

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

NICOLE DE MELO LEONI

Modulação dietética utilizando lipídios e resveratrol
na senescência e formação do pufe *Hsp22*
em *Drosophila melanogaster*

RECIFE
2012

NICOLE DE MELO LEONI

Modulação dietética utilizando lipídios e resveratrol
na senescência e formação do pufe *Hsp22*
em *Drosophila melanogaster*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal de Pernambuco
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do grau
de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira dos Santos
Co-orientador: Dr. Gilson Luis da Cunha

RECIFE
2012

NICOLE DE MELO LEONI

Modulação dietética utilizando lipídios e resveratrol
na senescência e formação do pufe *Hsp22*
em *Drosophila melanogaster*

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Titular: Prof^a. Dr^a. Cláudia Rohde,
Núcleo de Biologia, CAV/UFPE

Titular: Prof. Dr. Otacílio Antunes Santana
Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CCB/UFPE

Titular: Prof^a. Dr^a. Tania Tassinari Rieger
Departamento de Genética, CCB/UFPE

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira dos Santos
Departamento de Genética/CCB/UFPE

Coordenador do PPGG: Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Departamento de Genética/CCB/UFPE

RECIFE
2012

RESUMO

Os efeitos do resveratrol e da utilização de lipídios em ensaio de restrição dietética (RD) sobre a senescência demográfica, a resposta neuromotora e a expressão do gene *Hsp22* foram analisados em cinco linhagens de *Drosophila melanogaster*. Ao contrário do previsto para RD utilizando proporção entre proteínas e carboidratos como variável, a utilização de lipídio alterou tanto a taxa de mortalidade inicial como a taxa de envelhecimento, além de surtir efeitos deletérios na fecundidade de fêmeas e no desempenho de machos no teste de geotaxia negativa. Fêmeas e machos atingiram maior longevidade em meio sem adição e com adição moderada de lipídios respectivamente. O resveratrol teve efeitos variados na longevidade, mas foi capaz de retardar a deterioração neuromotora em todas as linhagens, exceto na mutante *Sir2*-. Houve ocorrência de pufes *Hsp22* maiores em larvas criadas em meio hipercalórico controle e hipocalórico tratado com resveratrol. Esses resultados indicam que: (1) nem o conteúdo energético, nem a proporção entre carboidratos e proteínas podem explicar totalmente a longevidade em *D. melanogaster*; (2) os efeitos dos lipídios dietéticos foram dependentes do sexo, aparentando ser levemente tóxicos com efeito hormético em machos; (3) os mecanismos que influenciam longevidade e senescência funcional são, pelo menos parcialmente, distintos; (4) o resveratrol é capaz de retardar o declínio funcional locomotor e apresenta efeitos na longevidade dependentes do genótipo, sexo, diluição do meio e quantidade administrada, aparentando estar envolvido com *Sir2*; (5) ausência do alelo funcional *Sir2* pode regular positivamente *Hsp22*, o que explica maior longevidade dos mutantes *Sir2*- apesar da inatividade desta sirtuína; (6) aumento do nível de *Sir2* induzido por RD pode inibir a expressão de *Hsp22*, corroborando a hipótese do envolvimento da acetilação de histona na regulação dessa proteína; (7) resveratrol, entretanto, pode reverter esse processo por alterar a afinidade química de *Sir2* pelo locus de *Hsp22*.

Palavras-chave: envelhecimento; restrição dietética; lipídios; resveratrol; *Hsp22*.

ABSTRACT

The effects of resveratrol and dietary restriction (DR) using lipids on demographic senescence, neuromotor response and *Hsp22* gene expression were analyzed in five strains of *Drosophila melanogaster*. In contrast to DR employing the ratio of protein to carbohydrates as variable, the use of lipids modified both initial mortality rate and rate of aging. Females and males reached greater longevity on fat-free medium and on medium containing moderate quantity of lipids respectively. DR did not improve the performance of males in negative geotaxis assay and addition of lipids caused a decrease in fertility in females. Effects of resveratrol on longevity and mortality varied, but it was able to delay neuromotor deterioration in all strains, except on Sir-2 mutant. In general, there was occurrence of larger *Hsp22* puffs in larvae reared on hypercaloric medium control and on hypocaloric medium treated with resveratrol. These results indicate that: (1) neither energy content nor ratio of proteins to carbohydrates can fully predict the longevity of *D. melanogaster*; (2) the effects of dietary lipids on this organism are sex dependent and appear to be slightly toxic, with hormetic effect in males; (3) the mechanisms that influence longevity and functional senescence are, at least partially, distinct; (4) resveratrol can delay functional locomotive decline and its effects on longevity and mortality depend on its concentration, on the strain's genotype, sex and dilution of the medium, appearing to be involved with *Sir2*; (5) absence of functional *Sir2* allele can upregulate *Hsp22*, which can explain the greater longevity of *Sir2*- mutants, despite its sirtuin's inactivity; (6) increased level of *Sir2* induced by DR may inhibit the expression of *Hsp22*, supporting the hypothesis that histone acetylation is involved in regulating this protein; (7) resveratrol, however, can reverse this process by altering the chemical affinity of *Sir2* to *Hsp22*'s locus.

Key words: aging; dietary restriction; lipids; resveratrol; *Hsp22*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Restrição dietética e vias metabólicas envolvidas na regulação da longevidade	17
Figura 2	Aparato utilizado para realização do teste RING	26
Figura 3	Efeito da alteração lipídica dietética sobre a senescência demográfica em <i>Drosophila melanogaster</i>	32
Figura 4	Logaritmo natural da taxa de mortalidade de populações de <i>Drosophila melanogaster</i> submetidas às diferentes dietas	34
Figura 5	Longevidade média, máxima e índice de fecundidade de <i>Drosophila melanogaster</i> em resposta à alteração lipídica do meio em fêmeas	35
Figura 6	Desempenho de machos de <i>D. melanogaster</i> no teste RING	36
Figura 7	Longevidade média, máxima e deterioração da resposta neuromotora em resposta à alteração lipídica do meio em machos de <i>Drosophila melanogaster</i>	36
Figura 8	Efeitos da proporção de calorias procedentes de lipídios em relação a calorias de carboidratos e proteínas na longevidade e fecundidade de <i>Drosophila melanogaster</i>	38
Figura 9	Efeitos da proporção de calorias procedentes de lipídios em relação a calorias de carboidratos e proteínas no tempo de duplicação da taxa de mortalidade (MRDT) em <i>Drosophila melanogaster</i>	39
Figura 10	Efeitos da dieta e da administração do resveratrol sobre a sobrevivência demográfica de cinco linhagens de <i>Drosophila melanogaster</i>	44
Figura 11	Trajetória de mortalidade das linhagens OC, OP, OT, Swt e Sir2- de <i>Drosophila melanogaster</i> nos diferentes tratamentos	46
Figura 12	Desempenho de machos no teste RING das cinco linhagens de <i>Drosophila melanogaster</i> submetidas ao tratamento com resveratrol	47
Figura 13	Deterioração da resposta neuromotora dos machos de <i>Drosophila melanogaster</i> em resposta à alteração da diluição do meio e administração de resveratrol	48
Figura 14	Pufes do gene <i>Hsp22</i> na seção 67B2 do braço cromossômico 3L das linhagens de Oregon-R de <i>D. melanogaster</i>	51
Figura 15	Pufes do gene <i>Hsp22</i> na seção 67B2 do braço cromossômico 3L das linhagens Swt e Sir2- de <i>D. melanogaster</i>	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição dos meios α	23
Tabela 2	Composição dos meios β	23
Tabela 3	Composição dos meios γ	24
Tabela 4	Quantidade de indivíduos e células analisadas em cada tratamento para a quantificação da expressão dos pufes correspondentes aos genes <i>Sir2</i> e <i>Hsp22</i> de <i>Drosophila melanogaster</i> .	27
Tabela 5	Quantificação dos padrões de pufe	28
Tabela 6	Parâmetros de longevidade e mortalidade de <i>Drosophila melanogaster</i> no Meio α	31
Tabela 7	Parâmetros de longevidade e mortalidade de <i>Drosophila melanogaster</i> no Meio β	31
Tabela 8	Parâmetros de longevidade e mortalidade de <i>Drosophila melanogaster</i> no Meio γ	31
Tabela 9	Parâmetros de longevidade e mortalidade da linhagem OC de <i>Drosophila melanogaster</i> nos diferentes tratamentos.	40
Tabela 10	Parâmetros de longevidade e mortalidade da linhagem OP de <i>Drosophila melanogaster</i> nos diferentes tratamentos.	41
Tabela 11	Parâmetros de longevidade e mortalidade da linhagem OT de <i>Drosophila melanogaster</i> nos diferentes tratamentos.	41
Tabela 12	Parâmetros de longevidade e mortalidade da linhagem Swt de <i>Drosophila melanogaster</i> nos diferentes tratamentos.	42
Tabela 13	Parâmetros de longevidade e mortalidade da linhagem Sir2- de <i>Drosophila melanogaster</i> nos diferentes tratamentos	43
Tabela 14	Médias e desvio padrão dos tamanhos dos pufes das linhagens de <i>Drosophila melanogaster</i> de acordo com o meio de cultura	50
Tabela 15	Significância das diferenças das médias dos tamanhos dos pufes <i>Hsp22</i> da mesma linhagem de <i>Drosophila melanogaster</i> em relação à diluição e concentração de resveratrol.	52
Tabela 16	Significância das diferenças das médias de tamanho dos pufes <i>Hsp22</i> entre as diferentes linhagens de <i>Drosophila melanogaster</i> no mesmo tratamento.	52

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

-	Meio hipocalórico sem adição de resveratrol
-R	Meio hipocalórico com adição de 5 μ M de resveratrol
-RR	Meio hipocalórico com adição de 50 μ M de resveratrol
+	Meio hipercalórico sem adição de resveratrol
+R	Meio hipercalórico com adição de 5 μ M de resveratrol
+RR	Meio hipercalórico com adição de 50 μ M de resveratrol
%	Percentual
α	RoA (taxa de envelhecimento)
A	IMR (taxa de mortalidade inicial)
AGEs	“Advanced Glycation End-products”, Produtos finais de glicosilação avançada
AMPK	“AMP-activated protein kinase”, Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
bHLH	“basic helix-loop-helix”, proteínas básico-hélice-laço-hélice
C	Centígrado
cGMP	“Cyclic Guanosine Monophosphate”, Monofosfato cíclico de guanosina
Cm	Centímetro
DNA	“Deoxyribonucleic Acid”, Ácido desoxirribonucleico
e	Número de Euler = 2.71828
FOXO	“Forkhead Box transcription factors”, Fatores de transcrição caixa bifurcada
g/L	Gramas por litro
GRS	Glutathione redutase
GSH/GSSG	Glutathione (estado reduzido/oxidado)
HES	Família de proteínas bHLH
HSF-1	“Heat shock factor protein 1”, Proteína fator de choque térmico 1
<i>Hsp22</i>	Gene que codifica a proteína HSP22
Hsp22	“Heat Shock Protein 22”, Proteína de choque térmico 22
Hz	“Hazard”, Taxa de mortalidade instantânea
<i>idh</i>	Isosocitrato desidrogenase dependente de NADP
<i>idh</i> ^F	IDH <i>fast</i> , alelo rápido do gene <i>idh</i>
<i>idh</i> ^S	IDH <i>slow</i> , alelo devagar do gene <i>idh</i>
IGF-1	“Insulin-like growth factor 1”, Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IMR	“Initial Mortality Rate”, Taxa de mortalidade inicial ou basal
JNK	“c-Jun N-terminal Kinase”, Quinase c-Jun N-terminal
KO	“Knockout”, Nocaute, inativação de um gene
LDL	“Low-density lipoprotein”, Lipoproteína de baixa densidade
LMax	Longevidade Máxima
LMed	Longevidade Media
MD	Manipulação Dietética
ml	Mililitro
MRDT	“Mortality rate doubling time”, Tempo de duplicação da taxa de mortalidade
NAD ⁺ /NADH	“Nicotinamide Adenine Dinucleotide”, Nicotinamida adenina dinucleótido estado oxidado/reduzido
NADP ⁺ /NADPH	“Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate”, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (estado oxidado/reduzido)
NF-κβ	“Nuclear Factor Kappa-B”, Fator nuclear kappa-β
OC	Linhagem Oregon-R de <i>Drosophila melanogaster</i> controle, parental de OP e OT
OP	Linhagem Oregon-R de <i>Drosophila melanogaster</i> de desenvolvimento precoce, selecionada por mais de 1000 gerações
OT	Linhagem Oregon-R de <i>Drosophila melanogaster</i> de desenvolvimento tardio, selecionada por mais de 1000 gerações
P:C	Proporção entre proteínas e carboidratos
P-C:L	Proporção entre proteínas mais carboidrato e lipídios
P	Meio padrão sem adição de resveratrol
PEV	“Position-Effect Variegation”, Variação por efeito de posição
PKC/PKD	“Protein Kinase C/Protein Kinase D”, Proteínas quinase C/D
PML	“Promyelocytic Leukemia Protein”, Proteína de leucemia promielocítica
PR	Meio padrão com adição de 5 μM de resveratrol
PRR	Meio padrão com adição de 50 μM de resveratrol
q _x	Mortalidade idade-específica
RC	Restrição Calórica
RD	Restrição Dietética
RDL	Restrição Dietética utilizando Lipídios como variável nutricional
RDP:C	Restrição Dietética utilizando proporção entre Proteínas e Carboidratos como variável nutricional
rDNA	“ribosomal Deoxyribonucleic Acid”, ácido desoxirribonucleico ribossomal
RING	“Rapid Iterative Negative Geotaxis”, Repetição rápida de geotaxia

	negativa
RoA	“Rate of Aging”, Taxa de envelhecimento
ROS	“Reactive Oxygen Species”, Espécies reativas de oxigênio
rRNA	“ribosomal Ribonucleic Acid”, Ácido ribonucleico ribossomal
SAHF	“Senescence-Associated Heterochromatin Foci”, Formação de foci heterocromático associado à senescência
sHSP	“Small Heat Shock Proteins”, Pequenas proteínas de choque térmico
Sir2-	Linhagem de <i>Drosophila melanogaster</i> mutante gene <i>sir2</i> hipomórfico, revertente selvagem de <i>White</i> proveniente da linhagem Swt
Sir2	“Silent Information Regulator 2”, Proteína reguladora de informação silenciosa 2
SIRT	“Silent mating type Information Regulation 2 homolog”,
SIS	“Stress Induced Senescence”, Senescência induzida por estresse
Swt	Linhagem de <i>Drosophila melanogaster</i> selvagem para o gene <i>sir2</i> , marca fenotípica <i>white</i>
TOR	“Target of Rapamycin”, Alvo de rapamicina
U.S. FDA	“Food and Drugs Administration of the United States”, Administração de comidas e drogas dos Estados Unidos
μx	Taxa de mortalidade na idade x
V_f	Número de animais vivos no fim do intervalo de tempo
V_i	Número de animais vivos no início do intervalo de tempo
x	Versus

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1. Envelhecimento: estado da arte, paradigmas e teorias	3
2.2. Invertebrados como organismos modelo: <i>Drosophila melanogaster</i>	6
2.3. Genética do envelhecimento	9
2.3.1. Principais vias de sinalização	9
2.3.2. Gene <i>Sir2</i>	11
2.3.3. Gene <i>Hsp22</i>	13
2.4. Intervenções extensoras da longevidade	15
2.4.1. Modulação nutricional: restrição dietética	15
2.4.2. Resveratrol	18
3. Objetivos	21
3.1. Objetivo geral	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. Materiais e métodos	22
4.1. Linhagens e manutenção do estoque de <i>Drosophila melanogaster</i>	22
4.2. Elaboração dos meios de cultura do ensaio de longevidade	23
4.3. Ensaios de longevidade e fecundidade	25

4.4. Ensaio de Repetição Rápida de Geotaxia Negativa (RING)	25
4.5. Preparações citogenéticas	26
4.6. Análise citogenética	27
4.7. Análise dos dados	28
5. Resultados	30
5.1. Parte I – Experimentação com restrição dietética em <i>D. melanogaster</i> utilizando lipídios como variável nutricional	30
5.1.1. Sobrevivência e mortalidade	30
5.1.2. Fecundidade	34
5.1.3. Teste RING	35
5.1.4. Superfície de Resposta	37
5.2. Parte II – Efeitos da interação entre resveratrol e restrição dietética na formação do pufe <i>Hsp22</i> e seus efeitos sobre o envelhecimento em diferentes linhagens de <i>Drosophila melanogaster</i>	39
5.2.1. Sobrevivência e mortalidade	39
5.2.2. Teste RING	46
5.2.3. Análise citogenética dos pufes <i>Hsp22</i>	49
6. Discussão	53
6.1. Parte I – Experimentação com restrição dietética em <i>D. melanogaster</i> utilizando lipídios como variável nutricional	53
6.2. Parte II – Efeitos da interação entre resveratrol e restrição dietética na formação do pufe <i>Hsp22</i> e seus efeitos sobre o envelhecimento em diferentes linhagens de <i>Drosophila melanogaster</i>	66
7. Conclusões	77
8. Bibliografia	79
9. Curriculum Vitae (Lattes)	

1. INTRODUÇÃO

A dieta é um fator ambiental importante a qual organismos heterotróficos estão expostos (Zeisel, 2010). A ideia de que componentes alimentares possam atuar como sinais pelos quais sensores celulares interpretam condições ambientais realça a importância de testar os efeitos de nutrientes isolados no processo de envelhecimento (Muller e Kersten, 2003). Com o melhoramento de técnicas de nutrigenômica, está sendo possível determinar padrões pelos quais um nutriente em particular altera o funcionamento de genes, vias metabólicas e a expressão de proteínas (Mathers, 2006). Análises aprofundadas das interações nutriente-genótipo possibilitarão a criação de programas de nutrição e suplementação personalizados baseadas em polimorfismos genéticos individuais, com impacto na medicina.

A restrição dietética (RD) é capaz de estender o tempo de vida de uma ampla variedade de animais, contudo ainda não foi elucidado seu mecanismo de atuação. Apesar de esse efeito ser muitas vezes atribuído à restrição calórica (RC), a limitação ou suplementação de nutrientes específicos, independentemente do conteúdo energético, é o suficiente para estender a longevidade em alguns animais (Mair *et al.*, 2003). Apesar dos inúmeros estudos de longevidade em *Drosophila melanogaster* alterando conteúdo energético ou proporção entre carboidratos e proteínas, não há estudos sobre os efeitos dos lipídios, apesar das evidências de seu papel na regulação de eventos metabólicos e epigenéticos relacionados ao envelhecimento (Fatehi-Hassanabad e Chan, 2005).

A constante disponibilidade de alimento nas sociedades modernas torna improvável a prática voluntária de restrição dietética entre humanos, sendo relevante o estudo de substitutos alternativos à intervenção nutricional. O resveratrol parece mimetizar os efeitos da RD na longevidade (Baur e Sinclair, 2006), provavelmente por sua atuação como composto ativador de sirtuína (Howitz *et al.*, 2003). Sir2 é a sirtuína mais relacionada com a RD e resveratrol, necessária para que esses sejam capazes de

estender a longevidade em mutantes de *D. melanogaster* (Wood *et al.*, 2004). O gene *Hsp22* codifica uma chaperona e tem sua expressão bastante aumentada durante o envelhecimento e quando subexpressa ocasiona diminuição do tempo de vida em *Drosophila* (Morrow *et al.*, 2004a). Supõe-se que a atividade de *Hsp22* pode estar correlacionada à de *Sir2* em seus efeitos sobre o envelhecimento. As propriedades de modulação epigenética compartilhada por lipídios, *Sir2* e resveratrol também são indicativas da interação desses componentes que não podem ser ignoradas.

Dada a importância da padronização metodológica em ensaios de restrição dietética em invertebrados, da atuação de lipídios como sinalizadores metabólicos e da elucidação dos pontos de intersecção entre os mecanismos de atuação de RD, resveratrol, *Sir2* e *Hsp22*, neste trabalho se testou diferentes concentrações de meios com lipídios em ensaios de RD e os efeitos da administração de resveratrol na senescência de *D. melanogaster*. Com mesmo intuito, foi analisada a expressão de *Hsp22* a partir da observação do padrão de formação dos pufes que contém esse gene.

