (Celik, 2009), hipertensão arterial sistêmica (Rosenfeldt, 2007), diabetes mellitus (Golbidi, 2011), neoplasias malignas (Roffe, 2004), doença de Parkinson (Henchcliffe, 2008), doença de Huntington (Stack, 2008), doença de Alzheimer (Lee, 2009), ataxia de Friedreich (Cooper, 2008), astenozoospermia (Mancini, 2011), doenças periodontais (Prakash, 2010), cefaléia migrânea (Sándor, 2005), pre-eclampsia (Teran, 2009), síndrome de Down (Tiano, 2011). As deficiências de CoQ10 podem surgir por alterações nutricionais, como deficiência de vitamina B6, um cofator essencial para sua biossíntese, defeitos genéticos, aumento da demanda em doenças específicas (Quinzii, 2007), mas também podem aparecer com o avançar da idade, durante o processo de envelhecimento (Soha, 2007). As principais fontes dietéticas naturais são encontradas na carne de coração de animais, coxa de frango e em peixes como truta e arenque. A ingestão diária de CoQ10 para evitar deficiências é calculada em torno de 3 a 5mg por dia. Em tecidos normais, entretanto, esta coenzima atinge um nível de saturação a partir do qual a suplementação oral é incapaz de ultrapassar os níveis normais de CoQ10 (Beal, 1999; Weber, 1997). Após ingerida, a CoQ10 é absorvida lentamente no intestino delgado, devido ao seu alto peso molecular e baixa hidrossolubilidade, depois alcança os vasos linfáticos e, finalmente, o sangue e os tecidos (Palamakula, 2005). Logo após a absorção, pode ser detectada nas lipoproteínas plasmáticas e no fígado (Zhang, 1995). Quando administrada às refeições, sua absorção pode ser até 3 vezes mais rápida (Ochiai, 2007). Além disto, suplementações de altíssimas doses diárias, como 150mg/Kg/dia, levam ao aumento significativo na quantidade de CoQ10 no coração e músculos esqueléticos, sugerindo que concentrações plasmáticas elevadas são necessárias para facilitar sua captação pelos tecidos periféricos (Kwong, 2002). Não há diferença significativa da absorção de CoQ10 quando administrada na forma de pó, através de cápsulas, ou em alimentos ricos em CoQ10, como coração de porco (Weber, 1997).

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Nenhum.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Nenhuma.

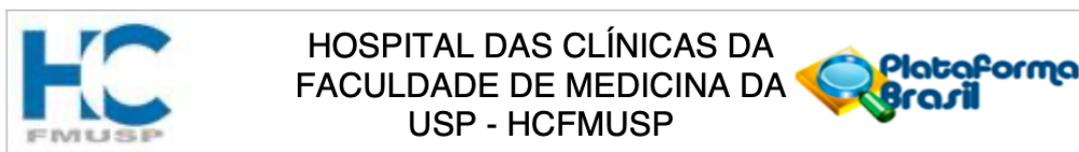
**Recomendações:**

A solicitação de adequação do TCLE foi atendida, solicitamos aprovação do estudo.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A solicitação de adequação do TCLE foi atendida, solicitamos aprovação do estudo.

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 1.784.048

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_672482.pdf	06/10/2016 10:29:52		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_corrigido.doc	06/10/2016 10:29:34	JOSÉ ANTONIO SANCHES JUNIOR	Aceito
Outros	Registro_on_line_14771.pdf	16/08/2016 11:48:54	JOSÉ ANTONIO SANCHES JUNIOR	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	04/08/2016 10:12:39	JOSÉ ANTONIO SANCHES JUNIOR	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Avaliacao_de_Metaloproteinases.docx	02/08/2016 08:46:22	JOSÉ ANTONIO SANCHES JUNIOR	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 20 de Outubro de 2016

Assinado por:  
ALFREDO JOSE MANSUR  
(Coordenador)

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

## ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(De acordo com as regulamentações da Resolução CNS 466/2012 – CONEP)

**Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo sobre envelhecimento da pele intitulado: “AVALIAÇÃO DE METALOPROTEINASES E FATORES OXIDANTES E ANTI-OXIDANTES RELACIONADOS AO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO NA SUPLEMENTAÇÃO ORAL DE COENZIMA Q10 EM IDOSOS”.**

Muitos tratamentos via oral são utilizados atualmente com o objetivo de melhorar aspectos do envelhecimento da pele. Uma das substâncias prescritas por dermatologistas para evitar ou tratar a pele envelhecida é a Coenzima Q10, geralmente tomada em cápsulas. Apesar de ser indicada por muitos médicos, existem poucos estudos sobre o mecanismo molecular da ação da Coenzima Q10 na pele de humanos. Ela é utilizada há mais de 50 anos, com benefícios importantes para o coração e para o sistema nervoso central. É bastante segura e não oferece riscos para sua saúde.

As informações abaixo estão sendo fornecidas para esclarecê-lo(a) sobre sua possível participação voluntária neste estudo, que tem como objetivo demonstrar os efeitos moleculares da ação da Coenzima Q10 no envelhecimento da pele.

Este estudo será feito da seguinte maneira: você passará por uma entrevista médica (anamnese), sobre seus dados pessoais e outros relacionados a sua saúde e será submetido(a) a exame clínico da pele. Serão colhidos exames de sangue e, após anestesia local de uma região da pele do antebraço, será retirado um pedaço de pele de 6mm de diâmetro para análise laboratorial (biopsia). Neste local, serão

dados pontos cirúrgicos, que deverão ser retirados num período de 10 a 14 dias. Com este material colhido, estudaremos os fatores de inflamação, oxidantes e anti-oxidantes.

