

Trabalho de pesquisa prioritário

Rejuvant®, uma formulação de composto potencialmente prolongador da vida com alfa-cetoglutarato e vitaminas, conferiu uma redução média de 8 anos no envelhecimento biológico, após uma média de 7 meses de uso, no teste de metilação do DNA TruAge

Oleksandr Demidenko^{1,*}, Diogo Barardo^{2,*}, Valery Budovskii¹, Francis R. Palmer³, Brian K. Kennedy^{2,3,4,5}, Yelena V. Budovskaya¹, Robb Finnemore³

¹TruMe Inc., Alameda, CA 94502, EUA

²Healthy Longevity Translational Research Programme, Yong Loo Lin School of Medicine, National University Singapore, Singapore 117456, Singapore ³Ponce de Leon Health, Fernandina, FL 32034, EUA ⁴Centre for Healthy Longevity, National University Health System, Singapura 117456, Singapura

⁵Instituto de Ciências Clínicas de Cingapura, A*STAR, Cingapura 117609, Cingapura

*Contribuição igual

Correspondência para: Brian K. Kennedy, Yelena V. Budovskaya; e-mail: bkennedy@nus.edu.sg, yelena@trumelabs.com **Palavras-**

chave: envelhecimento, metilação do DNA, alfa-cetoglutarato (AKG), idade biológica, Rejuvant **Recebido:** 5 de outubro de 2021 **Aceito:** 15 de novembro de 2021

Publicação: 30 de novembro de 2021

Direitos autorais: © 2021 Demidenko et al. Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da [Creative Commons Attribution License \(CC BY 3.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/), que permite uso irrestrito, distribuição e reprodução em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

ABSTRATO

A busca continua por possíveis intervenções que retardam e/ou revertem o envelhecimento biológico, resultando em extensão da saúde e longevidade. As intervenções que retardam o envelhecimento em modelos animais estão bem estabelecidas; no entanto, a maioria carece de validação em humanos. A duração da vida humana torna impraticável realizar análises. Em vez disso, biomarcadores de envelhecimento, como relógios de metilação do DNA (DNAm), foram desenvolvidos para monitorar a idade biológica. Aqui relatamos uma análise retrospectiva da idade de metilação do DNA em 42 indivíduos tomando Rejuvant®, uma formulação à base de alfa-cetoglutarato, por um período médio de 7 meses. O teste de DNAm foi realizado no início e no final do tratamento com a suplementação de Rejuvant®. Notavelmente, os indivíduos apresentaram uma diminuição média no envelhecimento biológico de 8 anos (p -valor=6,538x10⁻¹²). Além disso, a suplementação com Rejuvant® é robusta às diferenças individuais, conforme indicado pelo fato de que a grande maioria dos participantes diminuiu sua idade biológica. Além disso, descobrimos que Rejuvant® é um benefício adicional para indivíduos cronologicamente e biologicamente mais velhos. Embora sejam necessários testes contínuos, particularmente em um projeto controlado por placebo, a reversão de quase 8 anos na idade biológica de indivíduos que tomam Rejuvant® por 4 a 10 meses é digna de nota, tornando o coquetel de produtos naturais um candidato intrigante para afetar

INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo biológico quase universal que se manifesta como um declínio geral da saúde e vitalidade, eventualmente levando à morte. O envelhecimento está associado ao desenvolvimento de uma ampla gama de doenças crônicas, incluindo câncer, Alzheimer, diabetes, doenças cardiovasculares e muitas outras condições [1, 2]. Se o envelhecimento

retardado, o início da doença crônica será prevenido, a capacidade funcional mantida e, com toda a probabilidade, as complicações devido a doenças infecciosas, como Covid 19 e influenza, reduzidas [3]. Em suma, os seres humanos terão um maior tempo de vida e saúde.

O envelhecimento é tipicamente medido cronologicamente em anos, com a sobrevivência humana mediana na ordem de

oito décadas. Se esperamos controlar o processo de envelhecimento, precisamos aprender a medir a taxa de envelhecimento em períodos de tempo mais curtos. Além disso, o envelhecimento progride em taxas diferentes em indivíduos diferentes. Nossa verdadeira idade biológica é influenciada por muitos fatores adicionais, como antecedentes genéticos, estilo de vida e doenças. Para enfrentar esse desafio, vários marcadores biológicos do envelhecimento foram desenvolvidos. Esses marcadores são conjuntos únicos de moléculas ou alterações no estado epigenético do DNA de um indivíduo que refletem seu estado atual de envelhecimento [4-6]. Entre os biomarcadores mais promissores do processo de envelhecimento estão os padrões de metilação do DNA. A metilação do DNA é um mecanismo epigenético que desempenha um papel importante na regulação da expressão gênica, desenvolvimento do organismo e doença [7, 8].

A metilação dos resíduos de lisina nas histonas centrais, H3 e H4, inicia uma modificação conformacional na estrutura da cromatina que está associada a alterações na atividade transcricional. No entanto, a marca epigenética mais amplamente estudada é a metilação direta do próprio DNA. Essa modificação envolve a conversão de citosina em 5'-metilcitosina, catalisada por DNA metiltransferases, e ocorre tipicamente nas sequências de dinucleotídeos CpG (CpGs). Essas sequências CpG, agrupadas em regiões conhecidas como ilhas CpG (CGIs), são mais frequentemente encontradas em promotores de genes de manutenção [9, 10]. Foi demonstrado que a hipermetilação das ilhas CpG está ligada ao silenciamento transcricional, enquanto as ilhas CpG desmetiladas são mais frequentemente encontradas durante a embriogênese e servem como uma marca registrada de genes transcritos ativamente. Durante o envelhecimento, dois tipos de mudanças na metilação do DNA foram observados e cuidadosamente caracterizados: (1) desvio epigenético, ou mudanças estocásticas progressivas nos padrões de metilação do DNA entre indivíduos que ocorrem com o aumento da idade [11] e (2) o relógio epigenético – uma medida derivada da metilação do DNA altamente correlacionada com a idade cronológica e proposta para medir a idade biológica [9, 12, 13].

O relógio epigenético é um biomarcador atraente do envelhecimento porque se aplica à maioria dos tecidos humanos, capturando aspectos da idade biológica, como fragilidade [14], aptidão cognitiva/física em idosos [15], aceleração da idade na obesidade [16], envelhecimento prematuro na síndrome de Down [17] e infecção por HIV [18], Parkinson [19] e neuropatologias relacionadas à doença de Alzheimer [20], bem como câncer [21] e estresse ao longo da vida [22]. Os marcadores do envelhecimento biológico representam uma ferramenta importante para validar clinicamente os efeitos das intervenções baseadas na longevidade. Pela primeira vez, esses biomarcadores do envelhecimento dão aos cientistas a oportunidade de estudar os efeitos dos compostos anti-envelhecimento em tempo real e diretamente em humanos. Um dos

compostos descobertos até o momento é o Alfa-cetoglutarato (AKG) [23].

AKG é um metabólito intermediário endógeno no ciclo de Krebs cujos níveis declinam naturalmente durante o envelhecimento. A AKG está envolvida em múltiplas vias metabólicas e celulares. Estes incluem o funcionamento como uma (uma) molécula de sinalização, doador de energia, precursor na biossíntese de aminoácidos e um regulador de processos epigenéticos e sinalização celular via ligação a proteínas [24-26]. A deficiência de AKG em células-tronco e progenitoras aumenta com a idade [27]. À medida que os animais envelhecem, a função mitocondrial é progressivamente prejudicada e o fluxo metabólico celular nas mitocôndrias diminui, o que exacerba a deficiência de AKG.

Chin et al. relataram que o AKG aumentou o tempo de vida de *C. elegans* [28]. Com base nesses resultados, AKG (e sal de cálcio) combinado com outros compostos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) foram estudados em camundongos. O camundongo não modificado geneticamente é o modelo mamífero preferido para estudar o envelhecimento, uma vez que os processos bioquímicos envolvidos no envelhecimento dos camundongos podem se aplicar a outros mamíferos, incluindo humanos [29]. Em um estudo recente, patrocinado pela Ponce de Leon Health e realizado no Buck Institute for Research on Aging, o efeito do alfa-cetoglutarato (entregue na forma de um sal de cálcio - CaAKG) no tempo de vida e longevidade em camundongos C57BL/6 foi relatado. Os autores mostraram que nos camundongos, o AKG reduziu a fragilidade e aumentou a longevidade, indicando uma compressão da morbidade [23]. Estas e outras descobertas sugerem que o AKG pode ser um candidato ideal para estudos humanos pró-longevidade.