Mais que estender a longevidade, a maior preocupação em se chegar a idades mais avançadas é manter a autonomia e independência, que dependem diretamente da manutenção das funções locomotoras e de coordenação motora. *Drosophila melanogaster* têm emergido como um modelo no estudo de deficiências locomotoras e da deterioração neuromuscular associada ao envelhecimento. Desse modo, analisamos os efeitos de RD e resveratrol na deterioração neuromotora associada à idade.

A forte influência do componente genético no processo de envelhecimento, como evidenciada pelas dramáticas mudanças na longevidade ocasionadas por mutações de um único gene (Kenyon, 2010), enfatiza a importância do genótipo do organismo em relação à sua resposta a estímulos ambientais. Assim, a alteração da composição lipídica da dieta e administração de resveratrol também foi utilizada para avaliar a longevidade e a deterioração neuromotora em diferentes linhagens.

2. Revisão da Literatura

2.1. Envelhecimento: estado da arte, paradigmas e teorias

O envelhecimento é um complexo processo biológico influenciado por eventos ambientais e sujeito à regulação genética através de intrincada interação de vias metabólicas. Esse evento consiste na deterioração das funções biológicas, ocasionando maior vulnerabilidade ao ambiente, às doenças e, conseqüentemente, à morte. O grande enigma do envelhecimento recai sobre o fato de a morte em função do tempo de vida não ser inevitável do ponto de vista molecular e celular (Shay e Wright, 2000), existindo organismos que são virtualmente imortais, como a hidra (Bosch, 2007) e uma espécie de água-viva (Piraino *et al.*, 1996), além de linhagens celulares eternas como a linhagem de células humanas HeLa (Gey *et al.*, 1952, apud Macville *et al.*, 1999). Além disso, ao contrário dos seres inanimados, que são expostos ao decaimento físico e químico, os seres vivos possuem inúmeros mecanismos de reparo e renovação (Mitteldorf, 2010).

As hipóteses que tentam esclarecer as causas e mecanismos de atuação do processo de envelhecimento estão, de maneira geral, alinhadas a dois paradigmas distintos. A teoria de envelhecimento programado ou adaptativo sugere que a senescência é um processo essencial e inato no qual os organismos possuem mecanismos que evoluíram ativamente para limitar seu tempo de vida (Prinzinger, 2005). Nesse contexto, cada espécie teria um “relógio biológico” regulando o tempo de vida através dos estágios de desenvolvimento. Os genes seriam ligados e desligados seguindo um cronograma pré-determinado a partir de sinais moleculares, celulares, neuroendócrinos e imunes. Em contrapartida, a teoria de envelhecimento não programado ou não adaptativo supõe que o mesmo é um incidente passivo que resulta da fraca pressão seletiva exercida sobre os organismos após a maturidade sexual (Kirkwood e Shanley, 2005). A principal consequência dessa negligência da seleção natural é que os

efeitos de mutações deletérias tardias sofreriam fraca pressão seletiva, adiando a manifestação desses fenótipos para depois da idade reprodutiva, que acumulados, levariam à senescência.

As teorias estocásticas sugerem que o acúmulo aleatório de lesões nas células implica na perda de função progressiva, levando ao envelhecimento. A teoria do estresse oxidativo, adaptação da teoria dos radicais livres (Beckham e Ames, 1998), sugere que as espécies reativas de oxigênio (ROS) continuamente geradas como bioprodutos do metabolismo aeróbico vão se acumulando e, em altas concentrações, causam danos oxidativos a macromoléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Finkel e Holbrook, 2000). Espécies reativas de oxigênio também parecem modular sinais celulares que podem levar à aceleração da senescência das células (Hutter *et al.*, 2002). Evidências sugerem a atuação das ROS como um mecanismo em potencial de diversas patologias, tais como catarata, distrofia muscular, artrite e várias doenças cardiovasculares e degenerativas (Berlett e Stardtman, 1997). Além das ROS, existem outros compostos altamente reativos, como os AGEs (produtos finais de glicação avançada), que podem induzir anormalidades em importantes estruturas celulares e alterações na matriz extracelular (Brownlee, 2001). Esses produtos também estão associados com patologias do envelhecimento, tais como diabetes tipo II, arterosclerose (Basta *et al.*, 2004) e doença de Alzheimer (Vitek *et al.*, 1994).

A ocorrência de mutações no DNA mitocondrial e o decaimento funcional da cadeia respiratória também estão ligados ao envelhecimento (Birch-Machin, 2006). Quase todo o oxigênio consumido pela célula é utilizado na respiração mitocondrial, cuja redução incompleta na cadeia de transferência de elétrons pode levar à formação de radicais superóxidos e, por conseguinte, a ROS. O DNA mitocondrial tem uma taxa de mutação somática maior do que o nuclear, causada tanto pela sua maior susceptibilidade aos danos oxidativos por ROS (devido à sua proximidade da cadeia de transporte de

elétrons), como pela menor eficiência de seus mecanismos de reparação (Gredilla, 2011). A perda de função mitocondrial está relacionada com uma série de doenças degenerativas comuns no envelhecimento, como diabetes tipo do II (Lowell e Shulman, 2008), doença de Parkinson (Henchcliffe e Beal, 2008) e de Alzheimer (Hirai *et al.*, 2001).

A teoria do envelhecimento celular sugere que a senescência é geneticamente programada e dependente da espécie (Shay e Wright, 2000). A diminuição da extensão dos telômeros a cada divisão de células somáticas leva à perda de sequências importantes para a estabilidade do cromossomo, o que torna a célula incapaz de se dividir corretamente, resultando na senescência replicativa (Kim *et al.*, 2002). Telômeros de células germinativas não encurtam a cada duplicação e possuem capacidade infinita de divisão (Chiu e Harley, 1997). Nessas células, assim como em muitas células cancerígenas, há a presença de telomerase, enzima responsável por finalizar a replicação dos telômeros (Allsopp *et al.*, 1992).

As teorias discutidas anteriormente apresentam aspectos pontuais do envelhecimento, no entanto, faz-se necessário mecanismos sistêmicos que coordenem o processo no nível de organismo. A teoria neuroendócrina de envelhecimento sustenta que esse decorre de mudanças nas funções neurais e endócrinas cruciais para manter a homeostase (Weinert e Timiras, 2003). Essa teoria propõe que a exposição crônica a estresses químicos, físicos e biológicos no decorrer do tempo de vida diminui a capacidade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal fazer os ajustes fisiológicos necessários para preservar e manter o equilíbrio homeostático em resposta às contínuas mudanças e demandas do ambiente.

Outro possível regulador sistêmico do envelhecimento é o sistema imune. Sabe-se que com a senescência o sistema imune apresenta menor capacidade em lidar com organismos e substâncias externas potencialmente patológicas e ao mesmo tempo se mostra mais ineficiente em identificar, e assim poupar de destruição, suas próprias

moléculas e tecidos (Campisi *et al.*, 2009). Essa perda de habilidade resulta em um aumento de susceptibilidade a doenças infecciosas e autoimunes. Na verdade, alterações associadas com o envelhecimento no sistema neuroendócrino e no sistema imune são atualmente consideradas como mutuamente interdependentes (Fabris, 1991), configurando a unificação dos dois modelos de envelhecimento (Weinert e Timiras, 2003),

Possíveis vantagens do envelhecimento sob aspectos populacionais seriam evitar a superpopulação ou otimizar o próprio processo evolutivo através da garantia da substituição efetiva de gerações (Kirkwood e Holliday, 1979). Do ponto de vista evolutivo, as principais teorias são da pleiotropia antagonística e do soma descartável. A primeira propõe que o envelhecimento pode ter decorrido de genes pleiotrópicos com efeitos diferentes dependendo do estágio de desenvolvimento do organismo, sendo benéficos até a idade reprodutiva, onde a seleção atua fortemente, e posteriormente deletérios (Leroi *et al.*, 2005). A teoria do soma descartável (Kirkwood e Rose, 1991) sugere que, partindo do princípio de que a energia disponível é limitada, há a necessidade de administrar a alocação de recursos entre reprodução, metabolismo, manutenção e reparação com a finalidade de atingir melhor adaptabilidade (*fitness*). Como na natureza a mortalidade por eventos externos é alta, essa alocação acabou sendo fortemente selecionada no sentido de priorizar a reprodução em detrimento de outras funções. Assim, a energia alocada para manutenção do tecido somático seria a mínima necessária para que a reprodução seja garantida, mas insuficiente para permitir o reparo de outras funções, que eventualmente, com o passar do tempo, causam a deterioração do organismo.

2.2. Invertebrados como organismos modelo: *Drosophila melanogaster*

As primeiras vias metabólicas envolvidas no processo de envelhecimento foram descobertas a partir de experimentos com mutação de um único gene em organismos

modelos, como o *age-1* em *Caenorhabditis elegans* (Friedman e Johnson, 1988). Através de estudos com esse nematóide foram descobertos outros genes conservados associados à longevidade, como *daf-2* e *daf-16* (Kenyon *et al.*, 1993), assim como o envolvimento de importantes vias metabólicas nesse processo, como a via de sinalização de insulina/IGF-1 (Kimura *et al.*, 1997).

Outro modelo amplamente utilizado em estudos de envelhecimento e patologias associadas é o díptero *Drosophila melanogaster*, eucarioto multicelular melhor caracterizado do ponto de vista genético, com genoma completo sequenciado (Adams *et al.*, 2000) e ampla descrição fenotípica para genes e alelos (Flybase, 2011). Neste organismo são conhecidos os destinos de todos os tipos celulares que surgem ao longo do desenvolvimento, tornando-o um dos melhores modelos nesta área de estudos (Helfand e Rogina, 2003). Além disso, *D. melanogaster* é um organismo holometábolo, portanto, pós-mitótico, ou seja, seu corpo adulto não apresenta renovação celular (Helfand e Rogina, 2003). Esse aspecto o diferencia de outros modelos eucariotos superiores e apesar de poder limitar a extrapolação de efeitos experimentais, apresenta um diferencial positivo, pois diminui o número de variáveis em análise, uma vez que não ocorre a interferência da renovação celular nos processos estudados.

O estabelecimento de *Drosophila* como organismo modelo baseou-se em suas principais características biológicas, especialmente vantajosas para estudos genéticos, tais como um curto tempo de geração, alta capacidade reprodutiva, manutenção fácil e econômica, pequeno número de cromossomos e presença de cromossomos politênicos na glândula salivar da larva. Devido ao seu tamanho até 30 vezes maior que os cromossomos mitóticos e distintivo padrão de bandejamento, os cromossomos politênicos são bastante explorados por drosofilistas e geneticistas. Os padrões de bandejamento altamente reprodutíveis desses cromossomos possibilitaram a criação de mapas

fotográficos com os quais é possível analisar rearranjos cromossômicos e inferir relações filogenéticas entre espécies próximas (Monte, 2010).

Os pufes dos cromossomos politênicos refletem alto nível de transcrição, as interbandas correspondem a menores níveis de transcrição e as bandas aparentam ser regiões transcricionalmente silenciosas (Zhimulev e Koryakov, 2009). Essas características fornecem um bom sistema para o estudo da atividade gênica em resposta a eventos ambientais, como mudança de temperatura, alteração de *status* nutricional, administração de drogas e hormônios, entre outros tratamentos (Henderson, 2004). A alta resolução do cromossomo politênico permite a localização citogenética precisa de sequências clones de DNA através da hibridização *in situ* (Schaeffer *et al.*, 2008) ou ainda possibilita determinar se proteínas de interesse estão associadas ao cromossomo, através de técnicas de imunocoloração (Safer *et al.*, 1982) e rotulagem-dupla (Zhan *et al.*, 2006). Além disso, é possível estudar a dinâmica de distribuição protéica em resposta a eventos ambientais (Nowak e Corces, 2000) ou mutações (Fletcher *et al.*, 1995), inibição ou ativação gênica através da expressão de ativadores transcricionais ou inibidores químicos de transcrição (Lavrov *et al.*, 2004).

A existência de vias moleculares conservadas entre invertebrados e mamíferos permite que as investigações da ação de drogas em organismos modelo, como a mosca *D. melanogaster*, possam ser relevantes na descoberta de novos tratamentos para doenças humanas. Fortini *et al.* (2000) afirmam que, de um total de 287 genes envolvidos em doenças humanas, 178 estão evolutivamente conservados em *Drosophila*. Além disso, *D. melanogaster* possui pelo menos dez fenótipos de envelhecimento conservados em humanos como perda muscular, diminuição da função cardíaca, instabilidade genômica, acúmulo de agregados macromoleculares, apoptose e senescência das células somáticas, declínio da memória e da capacidade de aprendizagem, deterioração da imunidade inata e da função mitocondrial e declínio da atividade motora (Vijg e

Campisi, 2008). Essas características fazem de *Drosophila* um modelo experimental eficiente e versátil para uso em pesquisas da saúde humana, inclusive na área de farmacogenética e desenvolvimento de drogas.

2.3. Genética do envelhecimento

2.3.1. Principais vias de sinalização, sinais fisiológicos e ambientais

O processo de envelhecimento, assim como outros processos biológicos, está sujeito à regulação por vias de sinalização e fatores de transcrição. A maioria das mutações que alteram a longevidade ocorre em genes de resposta a estresse ou de sensores de nutrientes (Kenyon, 2010). As principais vias metabólicas envolvidas no processo de envelhecimento são via de sinalização insulina/IGF-1, a via de sinalização TOR, AMP quinase e o silenciamento gênico por sirtuínas (Kourtis e Tavernarakis, 2011).

A via de sinalização insulina/IGF-1 é conservada em várias espécies, desde *Saccharomyces cerevisiae* até humanos e está envolvida em processos de crescimento e reprodução, tendo um papel crucial na regulação da longevidade. A inibição dessa via estende a longevidade de *C. elegans*, alterando a expressão gênica através de DAF-16 (fator de transcrição FOXO), fator de transcrição HSF-1 e SKN-1. Esses fatores regulam uma série de genes de resposta a estresses codificantes de peptídeos antimicrobianos, chaperonas e lipases que ocasionam uma mudança fisiológica em favor da manutenção somática (Tullet *et al.*, 2008). Apesar da maioria das evidências indicarem que a inibição desta via estende a longevidade, a infuncionalidade total do gene codificante do receptor de insulina causa diabetes em roedores (Kadowaki, 2000), o que indica que as consequências podem ser diferentes dependendo do tipo de interferência nessa via. Além disso, a perturbação da via insulina/IGF-1 num tecido específico repercute em outros para alcançar um novo estado homeostático, o que pode ser evidência de que esta via atua de

maneira a coordenar a taxa de envelhecimento em diferentes tecidos (Kenyon, 2005; Bishop e Guarente, 2007).

As TOR-quinases (alvo de rapamicina) são proteínas conservadas entre as espécies, que estão envolvidas diretamente com vias responsáveis pelo crescimento em resposta a nutrientes. Essas quinases são nutriente-específicas, ou seja, respondem a estímulos nutricionais diferentes e modulam a expressão gênica no sentido de crescimento e bloqueio de autofagia quando há abundância de recursos, interagindo extensivamente com a via de insulina/IGF-1 (Patridge *et al.*, 2005). A inibição de TOR aumenta a resistência a estresses e a eficiência e biogênese mitocondrial, ocasionando extensão da longevidade (Bonawitz *et al.*, 2007). A inibição dessa via aparenta mimetizar os efeitos de RD, pois nesse caso, RD não confere extensão de longevidade adicional (Kaeberlein *et al.*, 2005).

A via da quinase ativada por AMP (AMP-quinase) é sensora de energia que ativa vias catabólicas e inibe vias anabólicas, sendo uma das responsáveis por manter a homeostase energética celular (Greer *et al.*, 2007). A atividade de AMPK é fundamental para a biogênese mitocondrial e declina com a idade. A AMP-quinase é fator essencial para a extensão do tempo de vida resultante de mutação na via de insulina/IGF-1 e sua superexpressão aumenta o tempo de vida de *C. elegans* (Apfeld *et al.*, 2004). Sua atuação, apesar de ainda não ser clara, parece estar envolvida com fosforilação e ativação de FOXO (Greer *et al.*, 2007).

Sirtuínas são proteínas desacetilases dependente de NAD⁺ cuja superexpressão estende a longevidade de uma série de organismos (Wenzel, 2006). Apesar de estar bastante conservada entre as espécies, a maneira pela qual essa proteína age em cada organismo demonstra ser, pelo menos a princípio, diferente. Em *S. cerevisia*, *Sir2* parece aumentar a longevidade principalmente através da inibição da formação de círculos extracromossomais tóxicos de DNA ribossomal (Woong e Huh, 2011) e por garantir a

assimetria de danos (Erjavec *et al.*, 2004). Em *C. elegans* Sir2 aparenta estender o tempo de vida por ativar DAF-16 diretamente através de sua desacetilação (Kenyon, 2010). Sir2 também é capaz de segregar proteínas danificadas (Erjavec *et al.*, 2007) e manter o silenciamento gênico nos telômeros (Maillet *et al.*, 1996), possível via pela qual essa sirtuína estende a longevidade em alguns animais.

Ainda não é claro se essas vias conservadas em humanos respondem de maneira similar em organismos modelos (Kenyon, 2010). Em populações de judeus *Ashkenazi* centenários foi observada uma super-representação de mutações que debilitam a função do receptor IGF-1 (Suh *et al.*, 2008). Variantes de FOXO3A foram associadas à longevidade em diversos estudos, estando super-representadas em populações de centenários de vários países (Kenyon, 2010). Assim como nos organismos modelo, AMP-quinases são capazes de fosforilar *in vitro* e assim ativar homólogos de FOXO em humanos, especialmente FOXO3 (Greer *et al.*, 2009). Aumento da expressão de SIRT1 (homólogo humano de Sir2) induz proliferação celular, reduz formação de focos heterocromáticos associados à senescência (SAHF) e diminui suspensão da fase G1, além de induzir aumento na taxa de crescimento e longevidade celular em fibroblastos humanos (Huang *et al.*, 2008).

2.3.2. Gene *Sir2*

Os genes reguladores de informação silenciosa (*sir*), ou sirtuínas, codificam uma superfamília de proteínas altamente conservadas dentre os organismos. O gene *Sir2* codifica uma desacetilase dependente de NAD⁺ envolvida no silenciamento gênico e regulação do tempo de vida (Imai *et al.*, 2000). *Sir2* não é essencial para a viabilidade e desenvolvimento de *D. melanogaster*, mas a mutação *knock-out* do gene aumenta variação por efeito de posição (PEV) e diminui consideravelmente a longevidade (Astrom *et al.*, 2003). *Sir2* foi mapeado na seção 34A7 do braço cromossômico 2L

(elemento B de Muller) de *D. melanogaster* (Astrom *et al.*, 2003), e possui diversos alelos descritos com diferentes efeitos fenotípicos (Flybase, 2011). Esse gene não parece silenciar telômeros em *Drosophila*, mas é necessário para silenciamento da heterocromatina e principalmente para reprimir eucromatina através da interação com membros da família HES dos repressores bHLH, como Hairy (Rosenberg e Parkhurst, 2002). Sir2 também está envolvido na mediação de apoptose através da ativação de JNK e FOXO (Griswold *et al.*, 2008).

Em mamíferos existem sete homólogos de Sir2 (SIRT1-7) que parecem atuar de forma complexa no processo de envelhecimento, com distribuição nos compartimentos celulares, dependentes do tecido e do estímulo ambiental (Schwer e Verdin, 2008). SIRT2 é uma proteína predominantemente citoplasmática (Michishita *et al.*, 2005) e está envolvida na regulação do ciclo celular (Dryde *et al.*, 2003). SIRT3, SIRT4 e SIRT5 são proteínas encontradas nas mitocôndrias e estão associadas com a regulação das funções mitocondriais e da utilização da energia (Haigis e Guarante, 2006). SIRT1, SIRT6 e SIRT7 são encontradas primordialmente no núcleo. SIRT6 está relacionado com a regulação do reparo de DNA (Mostoslavsky *et al.*, 2006) e SIRT7 com a transcrição de rRNA e regulação de crescimento celular (Ford *et al.*, 2006).