Os participantes do estudo serão divididos em 3 grupos: um tomará cápsulas contendo 100mg de Coenzima Q10, outro grupo tomará cápsulas contendo 200mg de Coenzima Q10 e o terceiro grupo tomará cápsulas contendo amido. Cada participante tomará 1 (uma) cápsula por dia, durante 3 meses. O objetivo é comparar o efeito na pele de diferentes doses, além de ter um grupo placebo para controlar esta avaliação. Quando acabar este período, serão realizadas novas coletas de sangue e uma nova biopsia da pele (retirada de 1 pedaço de 6mm de pele, sob anestesia local), para compararmos com as amostras iniciais. Tanto os pesquisadores quanto os participantes só saberão a qual grupo cada voluntário pertenceu quando terminar o estudo, para que seja válido cientificamente.

Os exames serão feitos no próprio Hospital das Clínicas sem nenhum custo para os participantes, que podem aproveitar o dia das consultas para realizar a coleta das amostras de sangue ou biópsia de pele. Você será acompanhado(a) no ambulatório da Dermatologia, durante todo o período da pesquisa. Se houver a necessidade de mais algum exame, você poderá ser convocado via telefone ou carta para vir a uma consulta, mesmo antes do seu retorno, e terá todos os esclarecimentos e assistência que precisar.

Todos os participantes terão acesso aos resultados de seus exames no momento em que quiserem e com as explicações necessárias para seu entendimento. Você pode em qualquer momento não concordar em fazer os exames que serão pedidos.

**Riscos:** o risco é mínimo. A picada da agulha para colher sangue pode levar a um leve desconforto que passará em poucos minutos. Um dia depois, você poderá apresentar uma mancha roxa no local, que desaparecerá em poucos dias, sem maiores problemas. Durante o procedimento da biópsia de pele no antebraço, você poderá sentir dor mínima no momento da aplicação da anestesia, parecida com uma picada de formiga. No local da biopsia, poderá ocorrer uma pequena cicatriz.

**Benefícios:** ao participar deste estudo você estará colaborando para o esclarecimento dos mecanismos de ação da Coenzima Q10 relacionados ao envelhecimento da pele. Não há benefício direto para o participante, pois estamos avaliando um efeito, ainda não comprovado, de antienvelhecimento da pele.

Você tem toda a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento sem penalização alguma, sem obrigatoriedade de justificar ou de participar de qualquer atividade posterior do estudo. Neste caso você poderá continuar a receber atendimento na Instituição, sem problemas.

Todas as informações obtidas a seu respeito neste estudo serão analisadas em conjunto com as de outras participantes, não sendo divulgado a sua identificação ou de outras participantes em nenhum momento. Assim, se seus dados forem repassados para finalidade científica, serão completamente anônimos.

Você tem a garantia de que todos os dados obtidos a seu respeito só serão utilizados neste estudo. Os dados do seu prontuário são de sua propriedade; será preservada a relação de sigilo profissional entre você e os investigadores.

Caso seja necessário, você terá assistência integral e gratuita, sem necessidade de comprovação denexo causal com a pesquisa durante o estudo, ou mesmo após o término ou interrupção do estudo, ou seja, pelo tempo que for necessário.

Se ocorrer qualquer problema ou dano pessoal comprovadamente decorrente dos procedimentos do estudo, aos quais você será submetido(a), lhe será garantido o direito a tratamento gratuito na Instituição e a indenização determinada por lei, sem restrições.

Você não receberá nenhuma compensação financeira relacionada à sua participação neste estudo. Da mesma forma, você não terá nenhuma despesa pessoal em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas.

A qualquer momento, se for de seu interesse, você poderá ter acesso a todas as informações obtidas a seu respeito neste estudo, ou a respeito dos resultados parciais ou gerais do estudo.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. José Antônio Sanches Junior, que pode ser encontrado no seguinte endereço: Instituto Central do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo – HC

FMUSP, 3º andar, Bloco de Dermatologia, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 255. Telefone (11) 2661-3346, e-mail: jasanches@usp.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Quando o estudo for finalizado, você será informado(a) sobre os principais resultados e conclusões obtidas no estudo.

Esse termo foi elaborado em duas vias originais devidamente assinadas, sendo que uma ficará com você e a outra com os investigadores.

Acredito ter sido suficientemente informado(a) a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “AVALIAÇÃO DE METALOPROTEINASES E FATORES OXIDANTES E ANTI-OXIDANTES RELACIONADOS AO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO NA SUPLEMENTAÇÃO ORAL DE COENZIMA Q10 EM IDOSOS”. Eu discuti com o (a) Dr(a) \_\_\_\_\_ sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, riscos e benefícios, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Declaro ter recebido uma via do presente termo de consentimento.

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data

---

Nome do(a) participante da pesquisa

---

Assinatura

Eu, abaixo assinado, confirmo ter explicado este termo e os objetivos do estudo à participante da pesquisa e ter-lhe entregado uma viarubricada, assinada e datada deste termo de consentimento.

Todas as páginas serão rubricadas pela participante da pesquisa e pelo pesquisador principal no momento da assinatura.

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Data

---

Nome do pesquisador principal ou co-pesquisador ou carimbo

---

Assinatura