Neste estudo, examinamos a associação transversal e longitudinal entre o relógio epigenético, estado de saúde, aptidão física e os efeitos de tomar Rejuvant® (liberação sustentada CaAKG + uma vitamina específica dependendo do sexo) no envelhecimento biológico humano.

Nós acompanhamos 42 indivíduos autodeclarados saudáveis que tomaram suplementação de AKG por um período de 4 a 10 meses. Os efeitos do AKG no envelhecimento biológico e a possível correlação de outros efeitos fisiológicos são discutidos.

RESULTADOS

Para este estudo, revisamos 42 participantes que optaram por tomar Rejuvant® por um período de 4 a 10 meses. Todos os participantes estavam ativamente no produto Rejuvant®. A necessidade de seguir este estudo com um estudo controlado por placebo é descrita na Discussão. As características gerais desta coorte são descritas na Tabela 1. Todos os participantes relataram estado de saúde bom ou excelente, sem quaisquer condições médicas crônicas.

Apenas um participante precisou ser excluído no início do estudo e

Tabela 1. Características descritivas dos participantes do estudo.

Total de participantes	42
Gênero feminino masculino)	14/28
Fêmea:	
Idade cronológica (mediana; intervalo)	64,09; 43,49 a 72,46
Idade biológica na linha de base (mediana; intervalo)	62,15; 46,4 a 73 55,55;
Idade biológica em T7* (mediana; intervalo)	33,4 a 63,7
Macho:	
Idade cronológica (mediana; intervalo)	62,78; 41,31 a 79,57
Idade biológica na linha de base (mediana; intervalo)	61,85; 41,9 a 79,7 53,3;
Idade biológica em T7* (mediana; intervalo)	33 a 74,9

*Indica a idade biológica medida pelo teste TruMe após uma média de sete meses de tratamento.

continuou a fumar durante todo o estudo. A maioria dos participantes do estudo (66,7%, n = 28) era do sexo masculino. A idade cronológica média desta coorte foi de aproximadamente 63 anos.

Para todos os 42 participantes, conseguimos medir a idade biológica basal usando o modelo de previsão de idade TruMe antes de começarem a tomar Rejuvant®. Utilizamos o modelo de previsão TruAge com sequenciamento de Sanger para análise de metilação do DNA. No total, 3 genes incluindo 9 sítios CpG foram analisados pelo sequenciamento de Sanger. Os valores de metilação do DNA obtidos para todos os sítios CpG foram incluídos no modelo de previsão de idade TruMe (publicação pendente).

Avaliamos o erro de predição do teste epigenético TruAge, conforme descrito anteriormente. A comparação dos valores de idade previstos versus reais produz um erro absoluto mediano de 4,23 anos. O erro médio de 0,35 anos mostra que essa população como um todo pode ser um pouco mais jovem do que o esperado. Sabe-se que a normalização do pré-processamento dos conjuntos de dados de metilação do DNA e sua variação de idade pode influenciar a diferença entre a idade estimada e cronológica. Uma medida de robustez para esses fatores envolve o cálculo dos resíduos de uma regressão linear da idade prevista versus a real. Descobrimos que a idade estimada tem um coeficiente de regressão de 0,88 e que a regressão linear (linha ajustada na Figura 1) exibiu um R-quadrado ajustado de 0,59 com um erro absoluto mediano de 3,97 anos. Finalmente, também encontramos uma correlação linear de Pearson estatisticamente significativa (valor $p=2,026 \times 10^{-9}$) de 0,77 (95% CI: 0,61 a 0,87) entre a idade estimada e real de nossa coorte no início do estudo.

Também consideramos se houve um viés de sexo na avaliação da idade biológica, analisando homens (28) e mulheres (14) separadamente. Seguindo o mesmo procedimento anterior, para os homens encontramos um erro médio absoluto de

a idade prevista versus real de 4,92 anos e um erro médio de -0,22 anos. A mediana do erro absoluto da regressão linear foi de 4,64 anos, com R quadrado ajustado de 0,6 e coeficiente de regressão de 0,90 (Figura 2). Além disso, a idade estimada e real no início do estudo para homens foi linearmente correlacionada (valor de $p=7,74 \times 10^{-7}$) com uma magnitude de 0,78 (95% CI: 0,58 a 0,9). Para o sexo feminino, o procedimento de regressão análoga apresentou um erro absoluto mediano de 3,887 anos, com um R-quadrado ajustado de 0,51 e um coeficiente de regressão de 0,83 (Figura 2). Além disso, encontramos um erro absoluto mediano da idade prevista versus real de 3,41 anos. O erro médio de 1,48 anos pode indicar que as mulheres de nossa coorte provavelmente são mais jovens do que o esperado. Para explorar isso, aplicamos uma regressão multilinear com gênero como uma variável adicional para toda a nossa coorte. Sexo não foi considerado um preditor estatisticamente significativo da idade cronológica no início do estudo (Tabela 2). Além disso, houve correlação linear estatisticamente significativa (p -valor=0,002) de 0,74 (IC 95%: 0,35 a 0,91) entre a idade estimada e a real no início do estudo para o sexo feminino. Em conclusão, dentro do contexto deste conjunto de dados limitado, não houve diferença estatística na capacidade preditiva do teste epigenético TruAge em relação a homens e mulheres.

Os participantes completaram uma pesquisa no início e no final do julgamento. Este questionário autorreferido incluía informações sobre dieta, ingestão de álcool, consumo anterior de Rejuvant®, saúde, altura e peso (que permitiam estimar o IMC), duração do sono, tabagismo, frequência de exercícios, nível de atividade física, frequência de refeições, lanches frequência, número de suplementos dietéticos adicionais consumidos e frequência, estado do cabelo, educação, mentalidade de estilo de vida saudável e confiança em suplementos dietéticos (Tabela Suplementar 1).

Aproveitamos as informações da pesquisa de linha de base para verificar se havia outros fatores de confusão em nossa coorte, realizando

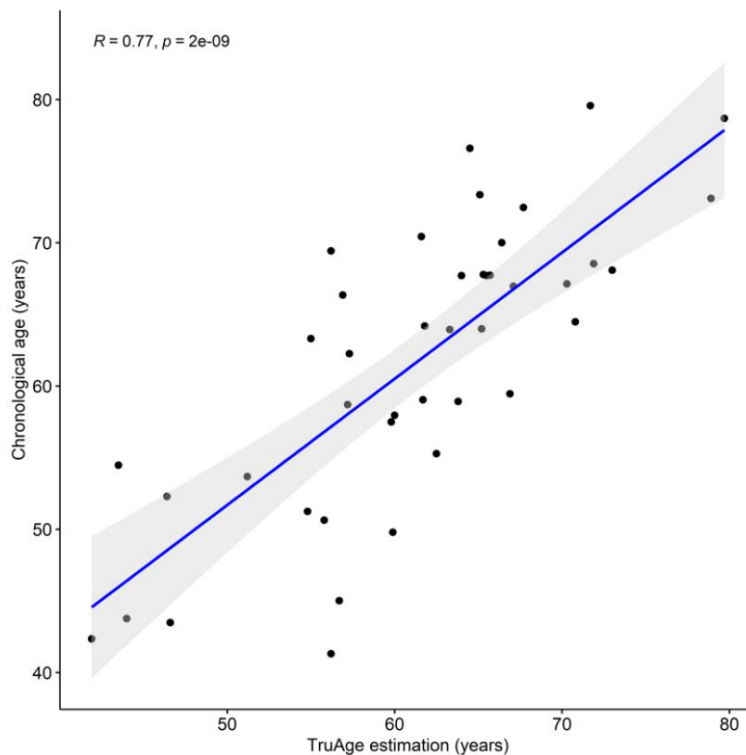


Figura 1. A estimativa de idade TruAge e a idade cronológica basal estão linearmente correlacionadas. A idade biológica TruAge é altamente (R-quadrado ajustado = 0,77) estatisticamente significativa (p -valor = 2×10^{-9}) correlacionada com a idade cronológica dos 42 pacientes.