SIRT1 é o mais estudado dos homólogos de Sir2 em mamíferos. Essa sirtuína tem a capacidade de inibir a apoptose induzida por estresse, tendo papel importante na regulação da sobrevivência da célula (Huang *et al.*, 2008). Ela também age na regulação da secreção de insulina no pâncreas em resposta à glicose e promove o bloqueio da proteína UCP-2, otimizando a geração de energia nas mitocôndrias (Bordone *et al.*, 2006) além de atuar na proteção da função de células neurais (Haigis e Guarante, 2006). Além disso, SIRT1 aparenta estar envolvida na regulação do metabolismo de resposta à disponibilidade de nutrientes e de resposta a danos e estresses, conferindo papel

importante na alteração metabólica induzida por restrição dietética (Bordone e Guarente, 2005).

As sirtuínas funcionam como intrincado sistema de resposta biológica que influencia uma série de outros reguladores e vias metabólicas (Guarente, 2011). Essa classe de proteínas, em especial *Sir2* e homólogos, está envolvida na regulação da senescência, interagindo de forma complexa com importantes vias, tais como TOR/quinase e insulina/IGF-1 (Haigis e Guarente, 2006). A subexpressão de *Sir2* leva à diminuição da longevidade em uma ampla variedade de espécies, como levedura (Lin *et al.*, 2000), *C. elegans*, *D. melanogaster* e roedores (Guarente e Picard, 2005). Estudos com polimorfismos em populações humanas ligam a SIRT3 à longevidade (Bellizzi *et al.*, 2005) e roedores mutantes *SIRT6 knock out* apresentam fenótipo de envelhecimento prematuro (Mostoslavsky *et al.*, 2006).

Apesar de ainda não serem claros os mecanismos pelos quais essas sirtuínas atuam na extensão do tempo de vida, evidências mostram que elas podem aumentar a longevidade através do silenciamento gênico dos telômeros durante o envelhecimento, mas esse efeito não acontece em todos os organismos (Dang *et al.*, 2009). Em mamíferos, SIRT1 também desacetila FOXO (homólogo de Daf-16), fazendo alterações metabólicas no sentido de resistência a estresses (Griswold *et al.*, 2008). O estresse oxidativo parece estimular essa ativação de FOXO/DAF-16 pelas sirtuínas (Brunet *et al.*, 2004). *Sir2* também atua como antagonista da senescência celular induzida por PML/P53, através de sua atividade de desacetilação do supressor de tumor P53, proteína importante no controle do crescimento celular e no processo de apoptose (Langley, 2002).

2.3.3. Gene *Hsp22*

Proteínas do tipo *small heat shock* (sHSP, pequenas proteínas de choque térmico) atuam como chaperonas, estando envolvidas na resistência a estresses, especialmente a

termotolerância da célula, regulação do desenvolvimento e diferenciação celular (Michaud *et al.*, 1997), inibição da apoptose (Paul *et al.*, 1999) e transdução de sinal (Benndorf e Welsh, 2004). Essas chaperonas são responsáveis por prevenir agregação de proteínas parcialmente desnaturadas e promovem sua restauração, atuando na prevenção de doenças, como catarata (Chaudhuri e Subhankar, 2006). Sua desregulação está envolvida com patologias como doença de Parkinson e Alzheimer (Koren *et al.*, 2009).

O díptero *D. melanogaster* tem quatro proteínas do tipo *small heat shock* (sHSP com peso molecular de 20 a 30 kDa): Hsp22, Hsp23, Hsp26 e Hsp27. O gene *Hsp22* está localizado na seção 67B2 do braço cromossômico 3L (Corces *et al.*, 1980). Esse gene é sensível a diferentes agentes de estresse ambiental, protegendo contra danos térmicos e oxidativos (Morrow *et al.*, 2004b), atuando na preservação do citoesqueleto de actina e microfilamentos (Sun and MacRae, 2005) e tolerância ao frio (Colinet *et al.*, 2010). A regulação de sua transcrição parece estar envolvida com a acetilação de histonas na cromatina (Berger e Dubrovsky, 2005; Zhao *et al.*, 2005).

Embora seja um gene nuclear, em *D. melanogaster* *Hsp22* codifica uma proteína que atua na mitocôndria, apresentando baixo nível de indução por estresse durante o desenvolvimento, aumentando 150 vezes durante o envelhecimento, especialmente no tecido ocular (King e Tower, 1999). A superexpressão desse gene nos neurônios motores mantém a eficiência da atividade locomotora em *Drosophila* por mais tempo, além de aumentar a resistência a danos oxidativos induzidos pela droga paraquat e a estresse térmico (Morrow *et al.*, 2004b). O aumento da expressão de *Hsp22* coincide com o início da “fase de morte” da curva de sobrevivência populacional, contribuindo para o aumento da longevidade (King e Tower, 1999; Morrow *et al.*, 2004a). A redução na expressão provoca diminuição, enquanto a superexpressão resulta em aumento da longevidade (Morrow *et al.*, 2004a, b; Tao *et al.*, 2004).

Níveis de transcritos de *Hsp22* foram de 2 a 10 vezes maiores em linhagens de *D. melanogaster* geneticamente selecionadas para longa longevidade do que para a linhagem controle (Zhao *et al.*, 2005). Kim (2008) comparou o transcriptoma e o proteoma mitocondrial de moscas com gene *Hsp22* superexpresso com moscas controle. Ele observou que as primeiras apresentaram maior quantidade de proteínas envolvidas na respiração mitocondrial, no metabolismo de aminoácidos, na oxidação de ácidos graxos e resposta anti-oxidativa, indicando essas vias como possíveis alvos da atuação de *Hsp22* no envelhecimento.

2.4. Intervenções para retardar envelhecimento

2.4.1. Modulação nutricional: restrição dietética

A restrição dietética (RD) é a intervenção conhecida mais eficiente capaz de retardar os efeitos do envelhecimento em diversos eucariotos, desde seres unicelulares como leveduras (Lin *et al.*, 2000) e invertebrados como *C. elegans* (Greer *et al.*, 2009) e *D. melanogaster* (Giannakou *et al.*, 2008) até mamíferos como roedores (Lee *et al.*, 1999) e primatas (Roth *et al.*, 2006). A restrição moderada de alimento (30-40%) é descrita como capaz de prevenir ou retardar a manifestação de diversas doenças crônico-degenerativas e patologias associadas ao envelhecimento, como arteriosclerose (Fontana *et al.*, 2004), diabetes (Wing *et al.*, 1994), doenças cardiovasculares (Zied, 2007), renais (Jiang *et al.*, 2005), neurodegenerativas (Gillette-Guyonnet e Vellas, 2008) e autoimunes (Kubo *et al.*, 1992). RD aumenta a resistência a estresses (Yu e Chung, 2006), desacelera o declínio funcional (Barger *et al.*, 2003) e a deterioração da memória espacial (Ingram *et al.*, 1987) e aumenta a capacidade de autorreparação do cérebro (Mattson e Wan, 2005).

Evidências da interação de RD com genes e vias metabólicas descartam a hipótese de seus efeitos serem apenas uma consequência mecânica da redução de estresse oxidativo ocasionada pela restrição energética (Koubova e Guarente, 2003). Apesar de ainda não estarem claros os mecanismos e vias metabólicas pelos quais a RD atua na extensão da longevidade, vias sensoras de nutrientes parecem estar ativamente envolvidas nesse processo (Kenyon, 2010). Como pode ser observado na Figura 1, a maioria das vias envolvidas no envelhecimento, como Insulina/IGF-1 (Heemst *et al.*, 2005), TOR (Schieke e Finkel, 2007), AMP quinase (Greer *et al.*, 2009) e sirtuínas (Wood *et al.*, 2004), parece sofrer influência da RD. A via mais ativamente envolvida na extensão da longevidade como resposta a RD depende de como e quando ela é imposta, assim como do organismo a ela submetido. Em *C. elegans*, dieta hipocalórica intermitente estende a longevidade através da inibição de via de insulina/IGF-1, mas restrição calórica crônica parece agir através da via TOR (Kenyon, 2010). Restrição dietética iniciada na “meia-idade” nesse nematódeo requer AMP quinase para ter efeito, mas essa quinase não é necessária para restrição dietética crônica desde a juventude (Honjoh *et al.*, 2009; Kenyon, 2010).

A proteína Sir2 parece ter um papel importante na regulação dos efeitos de RD na longevidade (Guarente e Picard, 2005). Além de aumentar a atividade silenciadora de Sir2, RD não estende o tempo de vida em leveduras com *Sir2* deletados (Lin *et al.*, 2000). Em *Drosophila*, RD aumenta os níveis de mRNA de *Sir2* e não tem efeitos no tempo de vida de mutantes nulos *sir2* (Rogina *et al.*, 2002). Além disso, RD não confere extensão adicional de longevidade em díptero que teve o tempo de vida ampliado devido à superexpressão de *Sir2* (Rogina e Helfand, 2004). Contudo, apesar dessas evidências, ainda é desconhecido o mecanismo pelo qual *Sir2* é ativado por RD. Acredita-se que RD atue através do aumento da respiração em detrimento da fermentação em leveduras (Lin *et al.*, 2004) e da redução da glicose circulante em mamíferos (Koubova e Guarente,

2003). Essas alterações metabólicas resultam num aumento da proporção de NAD/NADH, ativador de *Sir2*, que por sua vez ocasiona a repressão da via Insulina/IGF-1 (Koubova e Guarente, 2003).

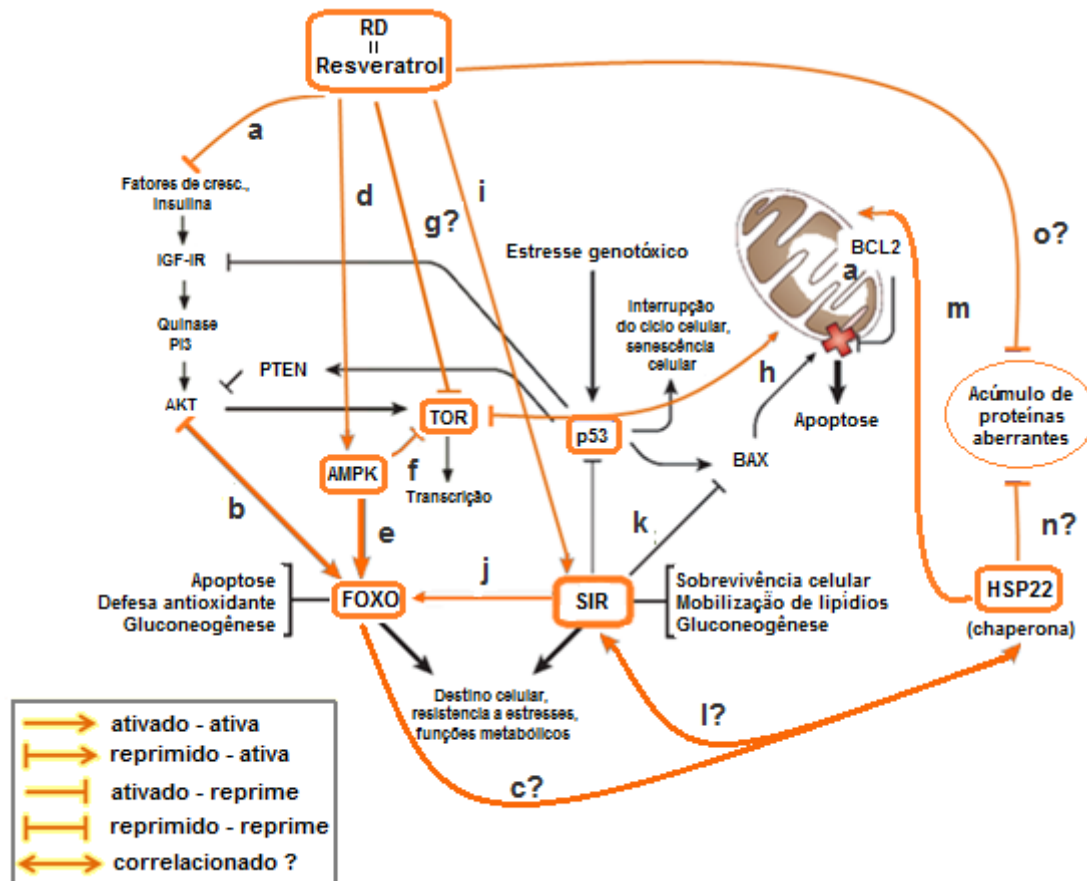


Figura 1. Restrição dietética e vias metabólicas envolvidas na regulação da longevidade. RD está relacionada com a inibição da cascata metabólica da via insulina/IGF-1 (a), permitindo a ativação de fatores de transcrição FOXO (b), que por sua vez induzem a expressão de uma série de genes relacionados ao estresse, inclusive os de chaperonas (c?). Proteínas FOXO também são ativadas através da rota de AMPK (e), acionada em caso de baixo nível de glicose ocasionada por RD (d). A via de sinalização TOR/quinase também é inibida por RD, fato relacionado ao aumento da respiração mitocondrial (h) e da longevidade. A repressão de TOR pode ocorrer através da indução da rota AMPK (f) ou através de outras vias e cascatas ainda não bem estabelecidas (g). A longevidade também é estendida por RD por seu efeito no aumento da proporção NAD⁺/NADH, cofator necessário à ativação de Sir2 (i). Sir2 é tido como ativador de FOXO (j), além de bloquear cascatas apoptóticas através da inativação P53 e de BAX (k). A superexpressão de Sir2 está associada à expressão de chaperonas, sem as quais não há aumento de longevidade, fato que pode sugerir atuação *trans* da desacetilase, podendo atuar direta ou indiretamente na regulação da expressão de Hsp22 (l?). Hsp22 atua na mitocôndria possivelmente por prevenir agregação de proteínas inativas (m). Essa sua atuação como chaperona pode ser um mecanismo que se justapõe à RD, que está relacionado com o aumento de *turnover* de proteínas (o). Figura adaptada de Vijg e Campisi (2008).

A restrição dietética é muitas vezes tratada como restrição calórica (RC), devido às evidências preliminares de que a restrição energética (quantidade de calorias) era o fator determinante na extensão da longevidade (Masoro *et al.*, 2000). No entanto, estudos

posteriores demonstraram que a diminuição ou suplementação de alguns nutrientes, independentemente da alteração energética do alimento, também é capaz de alterar o tempo de vida (Mair *et al.*, 2005; Ja *et al.*, 2009). A redução de metionina em dietas isocalóricas aumenta o tempo de vida em roedores (Orentreich *et al.*, 1993) e restrição proteica em *D. melanogaster* é capaz de estender a longevidade significativamente (Lee *et al.*, 2008; Grandison *et al.*, 2009b).

Embora se saiba que a proporção entre proteínas e carboidratos é fator crítico para a extensão da longevidade em resposta à restrição dietética de *D. melanogaster* (Bass *et al.*, 2007a; Grandison *et al.*, 2009b; Mair *et al.*, 2005), não é conhecido se os lipídios também podem ter efeitos sobre o envelhecimento neste organismo. Dos macronutrientes testados em ensaios com RD em *Drosophila*, os lipídios vêm sendo negligenciados, apesar das evidências de seu papel na regulação do metabolismo (Frühbeck *et al.*, 2001; Fatehi-Hassanabad e Chan, 2005). Os ácidos graxos atuam como moléculas sinalizadoras no estabelecimento de mecanismos regulatórios epigenéticos (Waterland e Rached, 2006), os quais são relacionados com a longevidade e regulação do processo de envelhecimento (Niculescu e Lupu, 2011), sendo importante entender seu mecanismo de atuação.

2.4.2. Resveratrol

O consumo leve a moderado de bebidas alcoólicas diminui o risco de morte por doenças cardiovasculares em mais de 30% em relação ao consumo excessivo e à abstenção de álcool etílico (Rimm *et al.*, 1996). No entanto, evidências sugerem que o consumo de vinho tinto confere maiores benefícios em proteger de problemas coronarianos que outros tipos de bebidas alcoólicas (Gronbaek *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2001). O resveratrol é a substância do vinho que chamou mais atenção pelo fato de, dentre outros efeitos, ser capaz de estender o tempo de vida de vários organismos como

leveduras (Howitz *et al.*, 2003), nematódeos (Viswanathan *et al.*, 2005) e drosófilas (Wood *et al.*, 2004).

A atividade do resveratrol foi demonstrada em uma série de vias metabólicas na proteção contra doenças cardiovasculares, inflamação crônica, infecção, câncer, derrame cerebral e patologias associadas ao envelhecimento (Vidavalur *et al.*, 2006). Além de possuir propriedades anticoagulantes (Fauconneau *et al.*, 1997), o resveratrol inibe a oxidação de LDL e induz a atividade de ligação de DNA de NF- κ B, o que eleva a geração de óxido nítrico e citocinas angiogênicas, promovendo angiogênese e melhora da circulação coronariana e prevenindo a arterosclerose (Vidavalur *et al.*, 2006). Esse polifenol também age como um fitoestrogênio, podendo mimetizar os benefícios cardioprotetores e anticancerígenos dos estrogênios naturais (Gehm *et al.*, 1997). O resveratrol também atua na inibição da via de ciclooxygenase, envolvida no desenvolvimento de doenças autoimunes, como doença de Chroh e psoríase (Simmons *et al.*, 2004).

Efeitos dessa substância, tais como aumento da sensibilidade à insulina, redução do fator de crescimento similar à insulina-1 (IGF-I), aumento da atividade da proteína quinase dependente de AMP (AMPK) e da atividade do proliferador de peroxissomos ativado pelo receptor gama 1-alfa (PGC-1 α), aumento do número de mitocôndrias e melhora da função motora, sugerem um poderoso efeito de modificação dos padrões de expressão gênica pelo resveratrol (Pirola and Frojdo, 2007). O resveratrol é capaz de reverter sinais típicos de senescência, como reduzir formação de catarata (Zheng *et al.*, 2010) e melhorar a coordenação motora (Sinha *et al.*, 2002), além de reduzir a inflamação e apoptose (Martinez e Moreno, 2000).

A extensão de vida ocasionada pelo resveratrol parece ocorrer através de mecanismo relacionado à restrição dietética. O resveratrol induz padrões de expressão gênica paralelos aos da RD em roedores (Barger *et al.*, 2008). Em humanos obesos,

suplementação de resveratrol por 30 dias ocasiona mudanças metabólicas semelhantes as da RD (Timmers *et al.*, 2011). Esse fitonutriente é capaz de se opor significativamente aos efeitos de uma dieta altamente calórica em 144 de 153 rotas, mostrando que essa molécula tem amplos efeitos sobre a regulação de genes envolvidos no desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas (Baur e Sinclair, 2006).

O resveratrol parece estender o tempo de vida ativando AMPK de maneira independente de FOXO (Bauer e Sinclair, 2006). Acredita-se que sua atuação como composto ativador de sirtuínas (STAC) seja um dos mecanismos pelo qual o resveratrol estenda a longevidade (Howitz *et al.*, 2003). O envolvimento do resveratrol na via de *Sir2* é evidenciado pelo fato de organismos deficientes em *Sir2* serem incapazes de aumentar sua longevidade através do consumo do trans-resveratrol, sugerindo que essa molécula seria capaz de mimetizar o mecanismo de restrição de calorias, bem como de induzir os mesmos benefícios fisiológicos (Wood *et al.*, 2004).

A grande sobreposição de vias metabólicas compartilhadas por *Sir2*, *Hsp22*, RD e resveratrol serve como evidência molecular para justificar a importância de estudos que visam entender a relação entre esses fatores e seus efeitos no aumento do tempo de vida (Antosh *et al.*, 2011). O resveratrol é capaz de reverter muitas das vias metabólicas responsáveis por patologias envolvidas no envelhecimento resultante de dieta rica em gordura saturada (Rivera *et al.*, 2009) como inflamação crônica, síndromes metabólicas e autoimunes (Hotamisligil, 2006). Esse polifenol também já foi caracterizado como indutor de resposta de choque térmico, ativando uma série de genes *Hsps* (Putics *et al.*, 2008). Além disso, as propriedades de modulação epigenética compartilhada por lipídios, *Sir2* e resveratrol também são indicativas da interação desses componentes na extensão da longevidade que não podem ser ignoradas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi analisar a interação da restrição dietética e o do resveratrol na expressão do pufe *Hsp22* e seus efeitos sobre a senescência em diferentes linhagens de *Drosophila melanogaster*

3.2. Objetivos específicos

1. Analisar os efeitos da utilização de lipídios como variável qualitativa e quantitativa na experimentação com restrição dietética (RD) em *D. melanogaster*;
2. Determinar os efeitos da restrição calórica e da administração de resveratrol na sobrevivência, taxa de mortalidade, deterioração neuromotora e no tamanho do pufe *Hsp22* nas linhagens Oregon-R selecionadas para desenvolvimento precoce (OP), desenvolvimento tardio (OT) e controle (OC) de *D. melanogaster* e em linhagem mutante *sir2*;
3. Avaliar a ocorrência de correlação entre tamanho do pufe *Hsp22*, longevidade e desempenho dos adultos em bioensaios de geotaxia negativa nas linhagens estudadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos se dividiram em duas partes. Os ensaios da parte I foram realizados com a finalidade de investigar a atuação dos lipídios em ensaios de restrição dietética (RD) em *Drosophila melanogaster*, utilizando a linhagem selvagem OC (Oregon R). Na parte II foram testados os efeitos da alteração dietética e da administração de resveratrol na senescência e formação de pufe *Hsp22* em diversas linhagens de *D. melanogaster*.

4.1. Linhagens e manutenção dos estoques de *Drosophila melanogaster*

Apenas a linhagem Oregon-R OC (controle, parental das linhagens OP e OT) de *Drosophila melanogaster* foi utilizada na parte I. Na parte II foram utilizadas as linhagens de *D. melanogaster* Oregon-R OP (desenvolvimento precoce), OT (desenvolvimento tardio), OC (controle, parental de OP e OT) e as linhagens controle Swt 6599 (genótipo $y^1 w^{67c23}$, selvagem *Sir2*, marcas fenotípicas yellow e white) e mutante *Sir2*- 12966 (genótipo $y^1 w^{67c23} P\{SUPor-P\}sir2^{KG00871}$, mutante *sir2* por mutagênese com elemento P, e revertente selvagem para yellow e white). As linhagens de Oregon-R selecionadas para velocidades extremas de desenvolvimento estão descritas em Loreto e Oliveira (1988a, b) e foram cedidas ao Laboratório de Experimentação em *Drosophilas* (LED) pelo setor de *Drosophila* do Departamento de Genética da UFRGS. As demais linhagens estão descritas em Rogina e Helfand (2004) e foram obtidas do Bloomington *Drosophila* Stock Center (Indiana University, Indiana, EUA).

O meio de cultura das moscas do estoque foi preparado pelo cozimento em microondas de farinha de milho (15%), farinha de aveia (5%), farinha de centeio (2,5%), banana (10%), levedura de pão (1%), açúcar comum (1%), mel (3%), ácido propiônico (0,12%), ácido fosfórico (0,12%) e metilparabeno (0,08%) diluído em 15 ml de etanol 5% e

água, suficiente para alcançar consistência firme. A população foi mantida em vidros de 100 ml, com uma média de 40-60 indivíduos por vidro, com sobreposição de gerações (exceto linhagens OP e OT), num ciclo de 12 horas claro/escuro a cerca de 24°C (+/- 2°C) e 70% de umidade.

4.2. Elaboração dos meios de cultura do ensaio de longevidade

Parte I:

Para elaborar a composição dos meios foram utilizadas três estratégias de modificações de parâmetros. A primeira estratégia, para preparar o meio α , consistiu em diluições totais de 0,25, 0,5, 1, 1,5 e 2, mantendo constante a razão calórica de 15:31:4 entre gordura, açúcar e proteína, respectivamente. A segunda estratégia, para produzir dietas isocalóricas (meio β), consistiu em alterar a proporção de lipídios (0%, 10%, 30%, 50% e 70%) em relação aos outros macronutrientes. A terceira estratégia, para obter o meio γ , consistiu em manter fixa a quantidade de açúcar e proteína (com razão de 8:1), adicionando quantidades diferentes de lipídios (0g/L, 3g/L, 15g/L, 30g/L, 45g/L e 60g/L). Nas Tabelas 1, 2 e 3 estão descritas as proporções e ingredientes dos meios.

Tabela 1 – Composição do meio α . Obtido por diluição total, mantendo a mesma proporção entre todos os elementos, mas com conteúdos calóricos diferentes.

Diluição	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0
Açúcar	21 g/L	42 g/L	84 g/L	126 g/L	168 g/L
Fermento	6,5 g/L	13 g/L	26 g/L	39 g/L	52 g/L
Lipídios	6,5 g/L	13 g/L	26 g/L	39 g/L	52 g/L

Tabela 2 – Composição do meio β . Produzido pela alteração da proporção dos lipídios em relação a proteínas e açúcares, mantendo-se isocalóricos.

Proporção lipídica	0%	10%	30%	50%	70%
Açúcar	118.5 g/L	102.5 g/L	84 g/L	59.5 g/L	36 g/L
Fermento	37 g/L	32 g/L	26 g/L	18,5 g/L	11 g/L
Lipídios	0	8,5 g/L	26 g/L	43 g/L	60 g/L

Tabela 3 – Composição do meio γ . Preparado para manter a proporção e quantidade de proteína e açúcar fixas, com suplementação com lipídios e conteúdo calórico diferente advindo exclusivamente dos lipídios.

Lipídios adicionados	0g/L	3g/L	15g/L	30g/L	45g/L	60g/L
Açúcar	80 g/L	80 g/L	80 g/L	80 g/L	80 g/L	80 g/L
Fermento	24 g/L	24 g/L	24 g/L	24 g/L	24 g/L	24 g/L
Lipídios	0	3 g/L	15 g/L	30 g/L	45 g/L	60 g/L

Os ingredientes Agar (0,12%), ácido propiônico (0,12%) e Metilparabeno (0,08%) foram comuns a todos os meios. As fontes dos principais ingredientes foram padronizadas, utilizando Açúcar Cristal Olho D'água, Fermento Biológico Fermipan Brown e Gordura Vegetal Primor. Convém ressaltar que a quantidade dos ingredientes não foi definida em relação à massa dos nutrientes, mas em relação à proporção calórica de cada nutriente.

Parte II:

Todas as moscas foram submetidas a dietas controladas, em meio padrão (representado por “P”), meio hipocalórico (representado por “-”, por diluição total de 0,4 do meio padrão) e meio hipercalórico (representado por “+”, meio padrão 2,5 vezes mais concentrado). Diversos testes preliminares foram feitos até estabelecer a composição e a metodologia apropriada para confecção dos meios de cultura, com composição nutricional e consistência apropriada. O meio padrão consistiu em açúcar refinado (6%), fermento biológico (1,85%), gordura vegetal hidrogenada (4,5%), Agar (0,8%), ácido propiônico (0,6%) e Metilparabeno (0,08%). Para os ensaios com resveratrol foi utilizado trans-resveratrol (Sigma, Saint Louis, EUA) diluído em etanol (70%). Cada tipo de meio foi dividido em três classes: meio sem resveratrol (controle), meio com resveratrol 5 μ M (representado por “R”) e meio com resveratrol 50 μ M (representado por “RR”), em adaptação de Bass *et al.* (2007b).

4.3. Ensaios de longevidade e fecundidade

Antes dos ensaios definitivos foram realizados testes de cultivo das linhagens para obter uma densidade larval consistente e constante, para minimizar sua interferência nos resultados finais. As moscas foram obtidas em um intervalo de 24h após a eclosão dos primeiros indivíduos dos vidros contendo meio de estoque e transferidas para vidros com os diferentes tipos de meio do ensaio e deixadas por mais 24h para permitir cópula. As moscas foram anestesiadas sob efeito de 1mL de éter etílico (98%) por 2 minutos para permitir a separação de fêmeas e machos, que em seguida foram transferidos para vidros vazios contendo 40 indivíduos, onde permaneceram por cerca de 1 hora, até voltarem ao seu estado ativo normal. Após esse período, as moscas foram transferidas para vidros contendo os meios do ensaio. As moscas foram transferidas para meio fresco regularmente duas vezes por semana e a mortalidade foi contabilizada a cada 2 dias. Todos os tratamentos, tanto da parte I como da parte II, foram testados no mínimo em tréplica.

Para o ensaio de fecundidade, exclusivo da parte I, as mesmas fêmeas do ensaio de longevidade foram transferidas a cada 4 dias para um novo vidro onde foram mantidas por 15 a 18 horas e em seguida colocadas em vidro com meio fresco. Os ovos depositados nesse período foram contados manualmente utilizando uma lupa. O índice de fecundidade foi determinado como a quantidade média de ovos postos por uma fêmea ao longo de sua vida.

4.4. Ensaio de Repetição Rápida de Geotaxia Negativa (RING)

O modelo *D. melanogaster* também é utilizado no estudo da deterioração locomotora senil, que nestes animais é frequentemente medida através de ensaio de geotaxia negativa. O teste RING foi realizado conforme Gargano *et al.* (2005), com

algumas adaptações. O aparelho RING consistiu em uma base de isopor com 6 tubos de vidro cilíndricos [15 X 2,5 cm (H X OD)] inseridos em fendas elaboradas de modo a acoplar os tubos (Figura 2).

A cada quatro (parte I) ou sete (parte II) dias machos previamente coletados e utilizados no ensaio de longevidade foram transferidos para os vidros do aparato RING. O ensaio é iniciado com a estimulação da resposta de geotaxia negativa das moscas através de rápidas batidas do aparelho contra a bancada por três vezes sucessivamente. Conforme Morrow (2004b), os indivíduos capazes de subir 8 cm em até 7 segundos foram contados a partir da filmagem do ensaio (Câmera fotográfica digital Sony Cybershot DSC-W300). O teste foi repetido cinco vezes consecutivas, com um intervalo de 30 segundos entre cada repetição.

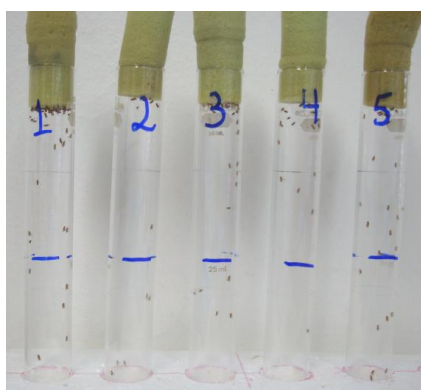


Figura 2. Aparato utilizado para realização do teste RING.

4.5. Preparações citogenéticas

Foram elaborados meios especiais de ovoposição que consistiram apenas em água destilada e Agar. Moscas jovens (máximo 10 dias de idade) foram mantidas nesses vidros por cerca de 20 horas, tempo suficiente para postura de grande quantidade de ovos, mas não o bastante para que os embriões atinjam o estágio larval. Decorrido o período, os ovos foram separados e transportados para o meio específico do tratamento,

perfazendo 20 ovos por vidro. Os meios foram mantidos a 25° C até aparecerem as primeiras larvas de 3º estágio.

As preparações de cromossomos politênicos foram obtidas através de esmagamento de glândulas salivares de larvas de 3º estágio. Após dissecação em solução salina 0,67% as glândulas foram fixadas em solução 3:2:1 de ácido acético, água e ácido láctico (Campos *et al.*, 2007) e coradas com solução de orceína acética a 1%, conforme Henderson *et al.* (2004).

4.6. Análise citogenética

As lâminas foram analisadas e fotografadas através do fotomicroscópio Leica DMLB, utilizando o software Leica IM50. Foram analisadas 4460 células de 891 indivíduos, conforme discriminado na Tabela 4. Braços cromossômicos 3L foram avaliados a fim de identificar os padrões dos pufes nos quais o gene *Hsp22* se encontra (Corces *et al.*, 1980).

Tabela 4 – Quantidade de indivíduos e células analisadas em cada tratamento para a quantificação da expressão dos pufes correspondentes aos genes *Sir2* e *Hsp22* de *Drosophila melanogaster*.

Linhagens		Meios								Total	
		-	-R	-RR	P	PR	PRR	+	+R	+RR	
OC	Indivíduos	18	15	15	15	12	18	39	30	18	180
	Núcleos	90	75	75	75	60	90	195	150	90	900
OP	Indivíduos	15	9	6	15	18	18	21	18	21	141
	Núcleos	75	45	30	75	90	90	105	90	105	705
OT	Indivíduos	9	5	4	33	12	18	15	24	15	135
	Núcleos	45	30	20	165	60	90	75	120	75	680
SW	Indivíduos	18	15	15	18	12	27	36	27	24	192
	Núcleos	90	75	75	90	60	135	180	135	120	960
S-	Indivíduos	12	9	12	33	30	27	40	50	30	243
	Núcleos	60	45	60	165	150	135	200	250	150	1215
Total	Indivíduos	72	53	52	114	84	108	151	149	108	891
	Núcleos	360	270	260	570	420	540	755	745	540	4460

A quantificação dos padrões de pufes foi realizada conforme Berendes (1965), o qual confere valores a cada variação de padrão, como pode ser observado na Tabela 5. Os padrões de pufes foram comparados com os de Ashburner e Berendes (1978), considerados padrão para *D. melanogaster*.

Tabela 5 – Quantificação dos padrões de pufe.

Valor atribuído	Características
0	Bandas inativas e bem coradas
1	Bandas levemente descondensadas
2	Pequenos pufes
3	Pufes de tamanho médio
4	Pufes grandes, com diâmetro duas vezes maior que o de uma banda vizinha condensada

4.7. Análise dos dados

O tempo de vida médio e máximo das moscas foram calculadas utilizando o Excel (2010) e comparadas através do teste *log-rank* no BioStat 5.3 (2007). A longevidade máxima foi obtida a partir da média dos indivíduos 10% mais longevos da população. Os valores de *p* das comparações de fecundidade foram obtidos através do teste Wilcoxon *rank-sum* também utilizando o BioStat 5.3 (2007).

A mortalidade idade-específica foi estimada como o número de animais vivos no fim do intervalo de tempo sobre o número de animais no começo do intervalo: $q_x = V_f/V_i$. A taxa de mortalidade instantânea (*hazard rate – hz*) foi calculada através da fórmula $hz = 2q_x/(2-q_x)$.

A trajetória de mortalidade foi construída através do ajuste dos dados de mortalidade instantânea ao modelo de mortalidade de Gompertz (Magalhães *et al.*, 2005): $\mu_x = Ae^{\alpha x}$, onde μ_x representa a taxa de mortalidade na idade *x*; *A* é a taxa de mortalidade inicial (IMR), independente da idade; e α é a taxa de envelhecimento (RoA),

observada como inclinação da curva de mortalidade. Ambos os parâmetros do modelo, A e α , foram estimados através de regressão não linear no programa JMP 9.0.2 (2010). O ajuste linear foi dado através da equação $\ln(\mu x) = \ln(A) + \alpha x$. O tempo de duplicação da taxa de mortalidade (MRDT) mede o período de tempo necessário para que taxa de mortalidade dobre, foi calculada a partir de $\ln(2)/\alpha$ e comparados através do teste-t das regressões.

A análise das relações e proporções entre as variáveis foi realizada através da Metodologia de Superfície de Resposta, no software JMP 9.0.2 (2010). Foi utilizada uma regressão linear de mínimos quadrados para estimar a superfície de resposta de cada tratamento, que foram comparadas através do teste F, como descrito por Lee *et al.* (2008).

As gravações do teste RING foram transferidas para o computador, em que foram utilizadas as imagens congeladas no 8º segundo para contagem das moscas que conseguiram atingir ou ultrapassar 8 centímetros de altura. O desempenho das moscas foi obtido a partir da média de cinco repetições. Os desempenhos no teste RING foram comparados utilizando teste paramétrico padrão (*test t*) no próprio Excel (2010).

As diferenças das médias dos padrões de pufes também foram testadas pelo teste *t* de Student utilizando o Excel (2010). Os ajustes de curva foram realizados, quando necessários, nos softwares JMP 9.0.2 (2010), SciDAVis 0.2.4 (2010) e Gnuplot 4.4 (2011).

5. RESULTADOS

5.1. Parte I - Experimentação com restrição dietética em *D. melanogaster* utilizando lipídios como variável nutricional

5.1.1. Sobrevivência e mortalidade

Os resultados do teste de sobrevivência nos diferentes meios de cultura podem ser observados na Figura 3. Inicialmente foram testadas cinco diluições, mantendo a mesma proporção entre os ingredientes (meio α). Ao contrário da diluição 0,5, as longevidades médias das fêmeas nas diluições de 0,25, 1,5 e 2 foram significativamente maiores do que na concentração controle (Tabela 6). Não houve diferenças expressivas na longevidade entre a menor (0,25) e as maiores diluições (1,5 e 2; $p=0,19$). Em machos, a longevidade média teve ampliação significativa com o aumento da concentração do meio até alcançar um platô na concentração padrão, mantendo-se constante ao longo das concentrações seguintes (1,5 x 2, $p=0,29$).

Para avaliar o papel do lipídio no envelhecimento, independentemente da quantidade de calorias, foram testadas cinco diferentes proporções entre lipídios e carboidrato+proteína, mantendo-se o mesmo conteúdo calórico (dietas isocalóricas - meio β). A longevidade média de fêmeas em todas as proporções dietéticas variou significativamente do meio controle (0% lipídios; Tabela 7). O ápice da longevidade máxima em machos foi alcançado na concentração de 30% de lipídios, passando a declinar na concentração de 50% (30% x 50%, $p=0,006$) e mantendo-se estável além dessa concentração (50% x 70%, $p=0,18$).

No experimento com o meio γ foi testada a utilização de lipídios tanto como parâmetro qualitativo (adição de lipídio) como quantitativo (aumento gradual da quantidade de lipídio), mantendo-se a quantidade, índice calórico e proporção dos outros

Tabela 6 – Parâmetros de longevidade e mortalidade de *Drosophila melanogaster* no Meio α .

Gênero	Diluição Meio α	<i>n</i>	LMed	LMax	IMR	RoA	MRDT	%MRDT	<i>p</i>
Fêmeas	0.25	172	25,27	40,23	0,0063	0,132	5,25	-6%	0,23
	0.5	178	17,44	40,40	0,0090	0,097	7,14	+27%	0,03
	1	191	17,07	34,42	0,0130	0,124	5,58	-	-
	1.5	175	22,13	35,46	0,0041	0,178	3,89	-30%	0,04
	2	187	21,86	37,22	0,0020	0,179	3,87	-30%	<0,0001
Machos	0.25	99	30,00	37,01	0,0011	0,200	3,46	-48%	<0,0001
	0.5	79	26,54	50,09	0,0070	0,095	7,29	+8%	0,006
	1	70	30,26	63,43	0,0120	0,103	6,72	-	-
	1.5	76	41,52	58,25	0,0037	0,130	5,33	-20%	0,018
	2	68	29,29	57,02	0,0080	0,205	3,38	-49%	<0,0001

n, tamanho da amostra; LMed, longevidade média (dias); LMax, longevidade máxima (dias); IMR, taxa de mortalidade inicial; RoA, taxa de envelhecimento; MRDT, tempo de duplicação da taxa de mortalidade (dias); %MRDT, diferenças em porcentagem do MRDT em relação ao grupo controle (em negrito).

Tabela 7 – Parâmetros de longevidade e mortalidade de *Drosophila melanogaster* no Meio β .

Gênero	Diluição Meio β	<i>n</i>	LMed	LMax	IMR	RoA	MRDT	%MRDT	<i>p</i>
Fêmeas	0%	148	28,93	69,00	0,0080	0,076	9,12	-	-
	10%	171	17,76	39,70	0,0180	0,091	7,61	-16%	0,001
	30%	191	17,07	34,42	0,0130	0,124	5,58	-38%	0,0006
	50%	164	17,62	29,79	0,0070	0,176	3,93	-56%	<0,0001
	70%	155	20,70	29,00	0,0026	0,240	2,88	-68%	<0,0001
Machos	0%	67	30,15	34,04	0,0011	0,170	4,07	-	-
	10%	80	26,14	41,50	0,0070	0,110	6,30	+54%	<0,0001
	30%	70	30,26	63,43	0,0120	0,103	6,72	+65%	<0,0001
	50%	88	19,36	27,13	0,0080	0,180	3,85	-5%	0,06
	70%	68	22,43	26,00	0,0037	0,178	3,89	-5%	0,24

n, tamanho da amostra; LMed, longevidade média (dias); LMax, longevidade máxima (dias); IMR, taxa de mortalidade inicial; RoA, taxa de envelhecimento; MRDT, tempo de duplicação da taxa de mortalidade (dias); %MRDT, diferenças em porcentagem do MRDT em relação ao grupo controle (em negrito).