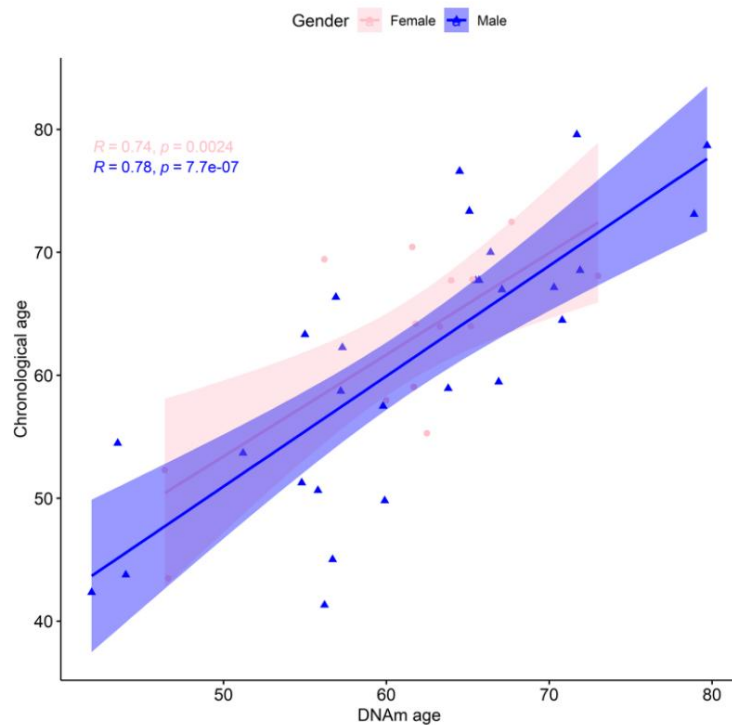


Figura 2. A estimativa de idade TruAge e a idade cronológica basal estão linearmente correlacionadas, em ambos os sexos. O eixo x representa a idade de metilação do DNA estimada pelo TruAge, e o eixo y a idade cronológica dos 42 pacientes na linha de base. Os gráficos de correlação linear rosa e azul representam a correlação linear estatisticamente significativa e similar entre ambos os eixos, para pacientes do sexo feminino e masculino, respectivamente.

Tabela 2. Efeito do Rejuvant® na idade biológica dos participantes do estudo.

Distribuições de idade biológica	Participantes do sexo masculino (em anos)	Participantes do sexo feminino
Idade Biológica Mínima na Linha de Base	(em anos) 41,9	46,4
Idade biológica mediana na linha de base	61,85	62,15
Idade biológica média na linha de base	61,38	61,09
Idade biológica máxima na linha de base	79,7	73
Idade Biológica Mínima em T7*	33	33,4
Idade biológica mediana em T7*	53,3	55,55
Idade Biológica Média em T7*	53,53	54,66
Idade Biológica Máxima em T7*	74,9	63,7
Mudança mínima na idade biológica	-1,86	-0,41
Mudança mediana na idade biológica	7,09	5,83
Mudança média na idade biológica	8,44	6,98
Mudança máxima na idade biológica	22,7	14,09

*Indica a idade biológica medida pelo teste TruMe após uma média de sete meses de tratamento.

uma regressão linear multivariável. Devido ao número considerável de variáveis preditivas, realizamos uma regressão linear stepwise. Embora houvesse covariáveis adicionais selecionadas no modelo stepwise, quando este foi comparado, por meio de análise de variância, com a regressão linear univariada mais simples usando apenas a idade estimada pelo TruAge, o valor de p obtido foi de 0,12 (Tabela Complementar 2). Isso indica que em termos de comparação, os dois modelos não são estatisticamente significativamente diferentes e, portanto, o modelo mais simples foi selecionado.

Era de interesse determinar se a diferença entre a idade cronológica e o TruAge está relacionada ao estilo de vida ou a fatores demográficos. Em outras palavras, é importante avaliar se essas covariáveis estão associadas a indivíduos biologicamente mais jovens ou mais velhos. Selecionamos IMC, consumo de álcool, saúde autoavaliada, duração do sono, histórico de tabagismo, frequência e intensidade de exercícios e abundância de cabelo como variáveis preditoras, uma vez que esse subconjunto das informações coletadas da pesquisa pode estar claramente associado e/ou influenciar a idade biológica. A regressão linear stepwise não encontrou associação estatisticamente significativa entre nenhuma dessas variáveis com a diferença entre idade cronológica e biológica TruAge (Tabela Complementar 2). É importante ressaltar que o número de participantes é bastante pequeno (por exemplo, havia um fumante e apenas 6 relataram história de tabagismo). Portanto, é provável que um ou mais desses parâmetros de estilo de vida influenciem a idade biológica medida pelo teste TruAge e que um conjunto de dados maior descubra associações.

Resultados do consumo de CaAKG na idade biológica

O objetivo do estudo foi determinar o efeito de Suplementação Rejuvant® no envelhecimento biológico humano

medindo a metilação do DNA. Após a medição da linha de base, cada participante do estudo recebeu Rejuvant® durante o estudo. Embora os participantes tenham sido aconselhados a usar o tratamento por 4 a 6 meses, houve diferenças individuais consideráveis na duração do tratamento. Após a conclusão do período de tratamento auto-escolhido, os participantes enviaram suas amostras de saliva para análise de sua idade biológica usando testes TruMe disponíveis comercialmente.

Com base nos questionários enviados no início e no final do estudo, identificamos um subconjunto de 13 indivíduos que não relataram mudanças no tipo de dieta, frequência de bebida, ingestão de suplementos dietéticos adicionais, duração do sono e frequência de exercícios. Este subconjunto homogêneo foi, portanto, usado para a avaliação preliminar do efeito independente de CaAKG, já que as outras covariáveis são controladas por projeto.

No início do estudo, esse subconjunto ou nossa coorte era, em média, 2,06 anos biologicamente mais jovem do que sua idade cronológica. No final do tratamento, esta subpopulação era em média 9,74 anos biologicamente mais jovem do que a respectiva idade cronológica. Usando o teste t pareado de duas amostras de Welch unilateral, essa diferença de média de 7,69 anos foi estatisticamente significativa, com um valor de p de $7,263 \times 10^{-5}$ (Figura 3). Vale ressaltar que todos os sujeitos desse pequeno grupo diminuíram sua idade biológica.

Depois de descobrir que a suplementação com CaAKG diminuiu consistentemente a idade epigenética em uma pequena população homogênea, continuamos avaliando seus efeitos em toda a coorte de 42 pacientes. No início do estudo, a coorte era em média 0,35 anos biologicamente mais jovem do que sua idade cronológica. Ao final do tratamento, esse valor passou para uma média de 8,31 anos biologicamente mais jovem que seus respectivos

Idade cronológica. Usando o teste t pareado de duas amostras de Welch unilateral, essa diferença em média de 7,96 anos foi estatisticamente significativa, com um valor p de $6,538 \times 10^{-12}$ (Figura 4).

A formulação do suplemento Rejuvant® é diferente para homens e mulheres. Mais especificamente, além do CaAKG, são adicionadas vitamina A e vitamina D

à formulação comercial masculina ou feminina, respectivamente (ver Métodos). Independentemente disso, o efeito da suplementação com Rejuvant® diminuiu a idade epigenética de maneira estatisticamente significativa em homens e mulheres (Figura 5). A diminuição média pareada é de 8,44 anos nos homens e 6,98 anos nas mulheres. Apenas 2 indivíduos (1 homem e 1 mulher) apresentaram um ligeiro aumento da idade biológica.