Tabela 8 - Parâmetros de longevidade e mortalidade de *Drosophila melanogaster* no Meio γ .

Gênero	Diluição Meio γ	<i>n</i>	LMed	LMax	IMR	RoA	MRDT	%MRDT	<i>p</i>
Fêmeas	0g/L	99	39,22	63,60	0,0011	0,089	7,70	-	-
	3g/L	167	33,34	57,01	0,0038	0,120	5,77	-25%	0,002
	15g/L	182	19,50	48,11	0,0047	0,138	5,02	-35%	0,005
	30g/L	171	17,07	34,42	0,0130	0,111	6,24	-19%	0,0006
	45g/L	156	18,30	35,97	0,0049	0,180	3,85	-50%	0,001
	60g/L	183	18,35	33,08	0,0001	0,267	2,59	-66%	0,001
Machos	0g/L	52	33,09	42,00	0,0001	0,131	5,29	-	-
	3g/L	96	38,36	65,54	0,0115	0,099	7,00	+32%	<0,0001
	15g/L	73	39,75	60,87	0,0010	0,091	7,61	+44%	0,001
	30g/L	70	30,26	63,43	0,0020	0,102	6,79	+28%	<0,0001
	45g/L	72	22,44	54,44	0,0150	0,127	5,45	+3%	0,19
	60g/L	79	24,27	45,40	0,0180	0,171	4,05	-23%	<0,0001

n, tamanho da amostra; LMed, longevidade média (dias); LMax, longevidade máxima (dias); IMR, taxa de mortalidade inicial; RoA, taxa de envelhecimento; MRDT, tempo de duplicação da taxa de mortalidade (dias); %MRDT, diferenças em porcentagem do MRDT em relação ao grupo controle (em negrito).

ingredientes. Como pode ser observado na Tabela 8, a longevidade média e máxima das fêmeas apresentou ápice nos meios com ausência de lipídios, declinando até a adição de 30g/L de lipídios ($p < 0,0001$), a partir de onde se manteve estável (30g/L x 45g/L e 60g/L; $p > 0,08$). Em machos, a adição de quantidades moderadas de lipídios aumentou a longevidade média até o ápice em 30g/L. No entanto, quantidades de lipídios acima de 30g/L tiveram efeito oposto (30g/L x 45g/L e 60g/L, $p < 0,0002$), reduzindo a longevidade.

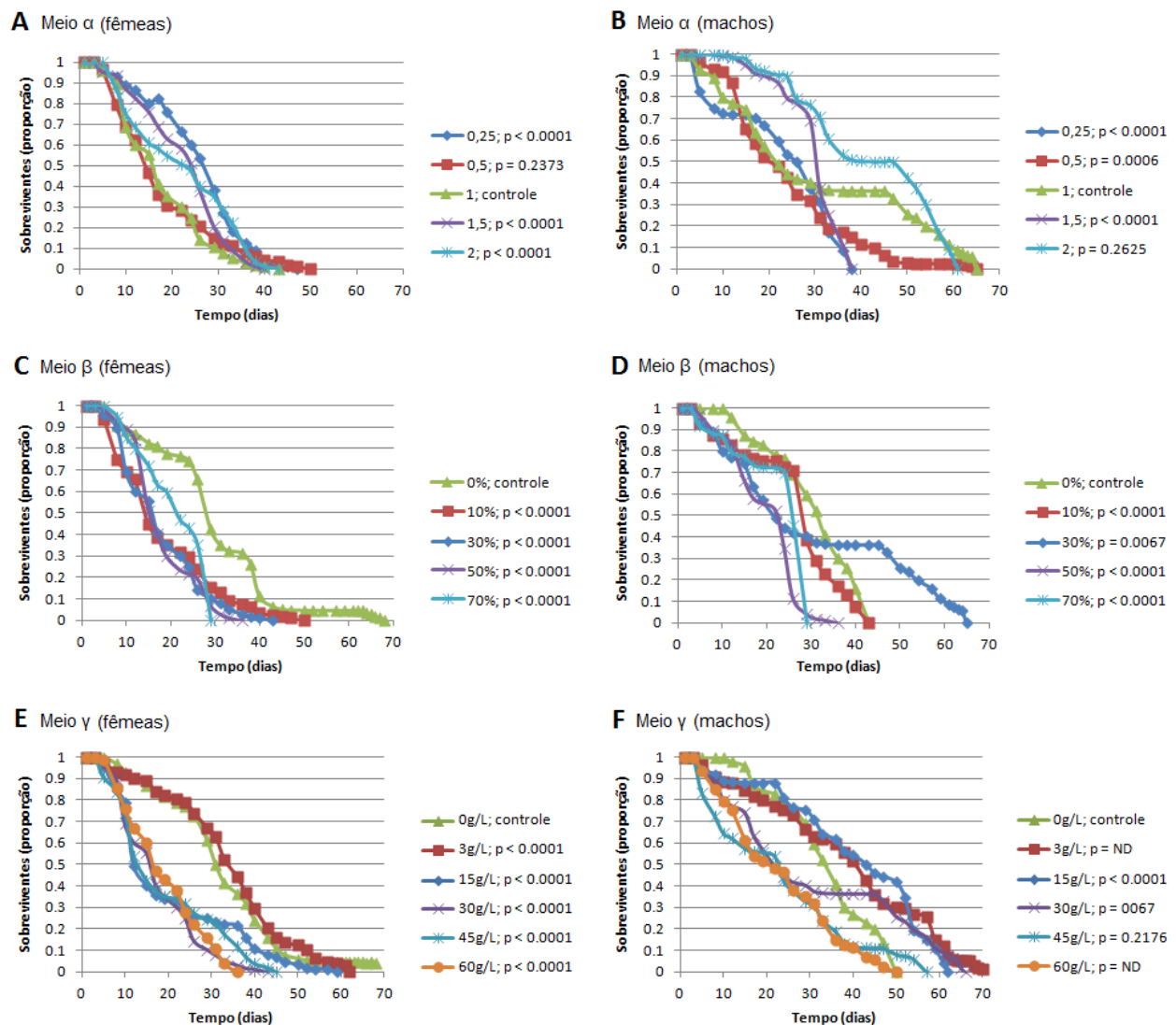


Figura 3 – Efeito da alteração lipídica dietética sobre a senescência demográfica em *Drosophila melanogaster*. Curvas de sobrevivência nos meio α, β e γ em fêmeas (A, C e E respectivamente) e em machos (B, D e F respectivamente). p , nível de significância referente ao controle; ND, não determinado.

As trajetórias de mortalidade diferiram em relação ao gênero e ao tratamento (Figura 4). A menor taxa de mortalidade foi observada na concentração de 0,5 (0,25 x 0,5, $p=0,002$; 0,5 x 1,5 e 2, $p<0,04$). Houve diminuição na taxa de mortalidade inicial (IMR) nos meios 0,25, 1,5 e 2 e da taxa de envelhecimento (RoA) nos meios 0,5 em relação ao padrão (Tabela 6). Não houve diferença entre as concentrações 1,5 e 2 ($p=0,12$). A alteração da proporção entre lipídios e os outros ingredientes modificou significativamente a mortalidade das fêmeas, elevando a taxa de mortalidade instantânea proporcionalmente ao aumento da proporção de lipídios (Tabela 7), diminuindo drasticamente o tempo de duplicação de taxa de mortalidade (MRDT). A adição de lipídios à composição fixa de carboidratos e proteínas (meios γ) alterou significativamente a trajetória de mortalidade em fêmeas (Tabela 8), que alcançaram a menor RoA e maior MRDT na ausência de lipídios (meio β , 0% e meio γ , 0g/L). A adição de lipídios aumentou RoA e diminuiu MRDT em fêmeas proporcionalmente à quantidade adicionada.

A resposta dos machos em relação às diluições totais do meio foi semelhante à das fêmeas, com diminuição da inclinação da trajetória da curva no meio 0,5 em relação aos meios mais concentrados (0,5 x 1,5 e 2; $p<0,0001$) e em relação ao meio mais diluído (0,5 x 0,25, $p<0,05$). Houve diminuição da IMR nas diluições 2 e 1,5, mas não foi observada redução de RoA em nenhuma diluição quando comparada ao padrão. Ambos os sexos apresentaram maiores MRDT na diluição 0,5 (Tabela 6). Machos alcançaram a menor mortalidade instantânea em meios contendo quantidades leves e moderadas de lipídios (Meio γ , 3g/L e 15g/L). A adição de lipídios acima dessas quantidades diminuiu a taxa de envelhecimento e aumentou MRDT ($p<0,001$). A proporção de lipídios no qual machos tiveram menor taxa de mortalidade instantânea foi 30% (30% x resto, $p<0,04$). Nesses meios, o MRDT aumentou até a proporção de 30%, a partir do qual diminuiu, mantendo constante entre as proporções lipídicas em 50% e 70% ($p=0,28$).

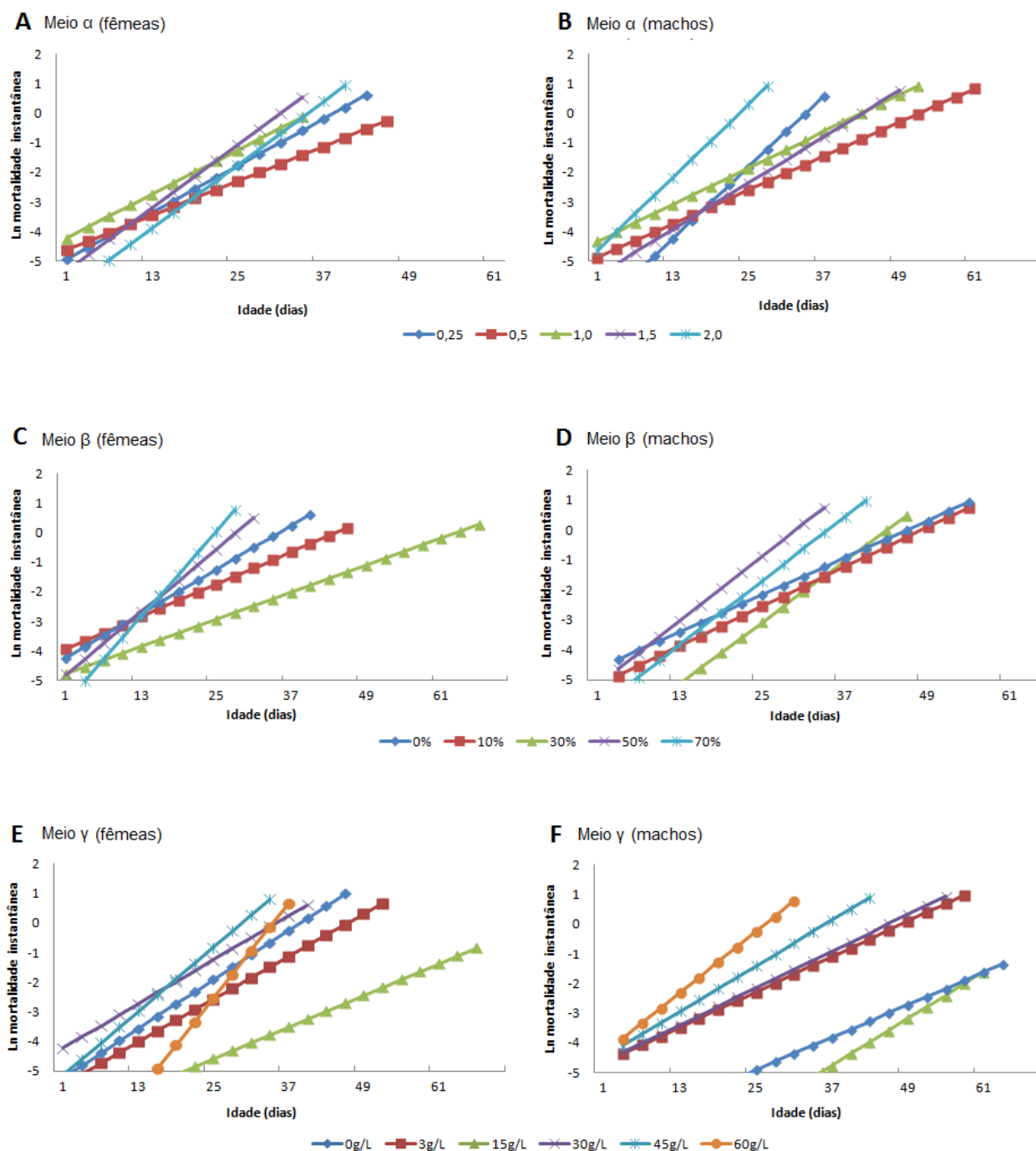


Figura 4 – Logaritmo natural da taxa de mortalidade de populações de *Drosophila melanogaster* submetidas a diferentes dietas. Trajetórias de mortalidade nos meios α , β e γ em fêmeas (A, C e E respectivamente) e em machos (B, D e F respectivamente), baseadas nos parâmetros de Gompertz (Magalhães *et al.*, 2005) nos diferentes tratamentos dietéticos.

5.1.2. Fecundidade

A fecundidade de *D. melanogaster* foi analisada a partir do índice de ovoposição, que consistiu no número médio de ovos colocados por cada fêmea no decorrer da vida (Figura 5). O maior índice de ovoposição foi observado no meio sem lipídios e na diluição

2 (meio α) e o menor índice na diluição 0,25 (meio α) e 1,5 e 2 (meio γ). O número de ovos por fêmea aumentou proporcionalmente à concentração do meio (meio α). O aumento da proporção de lipídios em relação aos outros ingredientes diminuiu significativamente o índice de ovoposição (0% x 10%, $p=0,03$), mantendo-se estável em 10%, 30% e 50% ($p>0,1$), caindo bruscamente no meio de proporção 70% (50% x 70%, $p=0,024$). Pequena adição de lipídio foi o suficiente para diminuir intensamente a ovoposição (0g/L x 3g/L, $p=0,0003$), que se manteve estável até a adição de 30g/L (3g/L x 15g/L e 30g/L, $p>0,17$), a partir da qual voltou a declinar (30g/L x 45g/L e 60g/L, $p<0,01$).

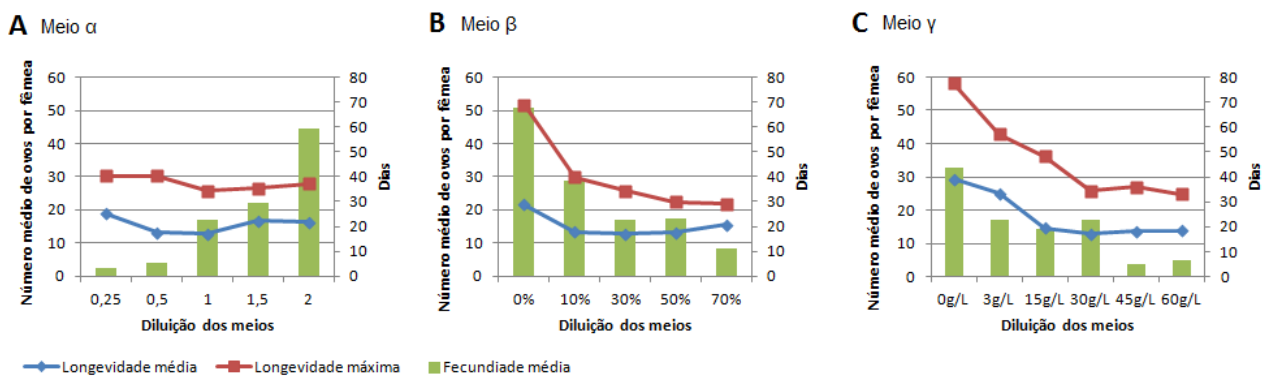


Figura 5. Longevidade média, máxima e índice de ovoposição de fêmeas de *Drosophila melanogaster* em resposta à alteração lipídica do meio. Efeitos de diluições totais do meio α (A), da alteração da proporção de lipídios no meio β (B) e da suplementação com lipídios no meio γ (C) no tempo médio e máximo de vida e na fecundidade de fêmeas de *D. melanogaster*.

5.1.3. Teste RING

A restrição dietética não melhorou o desempenho geral dos machos no ensaio de repetição rápida de geotaxia negativa (RING) no meio α . Machos alimentados com o meio energeticamente mais rico foram significativamente melhores no ensaio RING (2 x 0,25, 0,5, 1, 1,5, $p<0,03$), tanto na juventude ($p<0,02$; com exceção de 0,5, $p=0,11$), quanto na maturidade ($p<0,01$), como pode ser observado na Figura 7. Nos meios β e γ , os machos apresentaram um melhor desempenho geral nos meios sem lipídios, quando

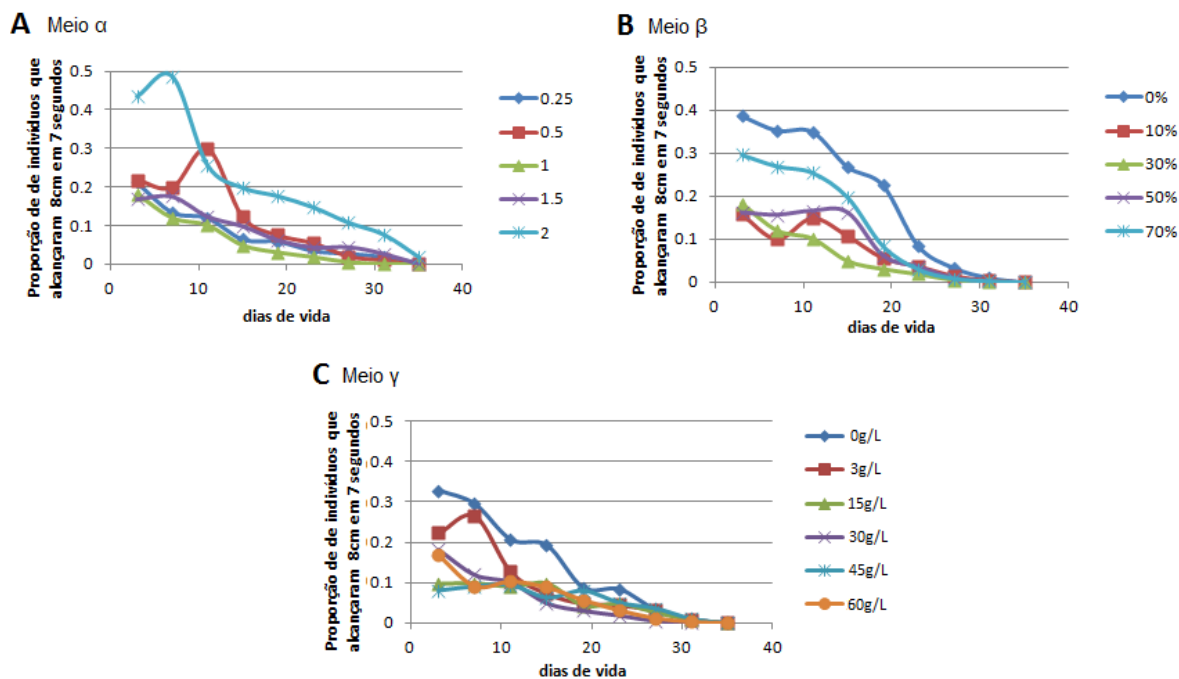


Figura 6 – Desempenho de machos de *Drosophila melanogaster* no teste RING. (A) Diluição do meio não melhorou desempenho no ensaio de geotaxia negativa. (B) Aumento da proporção de lipídios e (C) adição de gordura prejudicou o desempenho no teste RING (Gargano *et al.*, 2005).