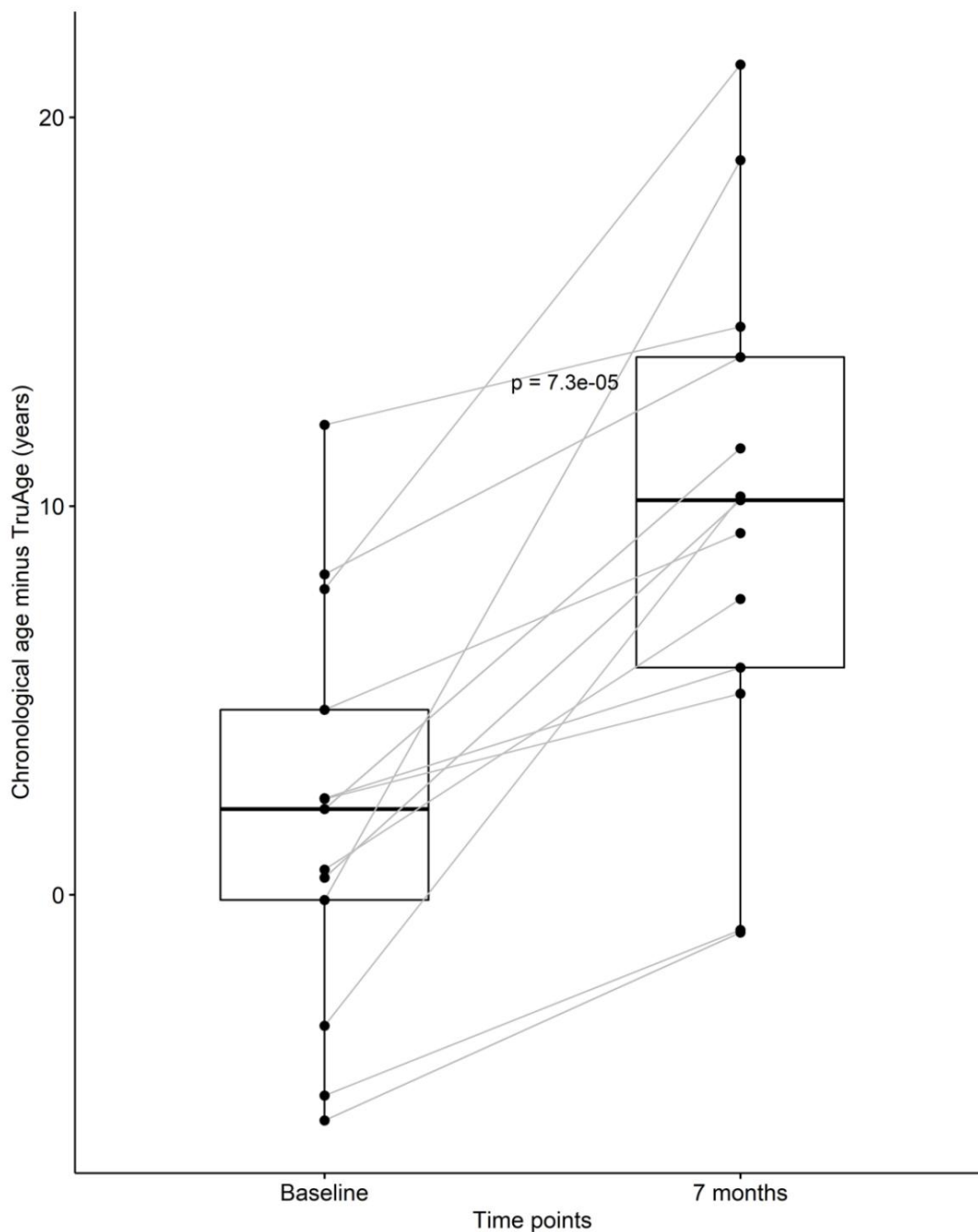


Figura 3. CaAKG diminuiu a idade de metilação entre uma subpopulação homogênea. Os gráficos de caixa pareados representam os efeitos do tratamento no nível do paciente e do grupo ($n=13$), entre a linha de base e o final do estudo (que teve uma duração média de 7 meses). Os diagramas de caixa representam a mediana e os 25º e 75º quartis.

A validade da análise estatística usando toda a coorte é baseada na modelagem de covariáveis, para a detecção de variáveis que resultam em uma diferença estatisticamente significativa no teste de metilação do DNA TruMe, usamos regressões passo a passo iterativamente. Esse procedimento culminou no modelo mais parcimonioso usando apenas a idade cronológica basal e a diferença na idade biológica (em relação à sua idade cronológica)

idades cronológicas e biológicas basais, como os únicos preditores estatisticamente significativos da magnitude da diminuição da idade epigenética pelo Rejuvant®. Assim, modelamos o efeito da suplementação de Rejuvant® na idade de metilação como uma regressão linear dessas duas variáveis. Esses dados indicam que aquelas pessoas

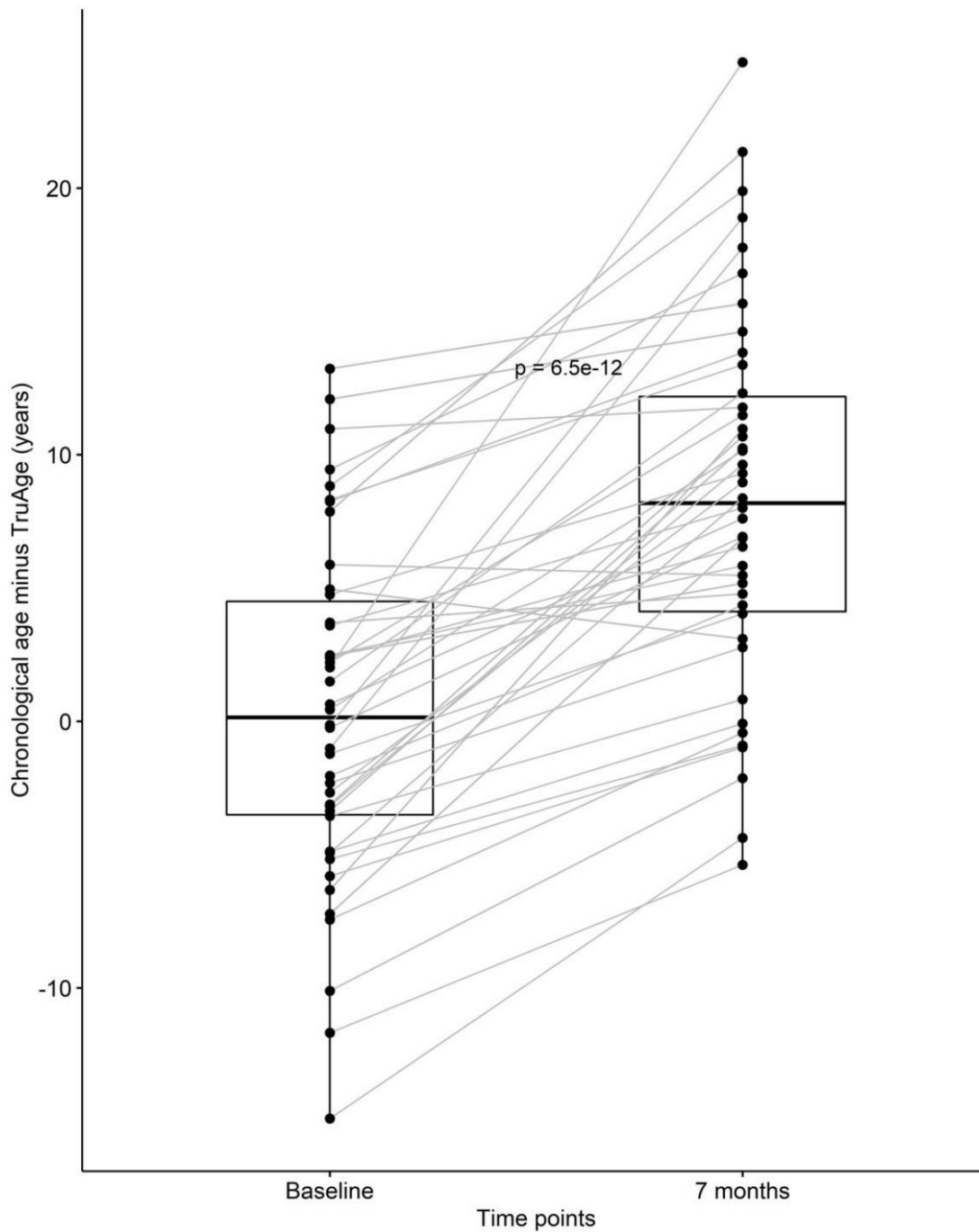


Figura 4. CaAKG diminuiu a idade de metilação em toda a coorte. Os diagramas de caixa pareados representam os efeitos do tratamento no nível do paciente e do grupo (n=42), entre a linha de base e o final do estudo (que teve uma duração média de 7 meses). Os diagramas de caixa representam a mediana e os 25º e 75º quartis.

e/ou pessoas com idade cronológica inicial alta têm a maior resposta ao Rejuvant®.

Usando o modelo reduzido final, com apenas as duas variáveis encontradas estatisticamente relacionadas com uma diminuição na idade epigenética ao longo do tratamento, a diferença de idade epigenética (em anos) de cerca de 7 meses de suplementação de CaAKG pode ser modelada pelo equação:

$$\text{Redução na Verdadeira idade} + \hat{y} = \text{Idade} - 0,22 = \hat{y} - 0,45 \hat{y} \text{ idade diferente}$$

com “idade” representando a idade cronológica no início do tratamento e “diffAge” definida como a diferença entre a idade cronológica e a idade TruMe na linha de base. O plano que representa esta regressão é representado (Figura 6).

Curiosamente, a duração do tratamento não está correlacionada com a magnitude do efeito da suplementação com Rejuvant®. Isso indica que a duração mediana do tratamento de nossa coorte, aproximadamente 7 meses, pode ser suficiente para saturar os benefícios da suplementação.

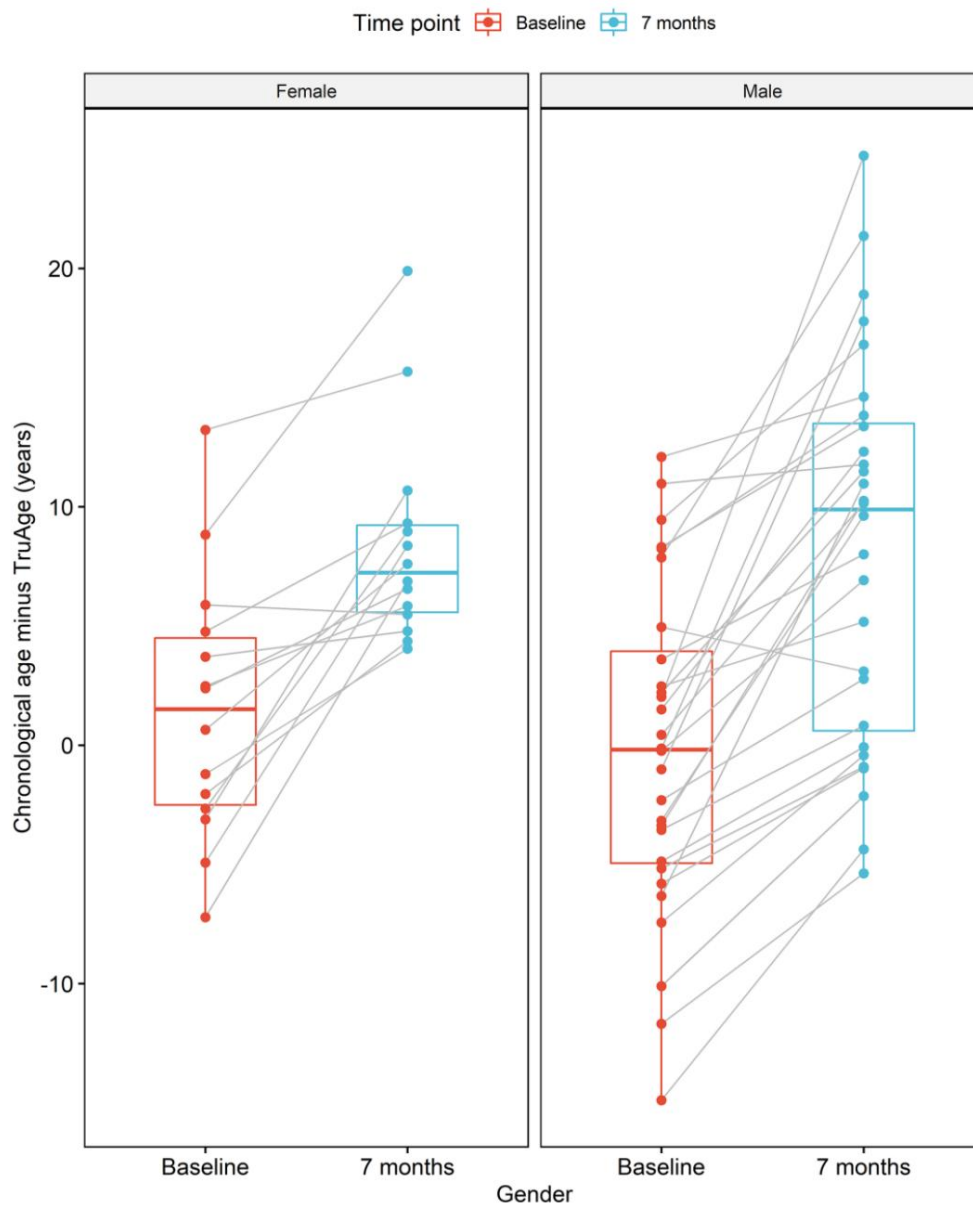


Figura 5. CaAKG diminui a idade de metilação independentemente do gênero. A imagem exibe os efeitos do CaAKG na idade de metilação entre o início e o final do tratamento, discriminados por sexo. Para cada gênero, os gráficos de caixa pareada vermelha e azul representam os dados na linha de base e no ponto final, respectivamente. Os boxplots são baseados na mediana e nos 25º e 75º quartis.

Curiosamente, esse achado é consistente com extrapolações matemáticas de um estudo em larga escala de medições de hemograma completo, que prevê que os efeitos de uma intervenção na longevidade em uma população saudável serão saturados em um curto período de tempo [30]. Este mesmo estudo previu que os benefícios de tais intervenções seriam maiores em indivíduos mais próximos de um estado de fragilidade, consistente com nossos dados.

Dito isto, restam muito poucos dados sobre o uso prolongado de Rejuvant® ou doses mais altas do produto, e outros efeitos sobre a idade biológica são viáveis. Também não medimos se os benefícios na idade biológica são perdidos se o suplemento for descontinuado, portanto, a suplementação contínua pode ser necessária para manter os efeitos observados.

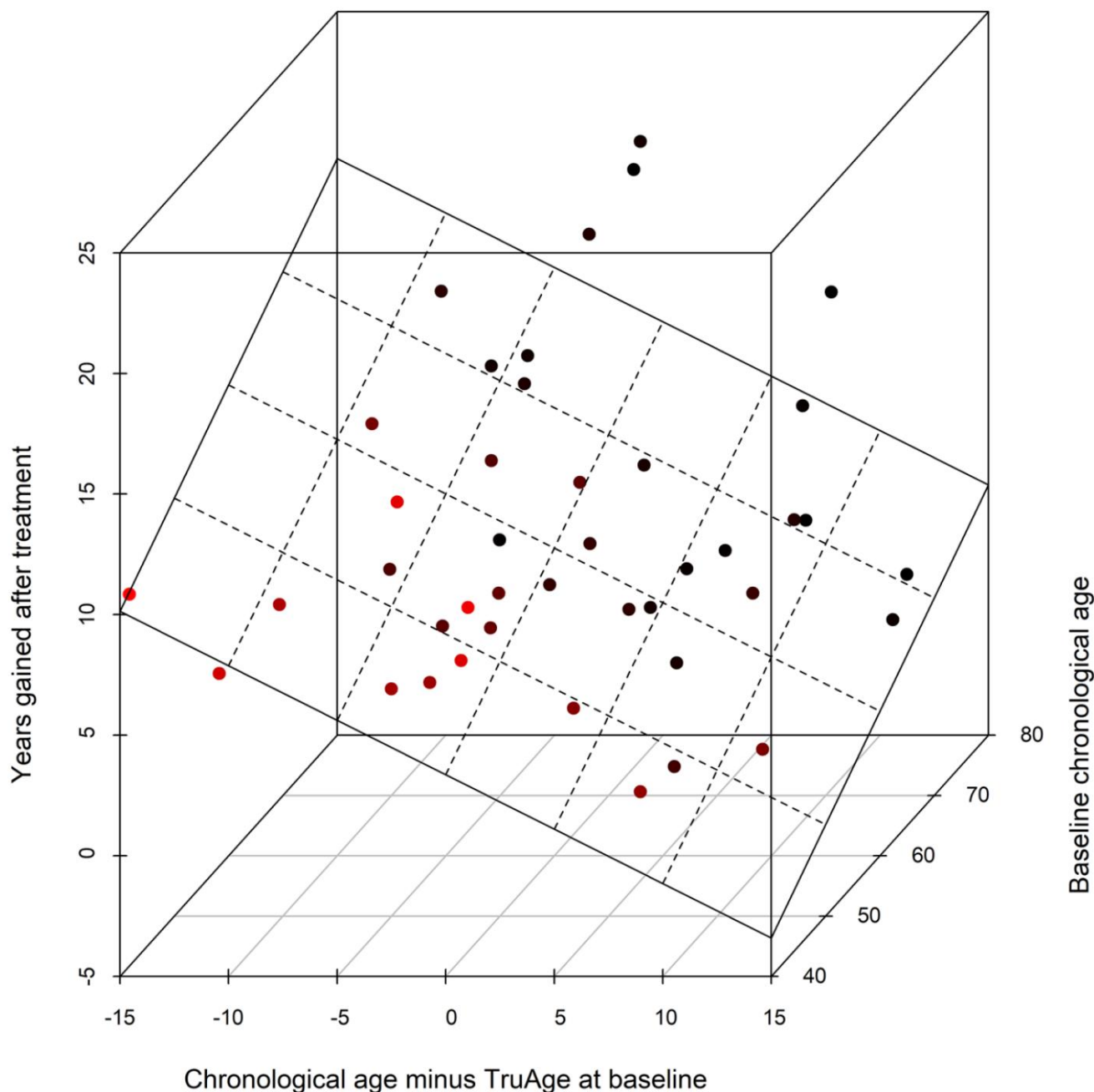


Figura 6. Gráfico de dispersão 3D das covariáveis que influenciam a eficácia do tratamento com CaAKG. O eixo x refere-se à diferença, em anos, entre as idades cronológica e biológica no início do estudo (um paciente em um estado mais velho terá maior valor positivo). O eixo y representa o efeito do tratamento com CaAKG em termos de anos em que a idade de metilação diminuiu (valores mais altos indicam maiores benefícios). O eixo z é a idade cronológica na linha de base (pacientes mais velhos serão "mais profundos"). O plano 3D foi traçado usando a regressão linear de ambas as covariáveis para o efeito do tratamento.