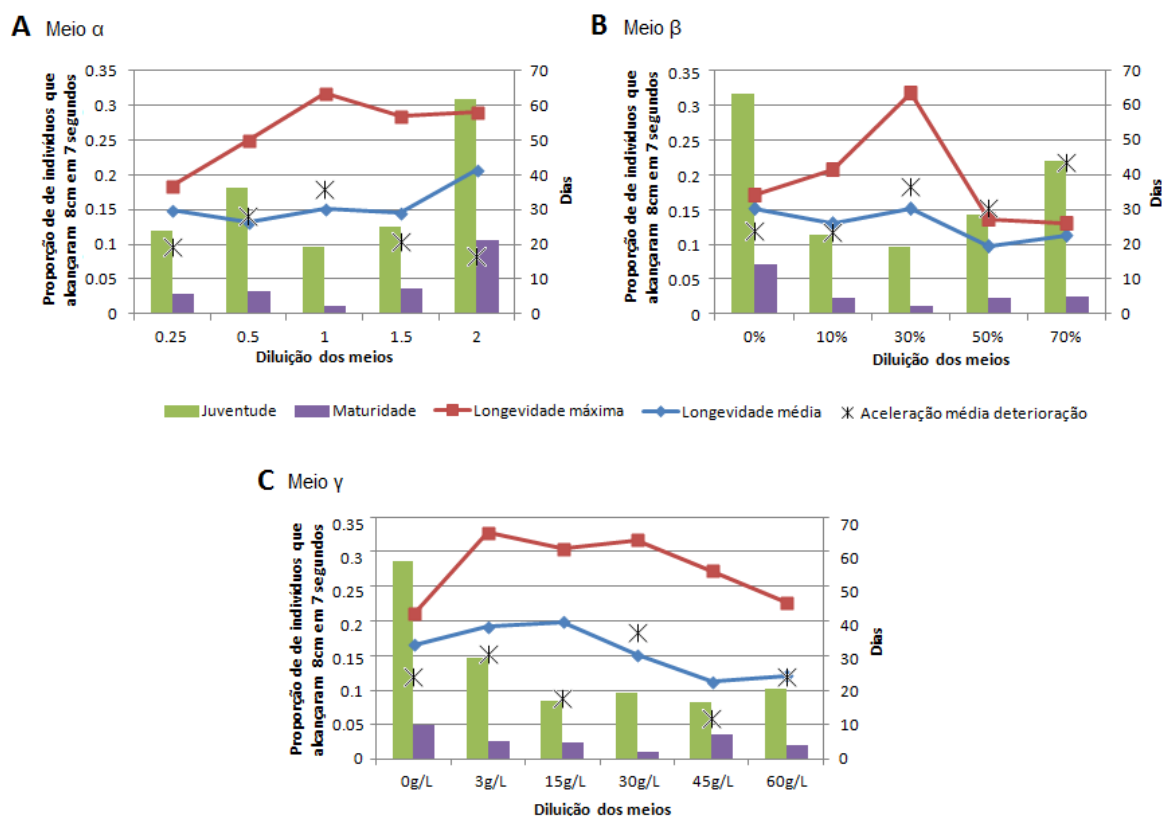


Figura 7– Longevidade média, máxima e deterioração da resposta neuromotora em resposta à alteração lipídica do meio em machos de *Drosophila melanogaster*. Efeitos de diluições totais (A), da alteração da proporção de lipídios (B) e da suplementação com lipídios (C) no tempo médio e máximo de vida e na aceleração média de deterioração do desempenho no teste RING entre a juventude (média do desempenho até 19 dias) e a maturidade (média do desempenho a partir de 20 dias até 35 dias de vida).

comparados com outras concentrações/adições lipídicas (0% x outros meios β , $p<0,007$; 0g/L x outros meios γ , $p<0,01$). Os meios nos quais os machos atingiram melhor desempenho foram diluição 2 e proporção 0 de lipídios, não havendo diferença significativa entre eles ($p=0,54$), tanto na juventude ($p=0,42$) quanto na maturidade ($p=0,07$).

5.1.4. Superfície de Resposta

Apesar do experimento não ter sido planejado com este objetivo, os dados obtidos neste trabalho também foram utilizados para gerar um mapa de espaço nutricional lipídios x proteínas-carboidratos, no qual superfícies de resposta de longevidade média e máxima, fecundidade (Figura 8) e MRDT (Figura 9) pudessem ser aferidas. A forma da superfície de resposta variou de acordo com o sexo e parâmetro avaliado (LMed fêmeas x LMed machos, LMax fêmeas x LMax machos, $p=0,01$; LMed fêmeas x LMax fêmeas, $p=0,08$; LMed machos x LMax machos, $p=0,0006$; LMed fêmeas x Fecundidade, $p=0,002$). Fêmeas apresentaram maior longevidade média e máxima, assim como maior MRDT, em dieta sem ou com baixa proporção de lipídios (P-C:L, 1:0 até 12:1) e conteúdo energético intermediário, que foram diminuindo gradativamente com o aumento da proporção de lipídios. A resposta de superfície da produção média de ovos por fêmea atingiu o pico em conteúdo calórico mais elevado (acima de 700 Kcal total), em todas as proporções lipídicas.

A longevidade média de machos teve ápice nas concentrações calóricas e lipídicas mais elevadas. A superfície de resposta da longevidade máxima demonstra um padrão disruptivo, com ápices em meio com conteúdo calórico total intermediário, com proporção nula à média de lipídios (P-C:L, 1:0 à 4:1) e em meios com conteúdo energético total alto, com maior proporção de calorias provenientes de lipídios em relação aos outros componentes do meio (2:1). A resposta de superfície de MRDT descreveu padrão similar

ao de longevidade máxima, mas com ápice apenas em conteúdos calóricos moderados (350 à 500 Kcal totais), com concentrações altas de lipídios. A fecundidade e a longevidade em ambos os sexos não se mantiveram ao curso da linha isocalórica, indicando que as diferenças dessas respostas não foram devido à restrição energética (RC).

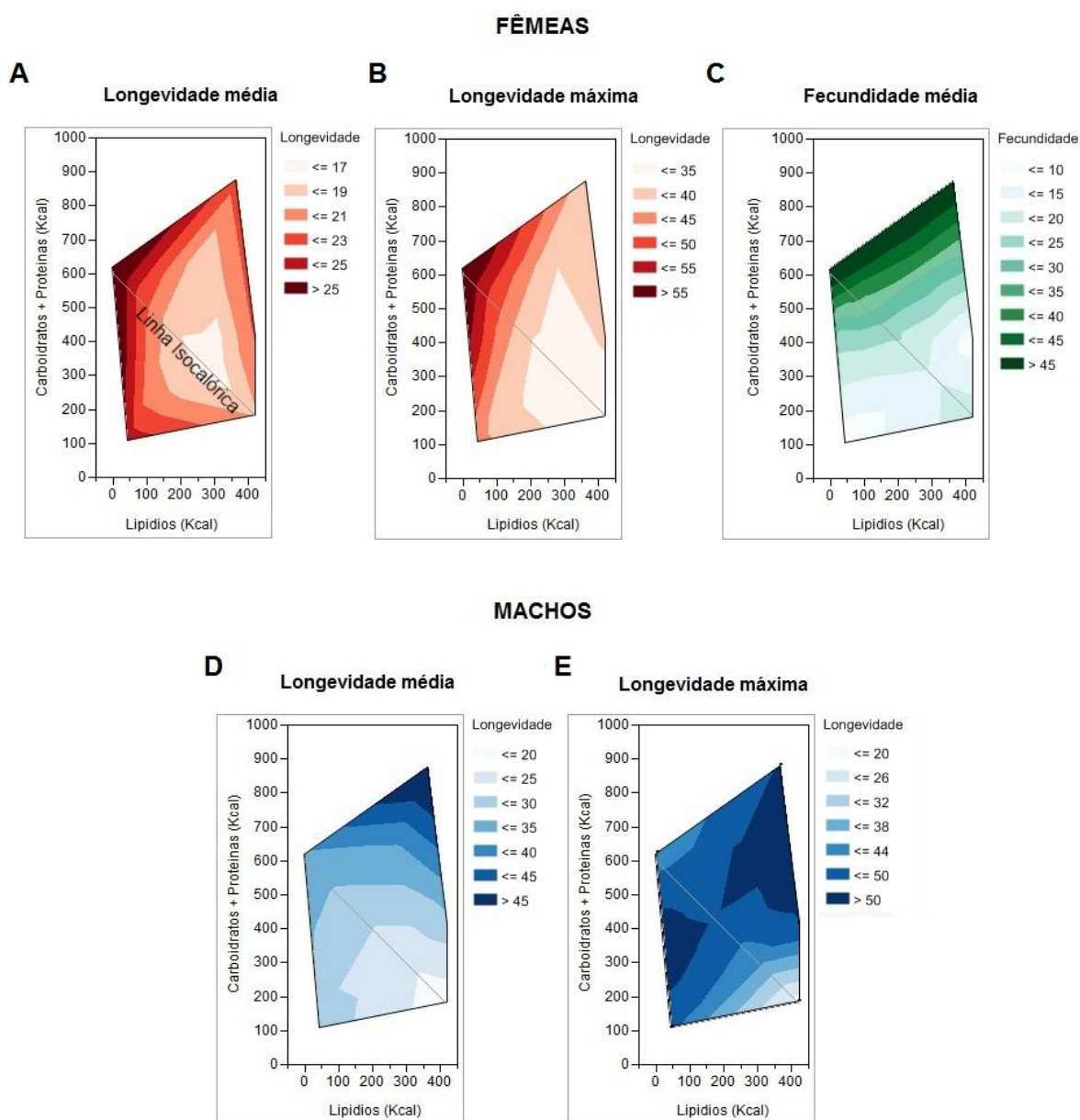


Figura 8 – Efeitos da proporção de calorias procedentes de lipídios em relação a calorias de carboidratos e proteínas na longevidade e fecundidade de *D. melanogaster*. Longevidade média (A), máxima (B) e na fecundidade (C) de fêmeas, e na longevidade média (D) e máxima (E) de machos.

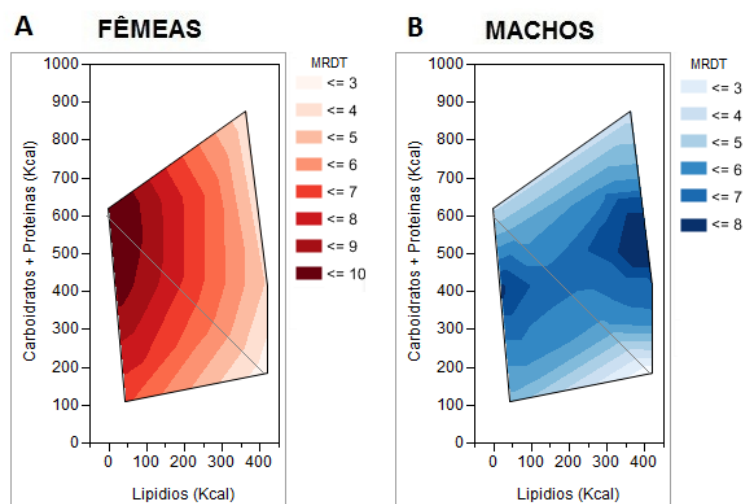


Figura 9 – Efeitos da proporção de calorias procedentes de lipídios em relação a calorias de carboidratos e proteínas no tempo de duplicação da taxa de mortalidade (MRDT) em *Drosophila melanogaster*. Superfície de reposta em fêmeas (A) e em machos (B).

5.2. Parte II – Efeitos da interação entre resveratrol e restrição dietética na formação do pufe *Hsp22* e seus efeitos sobre o envelhecimento em diferentes linhagens de *Drosophila melanogaster*

5.2.1. Sobrevivência e mortalidade

A curva de sobrevivência, as longevidade médias e máximas, a trajetória de mortalidade e o desempenho no teste de geotaxia negativa em reposta ao tratamento variaram de acordo com o genótipo e o sexo. Entre as linhagens de Oregon-R, fêmeas e machos de OT alcançaram maior longevidade média e máxima em relação à OP e OC ($p < 0,02$). Não houve diferenças significativas entre longevidade média e máxima em ambos os sexos entre as linhagens OC e OP ($p > 0,08$). Na linhagem OC, tanto fêmeas quanto machos atingiram maior longevidade nos meios hipocalóricos. Em ambos os sexos, o resveratrol não alterou a longevidade em meios hipocalóricos. Entretanto, algumas concentrações de resveratrol promoveram a diminuição da longevidade em meios padrão e hipercalórico (Tabela 9). A maior longevidade média em fêmeas da linhagem OP ocorreu no meio hipocalórico sem resveratrol e maior longevidade máxima

no meio hipercalórico sem resveratrol (Tabela 10). No entanto, a maior longevidade média e máxima em machos ocorreu em meio hipocalórico e padrão, respectivamente (Figura 10). Tanto em fêmeas quanto em machos, o resveratrol ou não alterou ou diminuiu a longevidade.

Na linhagem OT, a maior longevidade foi atingida em meio hipercalórico, tanto em fêmeas como em machos. Em fêmeas, a adição de baixa concentração de resveratrol ao meio hipocalórico diminuiu e maior concentração aumentou a longevidade. Em meio padrão, a adição de resveratrol aumentou a longevidade, assim como a adição de baixa concentração de resveratrol ao meio hipercalórico. Por outro lado a alta concentração de resveratrol diminuiu a longevidade em meio hipercalórico (Tabela 11). Em machos, de maneira geral, a adição de resveratrol aumentou a longevidade em meios hipocalóricos e padrão, mas não alterou significativamente em meios hipercalóricos (Tabela 11).

Tabela 9 – Parâmetros de longevidade e mortalidade da linhagem OC de *Drosophila melanogaster* nos diferentes tratamentos.

Gênero	Meio	<i>n</i>	LMed	LMax	<i>p</i> *	IMR	RoA	MRDT	<i>p</i> **
Fêmeas	-	149	28,12	51,55	<0,0001	0,0021	0,109	6,35	0,001
	-R	122	29,10	46,97	0,18	0,0029	0,113	6,13	0,26
	-RR	126	26,04	45,31	0,079	0,0041	0,125	5,54	0,07
	P	87	19,00	29,20	-	0,0010	0,121	5,73	-
	PR	83	16,63	24,85	0,3	0,0028	0,139	4,98	<0,0001
	PRR	101	15,57	19,00	<0,0001	0,0051	0,378	1,83	0,0003
	+	136	22,72	45,07	0,01	0,0011	0,191	6,63	<0,0001
	+R	95	19,80	35,05	0,042	0,0005	0,293	2,37	<0,0001
	+RR	177	19,05	33,05	0,028	0,0002	0,312	2,22	<0,0001
Machos	-	111	32,52	47,87	0,003	0,0014	0,128	5,41	0,04
	-R	146	30,73	44,04	0,07	0,0038	0,094	7,37	0,01
	-RR	126	28,92	42,06	0,034	0,0005	0,135	5,13	0,16
	P	182	26,60	51,80	-	0,0035	0,094	7,37	-
	PR	91	22,46	44,00	0,002	0,0005	0,090	7,70	<0,0001
	PRR	78	23,07	34,38	0,035	0,0100	0,141	4,91	<0,0001
	+	140	28,10	46,71	0,011	0,0003	0,108	6,41	0,02
	+R	91	21,28	44,93	<0,0001	0,0136	0,098	7,07	0,07
	+RR	125	21,26	38,48	0,02	0,0110	0,145	4,78	0,0005

n, tamanho da amostra; LMed, longevidade média (dias); LMax, longevidade máxima (dias); IMR, taxa de mortalidade inicial; RoA, taxa de envelhecimento; MRDT, tempo de duplicação da taxa de mortalidade (dias); *p**, significância entre curvas de sobrevivência; *p***, significância entre curvas de mortalidade.

Tabela 10. Parâmetros de longevidade e mortalidade da linhagem OP de *Drosophila melanogaster* nos diferentes tratamentos.

Gênero	Meio	<i>n</i>	LMed	LMax	<i>p</i> *	IMR	RoA	MRDT	<i>p</i> **
Fêmeas	-	148	28,34	41,23	0,2	0,0050	0,097	7,15	<0,0001
	-R	89	25,57	41,50	0,55	0,0006	0,135	5,13	0,29
	-RR	149	22,19	37,37	0,09	0,0018	0,146	4,75	0,006
	P	102	23,24	41,07	-	0,0165	0,095	7,30	-
	PR	108	19,92	27,40	0,025	0,0350	0,131	5,29	0,36
	PRR	92	20,02	26,50	<0,0001	0,0022	0,188	3,69	0,021
	+	137	21,39	54,80	<0,0001	0,0041	0,122	5,68	0,19
	+R	109	25,53	47,11	0,07	0,0005	0,133	5,21	0,36
	+RR	102	21,90	32,81	<0,0001	0,0161	0,151	4,59	<0,0001
Machos	-	131	32,91	41,14	<0,0001	0,0115	0,108	6,42	0,055
	-R	120	25,89	39,38	0,11	0,0016	0,153	4,53	0,001
	-RR	109	23,32	36,66	<0,0001	0,0019	0,169	4,10	0,04
	P	82	28,38	50,16	-	0,0140	0,095	7,30	-
	PR	90	21,70	43,53	<0,0001	0,0220	0,092	7,53	0,09
	PRR	80	27,23	44,62	<0,0001	0,0108	0,109	6,36	0,26
	+	136	29,53	47,67	0,08	0,0010	0,116	5,98	0,059
	+R	93	27,88	47,09	0,021	0,0084	0,146	4,75	0,025
	+RR	132	24,34	41,43	0,005	0,0005	0,159	4,36	0,006

n, tamanho da amostra; LMed, longevidade média (dias); LMax, longevidade máxima (dias); IMR, taxa de mortalidade inicial; RoA, taxa de envelhecimento; MRDT, tempo de duplicação da taxa de mortalidade (dias); *p**, significância entre curvas de sobrevivência; *p***, significância entre curvas de mortalidade.

Tabela 11. Parâmetros de longevidade e mortalidade da linhagem OT de *Drosophila melanogaster* nos diferentes tratamentos.

Gênero	Meio	<i>n</i>	LMed	LMax	<i>p</i> *	IMR	RoA	MRDT	<i>p</i> **
Fêmeas	-	115	24,77	42,87	<0,0001	0,0011	0,098	7,07	0,001
	-R	190	20,92	40,86	0,02	0,0016	0,156	4,44	<0,0001
	-RR	180	28,02	50,34	0,001	0,0025	0,102	6,80	<0,0001
	P	76	22,31	44,69	-	0,0003	0,190	3,65	-
	PR	84	19,95	32,69	<0,0001	0,0008	0,086	8,06	0,0001
	PRR	88	21,31	39,18	0,002	0,0009	0,095	7,30	0,04
	+	132	34,46	50,51	<0,0001	0,0001	0,082	8,45	0,008
	+R	97	34,33	52,66	0,12	0,0003	0,108	6,42	<0,0001
	+RR	102	26,54	58,78	0,006	0,0010	0,130	5,33	0,02
Machos	-	140	28,36	43,64	0,0006	0,0033	0,115	6,03	0,14
	-R	144	26,47	40,45	0,001	0,0002	0,153	4,53	<0,0001
	-RR	89	30,28	50,16	0,0001	0,0002	0,097	7,15	0,0007
	P	78	18,91	41,81	-	0,0005	0,133	5,21	-
	PR	92	23,61	40,67	<0,0001	0,0007	0,121	5,73	0,0002
	PRR	88	28,63	53,31	0,002	0,0009	0,105	6,60	<0,0001
	+	145	30,18	49,79	0,001	0,0001	0,123	5,64	0,1
	+R	127	32,62	50,17	0,11	0,0004	0,108	6,42	0,002
	+RR	133	35,19	49,00	0,37	0,0007	0,076	9,12	<0,0001

n, tamanho da amostra; LMed, longevidade média (dias); LMax, longevidade máxima (dias); IMR, taxa de mortalidade inicial; RoA, taxa de envelhecimento; MRDT, tempo de duplicação da taxa de mortalidade (dias); *p**, significância entre curvas de sobrevivência; *p***, significância entre curvas de mortalidade.