DISCUSSÃO

O AKG demonstrou prolongar a vida útil em vários sistemas de modelos. Neste estudo, usamos um algoritmo desenvolvido anteriormente que prevê a idade biológica humana para determinar se Rejuvant®, vitaminas CaAKG + de liberação sustentada, tem um efeito benéfico na longevidade humana. Um total de 42 indivíduos, conhecidos por tomar Rejuvant® e que enviaram amostras de saliva para teste de metilação de DNA, foram selecionados para participar de uma pesquisa e análise de resultados de envelhecimento biológico do cliente.

Seu DNAm TruAge Index foi medido na linha de base (antes de iniciar o Rejuvant®) e testado novamente após uma média de 7 meses de uso. No geral, esses 42 indivíduos apresentaram redução média estatisticamente significativa em sua idade biológica de aproximadamente 8 anos.

O pensamento geral no campo de pesquisa do envelhecimento é que as intervenções provavelmente afetarão subconjuntos da população, e nenhuma intervenção (estilo de vida ou pequena molécula) irá atrasar ou reduzir a idade biológica em toda a população. Surpreendentemente, neste grupo, a grande maioria dos participantes respondeu com uma idade biológica reduzida após o tratamento com Rejuvant®. Embora o estudo tenha limitações (descritas abaixo), essas descobertas são animadoras. Curiosamente, houve dois parâmetros que influenciaram a magnitude da resposta: os participantes com maior idade biológica em relação à idade cronológica e aqueles com maior idade cronológica no início do estudo. Isso sugere, talvez ao contrário das expectativas, dado o papel conhecido do AKG no aumento do desempenho do exercício, que o Rejuvant® tem uma resposta maior em participantes biologicamente mais velhos do que sua idade cronológica. Pode-se também prever esse resultado para uma intervenção de longevidade com base na hipótese de que indivíduos com idade biológica relativa baixa já estão passando por um envelhecimento quase otimizado e têm menos a ganhar. Atualmente, não há dados suficientes sobre o envelhecimento humano para prever quais populações responderão a uma determinada intervenção.

O teste de metilação TruAge, que permanece proprietário, foi desenvolvido examinando um número limitado de locais de metilação em ilhas CpG de promotores, com base na otimização para a idade cronológica usando uma abordagem de aprendizado de máquina. Embora examine uma porção menor do genoma do que outros relógios de metilação, tem a vantagem de ser mais acessível. Além disso, o teste TruAge é facilmente utilizado pelos consumidores, que colocam a saliva em um cartão de papel e enviam pelo correio a amostra para análise. O teste TruAge mostrou resultados semelhantes quando comparado a outros relógios epigenéticos (não publicados), mas testes adicionais usando outros relógios de metilação e diferentes biomarcadores de envelhecimento seriam benéficos para medir os efeitos do Rejuvant®

sobre a longevidade humana. Uma questão fundamental em relação a diferentes medidas de envelhecimento biológico diz respeito ao seu nível de concordância: elas medem aspectos iguais, sobrepostos ou completamente diferentes do processo de envelhecimento?

Os dados deste estudo, embora limitados, sugerem que o CaAKG pode realmente afetar o envelhecimento, pelo menos conforme medido pela metilação. Também é importante notar que AKG é um substrato conhecido para DNA desmetilases [31], que potencialmente desmetilam sítios de DNA interrogados por TruAge. No entanto, a suplementação com AKG leva à desmetilação e à hipermetilação de alguns locais CpG nas células da saliva, sugerindo que Rejuvant® pode ter um efeito maior nos relógios de envelhecimento baseados em metilação do que outros indicadores de idade biológica.

Existem várias limitações para este estudo. Principalmente, não é controlado por placebo. Portanto, uma preocupação potencial é que o efeito placebo pode ter contribuído de alguma forma para as mudanças observadas. No entanto, a confiança autorreferida na eficácia dos suplementos dietéticos não foi considerada um preditor estatisticamente significativo em nenhum de nossos modelos de regressão, o que atenua o risco até certo ponto. Além disso, o estudo descreve um tamanho de amostra limitado e não conseguimos coletar outros tipos de dados relevantes para o envelhecimento, por exemplo, marcadores clínicos de envelhecimento e doença, e aplicar outros relógios biológicos de envelhecimento [6]. Futuros ensaios clínicos randomizados serão necessários para confirmar os achados aqui apresentados. No entanto, os resultados deste manuscrito sugerem que o Rejuvant® pode ter efeitos significativos na idade biológica medida pela metilação do DNA de amostras de saliva.

MATERIAIS E MÉTODOS

participantes

Um grupo de 42 indivíduos autodeclarados saudáveis (14 mulheres e 28 homens) que enviaram amostras de saliva (duas amostras por indivíduo). Amostras de saliva foram coletadas na linha de base (T0) e 4-10 meses após o participante começar a tomar Rejuvant® (T7) em uma dose fixa de dois comprimidos por dia. Cada dose continha 1 grama de alfa-cetoglutarato de cálcio, juntamente com vitamina A para a formulação do participante do sexo masculino ou vitamina D para a formulação da participante do sexo feminino, e entregue em uma formulação de liberação programada, conforme ilustrado nos rótulos da formulação.

O TruMe identificou os participantes do estudo prospectivo de todos os clientes com dois testes de DNAm previamente concluídos (uma linha de base antes de iniciar e um segundo teste de 4 a 10 meses de suplementação com Rejuvant®(R). suplementação na dieta, exercício, sono, álcool

consumo, tabagismo e uso de suplementos nutricionais.

O formulário de consentimento incluía a seguinte declaração: "TruMe gostaria de ter sua permissão para usar seus resultados de idade biológica para fins científicos e acadêmicos. Você sempre será anônimo e nenhuma informação de identificação pessoal será compartilhada.

O TruMe não usa o sequenciamento completo do genoma e, portanto, não gera nem mantém nenhum dado geneticamente identificável.

Nunca vendemos seus dados ou informações pessoais." Os participantes que forneceram o consentimento apropriado seguindo os princípios do GCP foram incluídos no estudo. A análise dos dados dos participantes foi realizada de forma agregada e anônima (Tabela 1).

Vitamina A (como palmitato de retinol) 900 mcg 100%
Cálcio 190 mg 15%

Alfa-cetogluturato de cálcio
Monoidrato (LifeAKG™) 1000 mg †

Vitamina D 25 mcg
Cálcio 190 mg

Alfa-cetogluturato de cálcio
Monoidrato (LifeAKG™) 1000 mg

Coleta de amostras e sequenciamento de bissulfato

As amostras de saliva foram coletadas pelos próprios participantes em casa usando kits de amostragem TruMe disponíveis comercialmente.

Os participantes foram instruídos a coletar cerca de 200-300 mL de suas amostras de saliva em FTA Classic Cards (FTA Classic Cards, #WB120205, da GE Healthcare Life Sciences). As amostras de saliva foram deixadas secar ao ar por 30 a 45 minutos, antes de serem enviadas para o TruMe Labs.

Metilação do DNA e cálculo da idade do DNA

De cada amostra, círculos de 1 polegada de diâmetro foram obtidos e o DNA eluído com Quick-DNA Microprep Plus Kit (ZymoResearch, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. 200-500 ng de DNA eluído foram convertidos em bissulfato com o kit EZ DNA Methylation Lighting™ de acordo com as instruções do fabricante (ZymoResearch, CA, EUA). A amplificação por PCR de DNA convertido em bissulfato foi realizada usando iniciadores específicos de alvo padrão (IDT, Newark, NJ, EUA). A reação de PCR foi configurada usando ZymoTaq PreMix E2004 (ZymoResearch, CA, EUA).

Cada fragmento de PCR foi analisado usando o protocolo padrão de sequenciamento Sanger e os níveis de metilação foram analisados usando um algoritmo patenteado, desenvolvido pela TruMe Inc. O algoritmo de previsão de idade TruMe usa um

modelo multivariado para prever a idade biológica do indivíduo.

Análise estatística

Os dados foram analisados e os gráficos gerados usando a linguagem de programação R. Variáveis contínuas foram testadas quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk.

Nos casos em que falhamos em rejeitar a hipótese nula (valor de p não inferior a 0,05), o teste t pareado Welch de duas amostras unilateral foi usado; caso contrário, o teste pareado de postos sinalizados de Wilcoxon unilateral com correção de continuidade foi implantado]. As Figuras 1–5 foram feitas usando o pacote R 'ggpubr'. A Figura 6 foi criada usando o pacote R 'scatterplot3d' [33].

CONTRIBUIÇÕES DO AUTOR

OD ajudou no estabelecimento do teste TruMe Age e foi responsável por experimentos envolvendo seu uso.

DB realizou a análise estatística dos dados e participou da redação do manuscrito. VB auxiliou na análise estatística dos dados. RF auxiliou no controle e análise de qualidade dos dados, bem como na composição do manuscrito. FRP participou da concepção do estudo, redação do manuscrito e análise dos dados. BKK participou da concepção do estudo, redação do manuscrito e análise dos dados. YVB participou do estabelecimento do teste TruMe Age, desenho do estudo, redação do manuscrito e análise dos dados.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer aos membros do laboratório Kennedy no NUS, bem como aos funcionários do TruMe Labs e PDL Health pelos comentários sobre o manuscrito.

CONFLITOS DE INTERESSE

Em julho de 2019, a TruMe firmou um contrato não exclusivo de atendimento ao cliente para o teste de metilação de DNA de clientes da Ponce de Leon Health que tomam Rejuvant®. Nem a TruMe nem a Ponce de Leon Health têm propriedade cruzada ou outros interesses financeiros a relatar. BKK é consultor científico e membro do conselho da Ponce de Leon Health.

FINANCIAMENTO

Os dados para o manuscrito foram adquiridos de usuários do produto Rejuvant da Ponce de Leon Health e análise de metilação do DNA fornecida pela TruMe Labs. Os dados foram fornecidos à Universidade Nacional de Cingapura para análise estatística, que forneceu apoio financeiro para este componente do projeto.

REFERÊNCIAS

1. Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES, Franceschi C, Lithgow GJ, Morimoto RI, Pessin JE, Rando TA, Richardson A, Schadt EE, et al. Gerociência: ligando o envelhecimento às doenças crônicas. *Célula*. 2014; 159:709–13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.039> PMID:25417146

2. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. As marcas do envelhecimento. *Célula*. 2013; 153:1194–217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039> PMID:23746838

3. Kennedy BK, Pennypacker JK. Drogas que modulam o envelhecimento: o caminho promissor, mas difícil pela frente. *Transl Res*. 2014; 163:456–65. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.11.007> PMID:24316383

4. Wagner KH, Cameron-Smith D, Wessner B, Franzke B. Biomarcadores do Envelhecimento: Da Função à Biologia Molecular. *Nutrientes*. 2016; 8:338. <https://doi.org/10.3390/nu8060338> PMID:27271660

5. Justice JN, Ferrucci L, Newman AB, Aroda VR, Bahnon JL, Divers J, Espeland MA, Marcovina S, Pollak MN, Kritchevsky SB, Barzilai N, Kuchel GA. Uma estrutura para seleção de biomarcadores baseados em sangue para ensaios clínicos guiados por gerociência: relatório do Grupo de Trabalho de Biomarcadores TAME. *Gerociência*. 2018; 40:419–36. <https://doi.org/10.1007/s11357-018-0042-y> PMID:30151729

6. Kudryashova KS, Burka K, Kulaga AY, Vorobyeva NS, Kennedy BK. Biomarcadores de Envelhecimento: De Testes Funcionais a Abordagens Multi-Omics. *Proteômica*. 2020; 20:e1900408. <https://doi.org/10.1002/pmic.201900408> PMID:32084299

7. Cavalli G, Heard E. Os avanços na epigenética vinculam a genética ao meio ambiente e às doenças. *Natureza*. 2019; 571:489–99. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1411-0> PMID:31341302

8. Unnikrishnan A, Freeman WM, Jackson J, Wren JD, Porter H, Richardson A. O papel da metilação do DNA na epigenética do envelhecimento. *Pharmacol Ther*. 2019; 195:172–85. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.11.001> PMID:30419258

9. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, et al. Todo o genoma perfis de metilação revelam visões quantitativas das taxas de envelhecimento humano. *Célula Mol*. 2013; 49:359–67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.016> PMID:23177740

10. Jin B, Li Y, Robertson KD. Metilação do DNA: superior ou subordinada na hierarquia epigenética? *Gene Câncer*. 2011; 2:607–17. <https://doi.org/10.1177/1947601910393957> PMID:21941617

11. Teschendorff AE, West J, Beck S. Deriva epigenética associada à idade: implicações e um caso de economia epigenética? *Hum Mol Genet*. 2013; 22: R7–15. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt375> PMID:23918660

12. Horvath S. idade de metilação do DNA de tecidos humanos e tipos de células. *Genoma Biol*. 2013; 14:R115. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115> PMID:24138928

13. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, Vilain E. Preditor epigenético da idade. *PLoS One*. 2011; 6:e14821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014821> PMID:21731603

14. Breitling LP, Saum KU, Perna L, Schöttker B, Holleczeck B, Brenner H. A fragilidade está associada ao relógio epigenético, mas não ao comprimento dos telômeros em uma coorte alemã. *Clin Epigenética*. 2016; 8:21. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0186-5> PMID:26925173

15. Marioni RE, Shah S, McRae AF, Ritchie SJ, Muniz Terrera G, Harris SE, Gibson J, Redmond P, Cox SR, Pattie A, Corley J, Taylor A, Murphy L, et al. O relógio epigenético está correlacionado com a aptidão física e cognitiva na Lothian Birth Cohort 1936. *Int J Epidemiol*. 2015; 44:1388–96. <https://doi.org/10.1093/ije/dyu277> PMID:25617346

16. Horvath S, Erhart W, Brosch M, Ammerpohl O, von Schönfels W, Ahrens M, Heits N, Bell JT, Tsai PC, Spector TD, Deloukas P, Siebert R, Sipos B, et al. A obesidade acelera o envelhecimento epigenético do fígado humano. *Proc Natl Acad Sci EUA*. 2014; 111:15538–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412759111> PMID:25313081

17. Horvath S, Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, Salvioli S, Gentilini D, Di Blasio AM, Giuliani C, Tung S, Vinters HV, Franceschi C. Envelhecimento epigenético acelerado na síndrome de Down. *Célula Envelhecida*. 2015; 14:491–95. <https://doi.org/10.1111/accel.12325> PMID:25678027

18. Lagathu C, Cossarizza A, Bérézziat V, Nasi M, Capeau J, Pinti M. Ciência básica e patogênese do envelhecimento com HIV: mecanismos potenciais e biomarcadores. *AIDS*. 2017 (Supl 2); 31:S105–19.