Maior longevidade em ambos os sexos da linhagem Swt foram atingidas em meio hipocalórico. Adição de resveratrol diminuiu a longevidade em meio hipocalórico e padrão, mas aumentou em meio hipercalórico em fêmeas. A adição de resveratrol aumentou a longevidade de machos em todos os tipos de meio (Tabela 12). A maior longevidade em fêmeas da linhagem Sir2- ocorreu nos meios hipocalóricos. Adição de resveratrol a esse meio não alterou a curva de sobrevivência, mas diminuiu a longevidade no meio padrão. Baixa concentração de resveratrol em meio hipercalórico não alterou a longevidade, mas aumentou em maior concentração. Em machos, maior longevidade foi alcançada em meio hipercalórico. A adição de resveratrol aumentou a longevidade em meio hipocalórico, mas diminuiu em meio padrão e hipercalórico (Tabela 13).

Tabela 12. Parâmetros de longevidade e mortalidade da linhagem Swt de *Drosophila melanogaster* nos diferentes tratamentos.

Gênero	Meio	<i>n</i>	LMed	LMax	<i>p</i> *	IMR	RoA	MRDT	<i>p</i> **
Fêmeas	-	141	12,58	25,00	0,0006	0,1490	0,112	6,19	<0,0001
	-R	148	10,10	18,88	0,026	0,0030	0,151	4,59	<0,0001
	-RR	97	10,42	26,36	0,0004	0,0430	0,123	5,64	0,01
	P	102	12,49	23,68	-	0,0520	0,145	4,78	-
	PR	92	12,24	17,60	0,001	0,0440	0,198	3,50	0,0037
	PRR	81	9,17	10,76	<0,0001	0,0920	0,201	3,45	<0,0001
	+	135	8,02	9,00	0,01	0,0240	0,230	3,01	0,48
	+R	138	10,52	12,09	<0,0001	0,0101	0,190	3,65	0,0002
	+RR	98	9,29	12,84	<0,0001	0,0122	0,166	4,18	<0,0001
Machos	-	177	12,78	18,20	0,012	0,1300	0,103	6,73	<0,0001
	-R	104	14,49	24,28	<0,0001	0,0421	0,137	5,06	0,045
	-RR	115	14,75	27,69	0,0006	0,0231	0,123	5,64	0,001
	P	112	8,339	11,78	-	0,1430	0,150	4,62	-
	PR	88	13,43	31,63	0,01	0,0170	0,105	6,60	<0,0001
	PRR	170	10,29	21,23	0,005	0,2520	0,124	5,59	0,001
	+	122	8,073	16,44	0,001	0,0310	0,120	5,78	0,028
	+R	77	14,27	21,10	<0,0001	0,0705	0,104	6,66	<0,0001
	+RR	95	12,70	21,59	<0,0001	0,0360	0,111	6,24	<0,0001

n, tamanho da amostra; LMed, longevidade média (dias); LMax, longevidade máxima (dias); IMR, taxa de mortalidade inicial; RoA, taxa de envelhecimento; MRDT, tempo de duplicação da taxa de mortalidade (dias); *p**, significância entre curvas de sobrevivência; *p***, significância entre curvas de mortalidade.

Tabela 13. Parâmetros de longevidade e mortalidade da linhagem Sir2- de *Drosophila melanogaster* nos diferentes tratamentos.

Gênero	Meio	n	LMed	LMax	p*	IMR	RoA	MRDT	p**
Fêmeas	-	85	24,32	44,00	0,001	0,0005	0,129	5,37	0,005
	-R	154	26,38	48,68	0,16	0,0003	0,121	5,73	0,01
	-RR	159	27,87	43,94	0,07	0,0003	0,149	4,65	<0,0001
	P	94	19,00	29,75	-	0,0009	0,189	3,67	-
	PR	106	13,95	39,69	0,012	0,0002	0,206	3,36	0,013
	PRR	102	13,12	32,13	0,001	0,0003	0,185	3,75	0,008
	+	117	20,58	38,54	0,021	0,0082	0,097	7,15	<0,0001
	+R	97	20,68	44,45	0,17	0,0080	0,220	3,15	<0,0001
	+RR	144	24,61	31,45	0,0002	0,0021	0,138	5,02	<0,0001
Machos	-	122	27,95	47,54	0,01	0,0016	0,189	3,67	<0,0001
	-R	173	35,06	52,61	<0,0001	0,0002	0,081	8,56	0,012
	-RR	142	34,66	44,49	<0,0001	0,0001	0,133	5,21	0,0006
	P	72	26,22	50,00	-	0,0041	0,101	6,86	-
	PR	69	24,92	42,29	0,007	0,0018	0,102	6,80	0,2
	PRR	122	15,61	42,42	0,0006	0,0012	0,177	3,92	0,002
	+	127	36,07	54,56	0,001	0,0016	0,089	7,79	0,002
	+R	92	26,53	54,97	0,0115	0,0001	0,118	5,87	<0,0001
	+RR	94	17,26	33,29	0,0037	0,0030	0,159	4,36	<0,0001

n, tamanho da amostra; LMed, longevidade média (dias); LMax, longevidade máxima (dias); IMR, taxa de mortalidade inicial; RoA, taxa de envelhecimento; MRDT, tempo de duplicação da taxa de mortalidade (dias); p*, significância entre curvas de sobrevivência; p**, significância entre curvas de mortalidade.

A trajetória de mortalidade também foi bastante modificada nos diferentes tratamentos (Figura 11). Fêmeas da linhagem OC tiveram menor mortalidade em meio hipocalórico em relação ao controle (P), com alteração em RoA. A adição de resveratrol em meio hipocalórico não alterou significativamente a mortalidade, mas adição ao meio padrão e hipercalórico aumentou a mortalidade em ambas as concentrações. Machos OC tiveram menor mortalidade no meio padrão. Em meio hipocalórico, a adição leve de resveratrol foi capaz de diminuir a mortalidade, mas uma maior quantidade reverteu o efeito. A adição leve de resveratrol em meio padrão alterou a trajetória de mortalidade, com diminuição da mortalidade inicial, no entanto, quando em maior quantidade aumentou RoA. Em meio hipercalórico, a adição de baixa quantidade de resveratrol aumentou a IMR, mas a adição de maior quantidade aumentou ambos os parâmetros (Tabela 9).

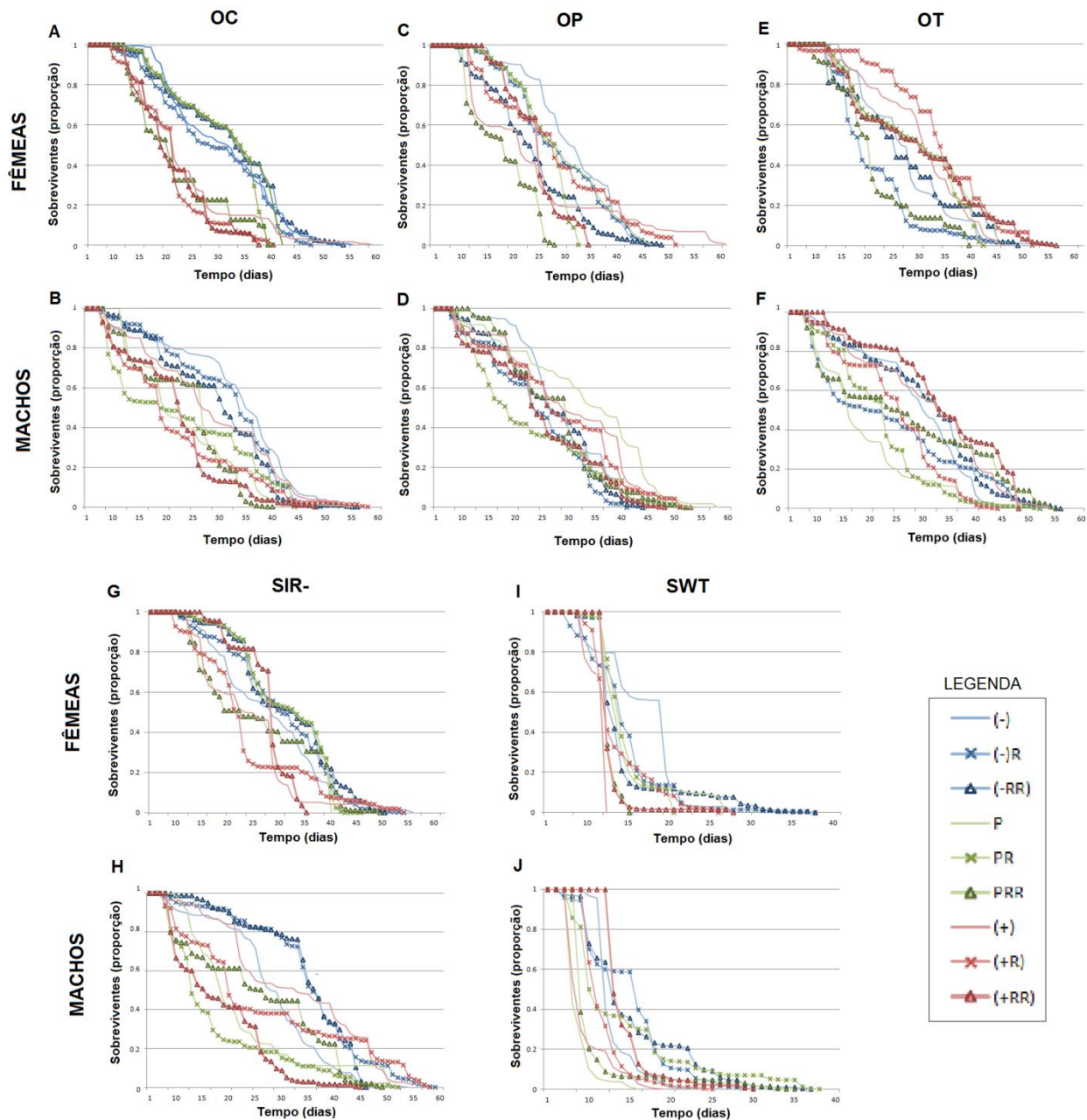


Figura 10. Efeitos da dieta e da administração de resveratrol sobre a sobrevivência demográfica de cinco linhagens de *D. melanogaster*. (A) Fêmeas OC; (B) Machos OC; (C) Fêmeas OP; (D) Machos OP; (E) Fêmeas OT; (F) Machos OT; (G) Fêmeas Swt; (H) Machos Swt; (I) Fêmeas Sir-; (J) Machos Sir-.

Fêmeas OP tiveram sua trajetória de mortalidade alterada significativamente em meio hipocalórico, mas não houve diferenças entre meio padrão e hipercalórico apesar de IMR ter variado bastante entre essas duas diluições. Nas diluições hipercalóricas, a adição de baixa quantidade de resveratrol não alterou significativamente, mas adição de maior concentração aumentou a mortalidade. Apenas na diluição padrão a adição de resveratrol alterou a trajetória, aumentando a mortalidade. Em machos OP, a alteração da

diluição não alterou a trajetória de mortalidade, apesar da inclinação da curva do meio hipocalórico ter aumentando. A adição de resveratrol em ambas as concentrações também não alterou a trajetória de mortalidade em meio padrão. Em meios hipocalóricos e hipercalóricos, ambas as concentrações de resveratrol aumentaram a mortalidade (Tabela 10).

Em fêmeas da linhagem OT, as trajetórias de mortalidade não diferiram entre os meios hipocalóricos e hipercalóricos, mas aumentou em meio padrão. A adição de resveratrol diminuiu a mortalidade no meio padrão, mas aumentou nos meios hipocalóricos e hipercalóricos. Em machos OT, não houve diferença significativa entre meios padrão e hipocalórico e hipercalórico. Em todas as diluições, a adição de resveratrol em ambas as quantidades diminuiu a inclinação da curva, diminuindo a mortalidade (Tabela 11).

Ambos os sexos da linhagem Swt tiveram taxa de mortalidade inicial maiores em relação às outras linhagens. Fêmeas da linhagem Swt tiveram a inclinação da trajetória de mortalidade aumentada no meio hipercalórico. Em meios hipercalóricos e padrão, a adição de resveratrol alterou a trajetória de mortalidade, aumentando RoA, diminuindo em meios hipercalórico. Em machos Swt, o aumento na concentração do meio aumentou significativamente a inclinação da trajetória de mortalidade. Adição de resveratrol ao meio hipocalórico aumentou RoA, que diminuiu em meio padrão e hipercalórico.

Na linhagem Sir2-, aumento calórico diminuiu a inclinação da trajetória de mortalidade em fêmeas e machos. Adição de resveratrol no meio hipocalórico diminuiu a taxa de envelhecimento em ambos os sexos. No entanto, a curva de mortalidade nos meios padrão e hipercalóricos em aumentou em fêmeas e diminuiu em machos.

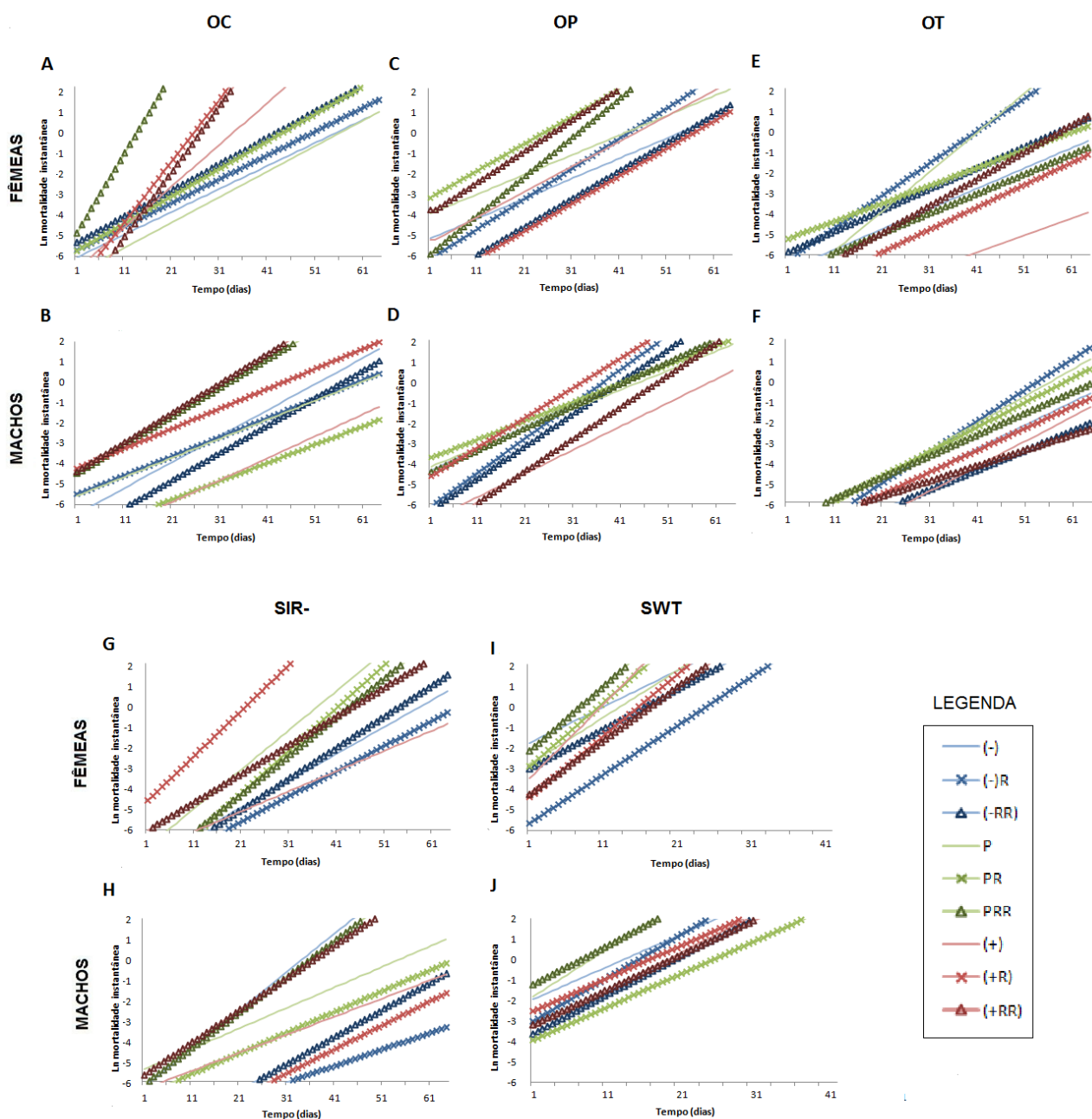


Figura 11. Trajetória de mortalidade das linhagens OC, OP, OT, Swt e Sir- de *Drosophila melanogaster* nos diferentes tratamentos. (A) Fêmeas OC; (B) Machos OC; (C) Fêmeas OP; (D) Machos OP; (E) Fêmeas OT; (F) Machos OT; (G) Fêmeas Swt; (H) Machos Swt; (I) Fêmeas Sir-; (J) Machos Sir-.

5.2.2. Teste RING

Não foi observado um padrão de desempenho de *D. melanogaster* no teste de geotaxia negativa (RING) em relação à diluição do meio e ao tratamento com resveratrol. No entanto, em geral, RD teve efeitos deletérios no desempenho no teste e adição de

resveratrol foi capaz de retardar a deterioração associada à idade na execução do teste RING, exceto em indivíduos da linhagem Sir2- (Figuras 12 e 13).

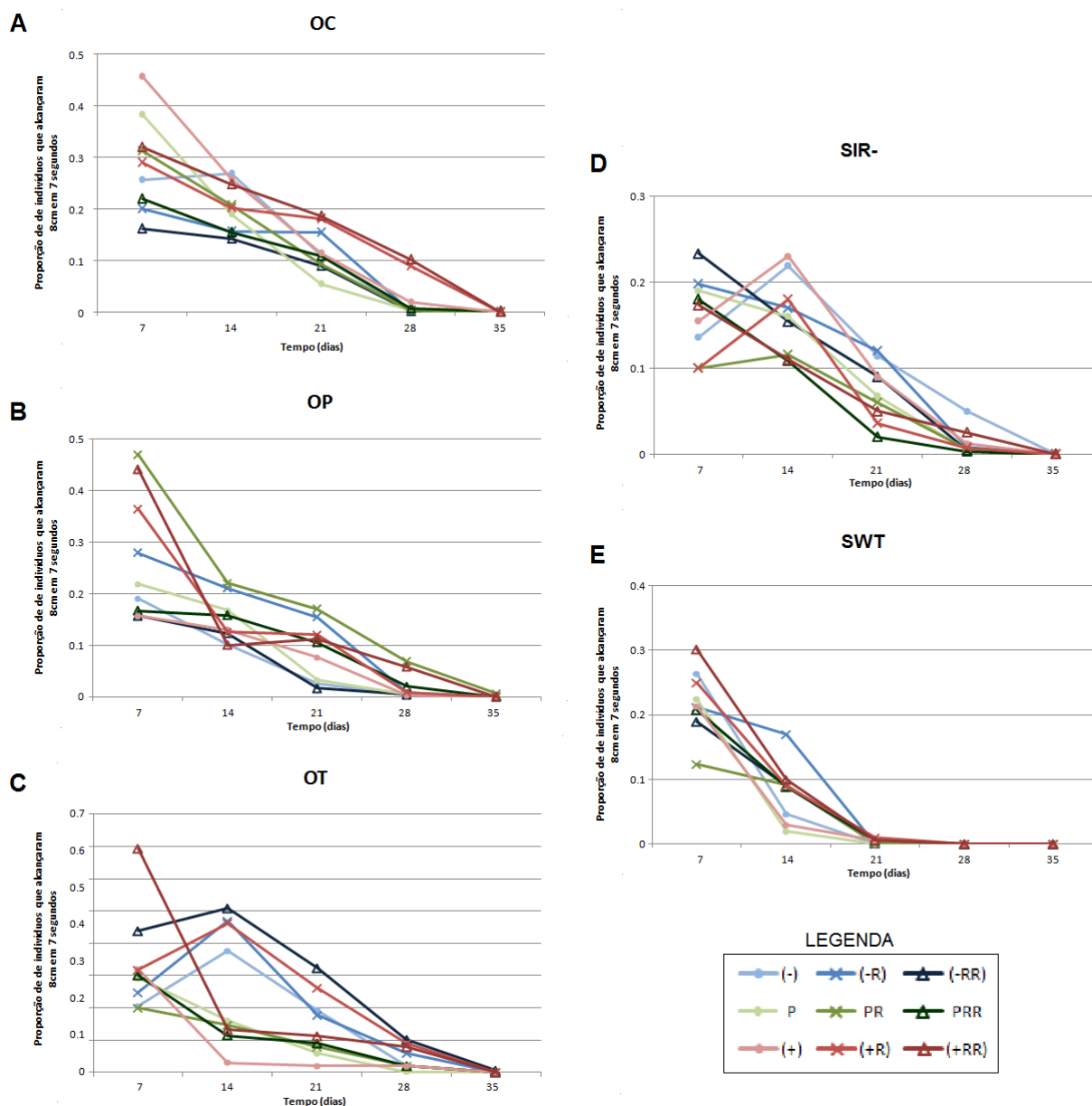


Figura 12. Desempenho no teste RING de machos das cinco linhagens de *Drosophila melanogaster* submetidas ao tratamento com resveratrol. Administração de resveratrol desacelerou a deterioração associada à idade no desempenho no teste RING na maioria dos casos nas linhagens Oregon-R OC (A), OP (B) e OT (C) e linhagens Swt (D) e Sir2- (E).