- <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001441>
PMID:28471941
19. Horvath S, Ritz BR. Aumento da idade epigenética e contagem de granulócitos no sangue de pacientes com doença de Parkinson. *Envelhecimento* (Albany NY). 2015; 7:1130–42. <https://doi.org/10.18632/aging.100859> PMID:26655927
20. Levine ME, Lu AT, Bennett DA, Horvath S. A idade epigenética do córtex pré-frontal está associada a placas neuríticas, carga amilóide e funcionamento cognitivo relacionado à doença de Alzheimer. *Envelhecimento* (Albany NY). 2015; 7:1198–211. <https://doi.org/10.18632/aging.100864> PMID:26684672
21. Ambatipudi S, Horvath S, Perrier F, Cuenin C, Hernandez-Vargas H, Le Calvez-Kelm F, Durand G, Byrnes G, Ferrari P, Bouaoun L, Sklias A, Chajes V, Overvad K, et al. A análise do metiloma do DNA identifica o envelhecimento epigenético acelerado associado à suscetibilidade ao câncer de mama na pós-menopausa. *Eur J Câncer*. 2017; 75:299–307. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.01.014> PMID:28259012
22. Zannas AS, Arloth J, Carrillo-Roa T, Iurato S, Röh S, Ressler KJ, Nemeroff CB, Smith AK, Bradley B, Heim C, Menke A, Lange JF, Brückl T, et al. O estresse ao longo da vida acelera o envelhecimento epigenético em uma coorte urbana afro-americana: relevância da sinalização de glicocorticóides. *Genoma Biol*. 2015; 16:266. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0828-5> PMID:26673150
23. Asadi Shahmirzadi A, Edgar D, Liao CY, Hsu YM, Lucanic M, Asadi Shahmirzadi A, Wiley CD, Gan G, Kim DE, Kasler HG, Kuehnemann C, Kaplowitz B, Bhaumik D, et al. Alfa-cetogluturato, um metabólito endógeno, prolonga a expectativa de vida e comprime a morbidade em camundongos idosos. *Célula Metab*. 2020; 32:447–56.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.08.004> PMID:32877690
24. Xiao D, Zeng L, Yao K, Kong X, Wu G, Yin Y. O metabolismo da glutamina-alfa-cetogluturato (AKG) e suas implicações nutricionais. *Aminoácidos*. 2016; 48:2067–80. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2254-8> PMID:27161106
25. Wu N, Yang M, Gaur U, Xu H, Yao Y, Li D. Alfa Cetogluturato: Aplicações Fisiológicas e Funções. *Biomol Ther* (Seul). 2016; <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.078> PMID:26759695
26. Zdzisińska B, Jurek A, Kandefer-Szerszeń M. Alfa Cetogluturato como uma molécula com atividade pleiotrópica: possibilidades bem conhecidas e novas de uso terapêutico. *Arch Immunol Ther Exp* (Warsz). 2017; 65:21–36. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0406-x> PMID:27326424
27. Harrison AP, Pierzynowski SG. Efeitos biológicos do 2-oxogluturato com ênfase particular na regulação da absorção/metabolismo de proteínas, minerais, eletrólitos, sistema cardiovascular, sistema nervoso, envelhecimento saudável - artigo de revisão. *J Physiol Pharmacol*. 2008 (Supl 1); 59:91–106. PMID:18802218
28. Chin RM, Fu X, Pai MY, Vergnes L, Hwang H, Deng G, Diep S, Lomenick B, Meli VS, Monsalve GC, Hu E, Whelan SA, Wang JX, et al. O metabólito γ cetogluturato prolonga o tempo de vida inibindo a ATP sintase e TOR. *Natureza*. 2014; 510:397–401. <https://doi.org/10.1038/nature13264> PMID:24828042
29. Liao CY, Kennedy BK. Modelos de camundongos e envelhecimento: longevidade e progeria. *Curr Top Dev Biol*. 2014; 109:249–85. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397920-9.00003-2> PMID:24947239
30. Pyrkov TV, Avchaciov K, Tarkhov AE, Menshikov LI, Gudkov AV, Fedichev PO. A análise longitudinal de marcadores sanguíneos revela perda progressiva de resiliência e prevê limite de vida humana. *Nat Comun*. 2021; 12h2765. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23014-1> PMID:34035236
31. Salminen A, Kauppinen A, Hiltunen M, Kaarniranta K. Os intermediários do ciclo de Krebs regulam a metilação do DNA e das histonas: impacto epigenético no processo de envelhecimento. *Aging Res Rev*. 2014; 16:45–65. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.05.004> PMID:24910305
32. Runyon NP. Estatística não paramétrica: uma abordagem contemporânea. Addison-Wesley Publishing Company. 1977.
33. Ligges U, Maechler M. scatterplot3d - Um pacote R para visualizar dados multivariados. *J Stat Softw*. 2003; 8:1–20. <https://doi.org/10.18637/jss.v008.i11>

MATERIAIS COMPLEMENTARES

Tabelas Suplementares

Navegue pela versão Full Text para ver os dados da Tabela Complementar 2.

Tabela complementar 1. Características dos participantes na linha de base.

	Fêmea	Macho
n	14	28
Etnia (%)		
asiático	1 (7,1)	1 (3,6)
hispanico/latino	(7,1) 12	(3,6) 23
Branco/Caucasiano	(85,7) 0	(82,1) 2
Branco/caucasiano, índio americano ou nativo do Alasca	(0,0) 0	(7,1) 1
Branco/caucasiano, nativo havaiano ou outro ilhéu do Pacífico	(0,0)	(3,6)
Idade cronológica T0 (média (DP))	62,57 (8,11)	61,16 (11,03)
Idade cronológica T7* (média (DP))	63,12 (8,11)	61,76 (11,01)
Idade Biológica T0 (média (DP))	61,09 (7,27)	61,38 (9,64)
Idade Biológica T7* (média (DP))	54,66 (8,17)	53,53 (8,62)
Consumo semanal de álcool em bebidas (%)		
0	5 (35,7)	5 (17,9)
1 a 4	2 (14,3)	10 (35,7)
5 a 8	6 (42,9)	(28,6) 5
9 a 14	1 (7,1)	(17,9)
Número atual de suplementos dietéticos (%)		
0	2 (14,3)	4 (14,3)
1 a 2	4 (28,6)	(10,7) 6
3 a 4	5 (35,7)	(21,4) 15
5	3 (21,4)	(53,6)
Saúde geral autoavaliada (%)		
Moderado	1 (7,1)	1 (3,6)
Bom	7 (50,0)	9 (32,1)
Muito bom	6 (42,9)	18 (64,3)
Duração do sono (%)		
4-6 horas	1 (7,1)	2 (7,1)
7-8 horas	13 (92,9)	24 (85,7)
Mais de 8 horas	0 (0,0)	(7,1)
Histórico de tabagismo (%)		
Ex-fumante, mas parou	3 (21,4)	3 (10,7)
Nunca fumante		
Frequência de exercício semanal (%)		
Raramente 1-2 vezes/semana	1 (7,1)	0 (0,0)
3+ vezes/semana	0 (0,0)	5 (17,9)
Diário	(50,0) 6	17 (60,7)
Diário	(42,9)	6 (21,4)
IMC (média (DP))	21,84 (2,60)	25,70 (3,97)
Dias de tratamento (média (DP))	200,57 (35,78)	218,36 (41,57)
Educação (%)		
Diploma do ensino médio (ou GED)	1 (7,1)	0 (0,0)
Alguma faculdade	3 (21,4)	4 (14,3)
Diploma universitário de 4 anos	2 (14,3)	10 (35,7)
Pós-graduação	8 (57,1)	14 (50,0)
Número médio de refeições diárias (%)		
2	6 (42,9)	11 (39,3)

3	7 (50,0) 1	14 (50,0) 3
4 ou mais	(7,1)	(10,7)
Número de lanches diários (%)		
1	6 (42,9)	18 (64,3) 8
2	6 (42,9)	(28,6) 2
3	2 (14,3)	(7,1)
Opinião sobre suplementos alimentares (%)		
cético	2 (14,3) 2	3 (10,7) 0
sem opinião	(14,3) 6	(0,0) 4
Interessado	(42,9) 4	(14,3) 21
crente firme	(28,6)	(75,0)
Frequência semanal de suplementos dietéticos (%)		
Nunca	1 (7,1) 0	0 (0,0)
Raramente	(0,0) 13	1 (3,6)
Diário	(92,9)	27 (96,4)
Mentalidade de vida saudável (%)		
Pronto para começar	1 (7,1)	1 (3,6)
praticando	10 (71,4) 3	15 (53,6)
dedicada	(21,4)	12 (42,9)
Nível de atividade (%)		
Sedentário	1 (7,1) 2	2 (7,1) 5
Levemente ativo	(14,3) 5	(17,9) 12
Ativo	(35,7) 6	(42,9) 9
Muito ativo	(42,9) 0	(32,1) 0
Atlético	(0,0)	(0,0)
Cabelo (%)		
Careca	0 (0,0) 5	4 (14,3)
Desbaste	(35,7) 9	11 (39,3)
Grosso e/ou Cheio	(64,3)	13 (46,4)

*Indica a idade biológica medida pelo teste TruMe após uma média de sete meses de tratamento.

Tabela Complementar 2. Modelos de regressão utilizados (com coeficientes).