Machos das linhagens OC e OP tiveram desempenho significativamente mais fraco em meio hipocalórico (OC: - x P, $p=0,0028$; - x +, $p<0,0001$; OP: - x P, $p=0,012$; - x +, $p=0,002$), mas não houve diferença entre o desempenho em meio padrão e hipercalórico (OC: P x +, $p=0,21$; OP: P x +, $p=0,088$). Entretanto, indivíduos da linhagem OT obtiveram

melhor desempenho geral em meios hipocalórico (- x P, $p=0,0064$; - x +, $p=0,01$). Em indivíduos da linhagem OC, a adição de resveratrol ou não alterou ou apenas aumentou levemente o desempenho dos machos no teste (- x-R, $p=0,019$; - x -RR, $p<0,0001$; P x PR, $p=0,09$; P x PRR, $p=0,002$; + x +R, $p=0,54$; + x +RR, $p=0,12$).

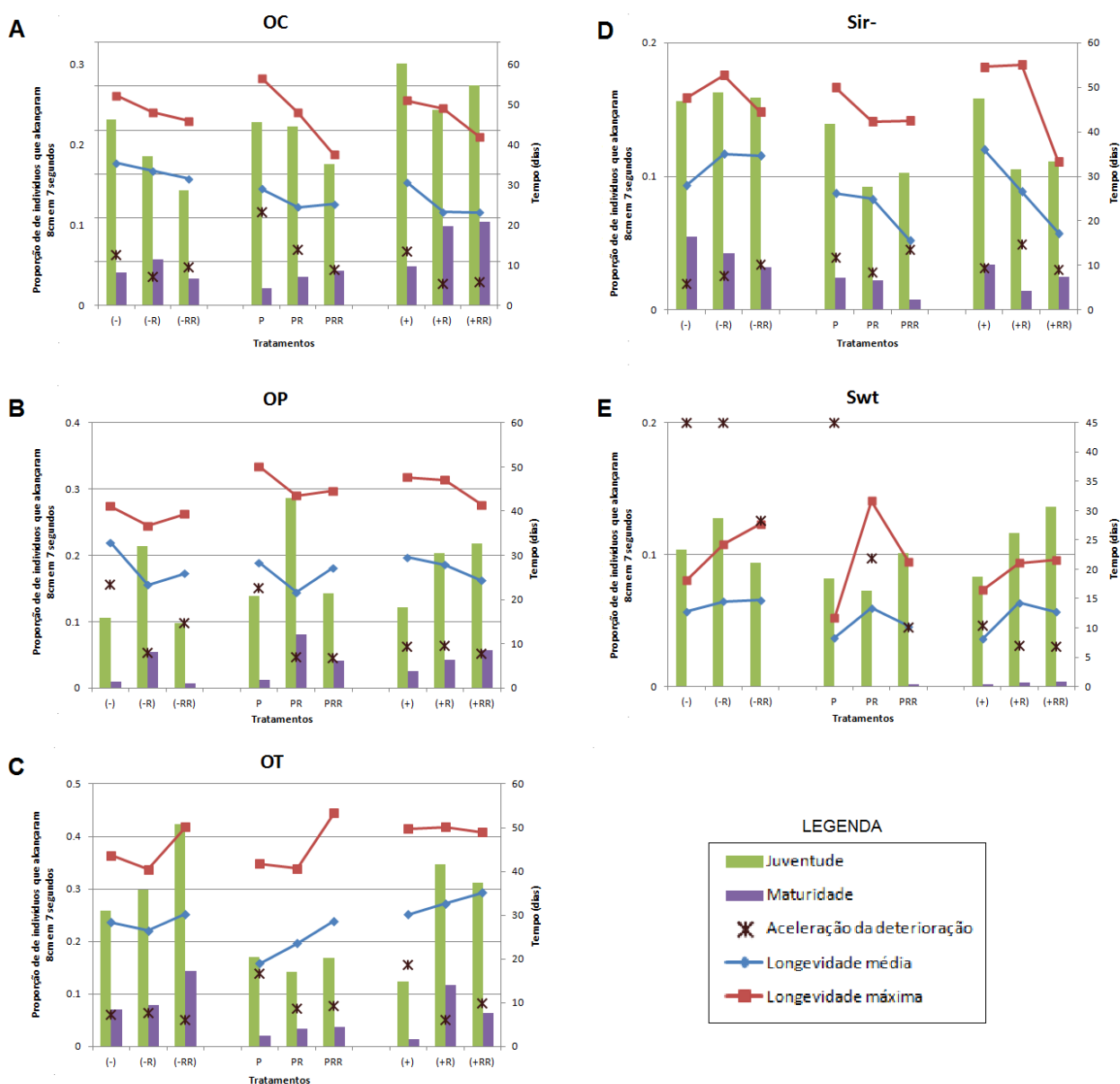


Figura 13. Deterioração da resposta neuromotora dos machos de *Drosophila melanogaster* em resposta à alteração da diluição do meio e administração de resveratrol. Efeitos de diluições totais do meio o resveratrol nas linhagens Oregon-R OC (A), OP (B) d OT (C) e nas linhagens Swt (D) e Sir2- (E) no tempo médio e máximo de vida e na aceleração média de deterioração do desempenho no teste RING entre a juventude (média do desempenho até 19 dias) e a maturidade (média do desempenho a partir de 20 dias até 35 dias de vida).

Com exceção do meio padrão, no qual a adição de resveratrol não alterou significativamente o desempenho da linhagem OT ($P \times PR$, $p=0,38$; $P \times PRR$, $p=0,09$), adição de resveratrol em todas as diluições melhorou o desempenho geral das linhagens OP e OT (OP: - x -R, $p<0,0001$; - x -RR, $p=0,0073$; $P \times PR$, $p=0,035$; $P \times PRR$, $p=0,005$; + x +R, $p=0,0023$; + x +RR, $p=0,001$; OT: - x -R, $p<0,0001$; - x -RR, $p=0,003$; + x +R, $p=0,01$; + x +RR, $p=0,0038$). Em geral, nas três linhagens, a adição de resveratrol foi capaz de retardar a deterioração associada à idade no desempenho no teste RING.

As linhagens Swt e Sir2- não sofreram muitas alterações em seu desempenho no teste RING, em comparação às linhagens Oregon-R. Não houve diferenças significativas no desempenho de as linhagens Swt e Sir- entre as diluições (Swt: - x P, $p=0,15$; - x +, $p=0,21$; Sir2-: - x P, $p=0,09$; - x +, $p=0,42$). A adição de resveratrol na maioria dos meios diminuiu a deterioração do desempenho no teste RING na linhagem Swt (- x -R, $p<0,0001$; - x -RR, $p=0,17$; $P \times PR$, $p=0,28$; $P \times PRR$, $p<0,0001$; + x +R, $p=0,41$; + x +RR, $p=0,0005$). Entretanto, na linhagem Sir2-, a adição de resveratrol manteve o desempenho inalterado ou teve efeitos deletérios (- x -R, $p=0,82$; - x -RR, $p=0,09$; $P \times PR$, $p=0,18$; $P \times PRR$, $p=0,0012$; + x +R, $p<0,0001$; + x +RR, $p=0,3$).

5.2.3. Análise citogenética dos pufes *Hsp22*

As médias e desvio padrão dos tamanhos dos pufes dos núcleos analisados estão detalhados na Tabela 14. Ao contrário do que ocorreu na linhagem OT, o tamanho do pufe *Hsp22* nas linhagens OC e OP não variou muito entre os tratamentos (Tabela 15). O pufe foi significativamente maior em meio padrão do que no hipercalórico em OC e em meio hipercalórico com resveratrol (+R) em OP. Os pufes *Hsp22* da linhagem OP foram significativamente maiores do que dos indivíduos OC, nos meios padrão e hipercalórico com resveratrol (+RR). O aumento da concentração do meio foi diretamente correlacionado com o tamanho do pufe *Hsp22* nas linhagens OT (Figura 14). Nessa

linhagem, apenas no meio hipocalórico a adição de resveratrol foi capaz de aumentar o tamanho dos pufes *Hsp22*. Os tamanhos dos pufes variaram bastante entre as linhagens OC e OT nos diversos tratamentos (Tabela 16), com significativo aumento de tamanho na linhagem OT em todos os tratamentos, exceto no meio hipocalórico. Adição de resveratrol ao meio hipercalórico não alterou significativamente tamanho dos pufes nas linhagens OC e OT.

A linhagem Swt teve o tamanho de seus pufes *Hsp22* bastante alterados com os tratamentos, em oposição à linhagem Sir2-, cujos pufes sofreram poucas variações (Figura 15). O tamanho do pufe *Hsp22* da linhagem Swt foram significativamente maiores com o aumento da concentração do meio e com adição de resveratrol em meio hipocalórico. Adição de resveratrol aos meios padrão e hipercalórico não alterou o tamanho de pufe *Hsp22* na linhagem Swt. As linhagens Swt e Sir2- variaram bastante no tamanho do pufe nos mesmos tratamentos. Os pufes dos indivíduos da linhagem Sir2- foram maiores do que os de Swt na grande maioria dos tratamentos.

Tabela 14 – Médias e desvio padrão dos tamanhos dos pufes das linhagens de *Drosophila melanogaster* de acordo com o meio de cultura.

Linhagens	-	-R	-RR	P	PR	PRR	+	+R	+RR
OC	1,10 ± 0,19	-	-	1,18 ± 0,61	1,29 ± 0,52	1,09 ± 0,59	1,61 ± 0,21	1,28 ± 0,49	1,60 ± 0,55
OP	-	-	-	1,25 ± 0,48	-	-	1,80 ± 0,43	1,74 ± 0,28	1,89 ± 0,26
OT	1,28 ± 0,15	-	1,88 ± 0,19	2,03 ± 0,36	-	-	2,68 ± 0,28	2,48 ± 0,40	2,50 ± 0,32
Swt	1,04 ± 0,14	1,73 ± 0,33	1,91 ± 0,26	1,75 ± 0,30	2,08 ± 0,57	1,60 ± 0,60	2,04 ± 0,33	2,20 ± 0,44	1,74 ± 0,38
Sir2-	2,02 ± 0,62	1,88 ± 0,40	1,93 ± 0,58	2,44 ± 0,40	2,15 ± 0,21	2,40 ± 0,42	2,19 ± 0,30	1,62 ± 0,19	2,22 ± 0,57

-, meio hipocalórico; -R, meio hipocalórico contendo 5 µM de resveratrol; -RR, meio hipocalórico contendo 50 µM de resveratrol; P, meio padrão (controle); PR, meio padrão contendo 5 µM de resveratrol; PRR, meio padrão contendo 50 µM de resveratrol; +, meio hipercalórico; +R, meio hipercalórico contendo 5 µM de resveratrol; +RR, meio hipercalórico contendo 50 µM de resveratrol.

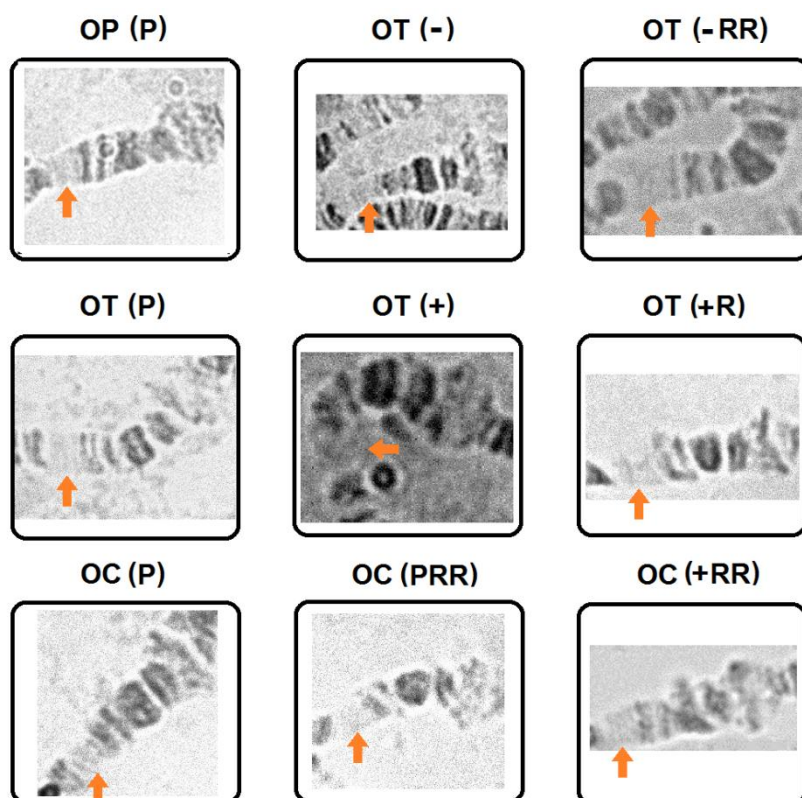


Figura 14 – Pufes do gene *Hsp22* na seção na seção 67B2 do braço cromossômico 3L linhagem Oregon-R de *D. melanogaster*. As linhagens de *D. melanogaster* e o tratamento correspondente a cada pufe estão especificados acima da imagem. A localização do gene *Hsp22* está sinalizado pela seta laranja.

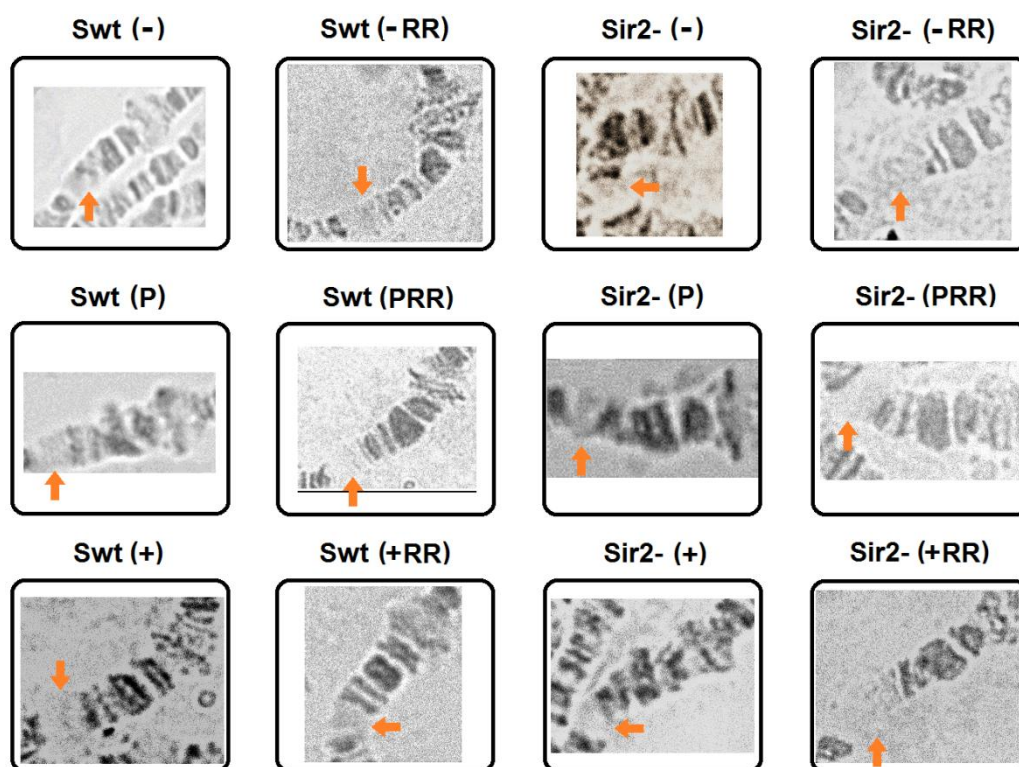


Figura 15– Pufes do gene *Hsp22* na seção na seção 67B2 do braço cromossômico 3L das linhagens Swt e Sir2- de *D. melanogaster*. As linhagens de *D. melanogaster* e o tratamento correspondente a cada pufe estão especificados acima da imagem. A localização do gene *Hsp22* está sinalizado pela seta laranja.

Tabela 15 – Significância das diferenças das médias dos tamanhos dos pufes *Hsp22* da mesma linhagem de *Drosophila melanogaster* em relação à diluição e concentração de resveratrol.

Linagens	P x -	P x +	- x -R	- x -RR	P x PR	P x PRR	+ x +R	+ x +RR
OC	0,21	0,015	-	-	0,09	0,17	0,54	0,067
OP	-	0,31	-	-	-	-	0,006	0,24
OT	<0,001	0,009	-	0,035	-	-	0,076	0,29
Swt	0,002	0,026	<0,001	<0,001	0,32	0,069	0,46	0,64
Sir2-	0,09	0,28	0,79	0,40	0,62	0,41	0,002	0,09

-, meio hipocalórico; -R, meio hipocalórico contendo 5 μ M de resveratrol; -RR, meio hipocalórico contendo 50 μ M de resveratrol; P, meio padrão (controle); PR, meio padrão contendo 5 μ M de resveratrol; PRR, meio padrão contendo 50 μ M de resveratrol; +, meio hipercalórico; +R, meio hipercalórico contendo 5 μ M de resveratrol; +RR, meio hipercalórico contendo 50 μ M de resveratrol.

Tabela 16 – Significância das diferenças das médias de tamanho dos pufes *Hsp22* entre as diferentes linhagens de *Drosophila melanogaster* no mesmo tratamento.

Linagens	-	-R	-RR	P	PR	PRR	+	+R	+RR
OC x OP	-	-	-	0,027	-	-	0,34	0,52	0,02
OC x OT	0,22	-	-	<0,001	-	-	<0,001	0,015	0,006
Swt x Sir2-	<0,001	0,078	0,35	<0,001	<0,001	0,007	0,035	0,17	0,01

-, meio hipocalórico; -R, meio hipocalórico contendo 5 μ M de resveratrol; -RR, meio hipocalórico contendo 50 μ M de resveratrol; P, meio padrão (controle); PR, meio padrão contendo 5 μ M de resveratrol; PRR, meio padrão contendo 50 μ M de resveratrol; +, meio hipercalórico; +R, meio hipercalórico contendo 5 μ M de resveratrol; +RR, meio hipercalórico contendo 50 μ M de resveratrol.

6. DISCUSSÃO

6.1. Parte I – Experimentação com restrição dietética em *D. melanogaster* utilizando lipídios como variável nutricional

Nem o conteúdo energético nem a proporção entre proteínas e carboidratos foram capazes de prever totalmente a longevidade ou a trajetória de mortalidade de *D. melanogaster*. Os efeitos ocasionados por RD utilizando lipídios (RDL) diferiram bastante entre fêmeas e machos. A alteração na diluição mantendo a proporção entre os ingredientes constantes (meio α) não pareceu ter um efeito consistente em fêmeas, com ápices de longevidade nas diluições extremas (0,25 e 2). Diminuição acentuada na longevidade e fecundidade em meios com adição de lipídios (meios β e γ) indica a possibilidade dos efeitos desse nutriente serem deletérios em fêmeas, podendo indicar algum nível de toxicidade, como sugerido por Piper e Partridge (2007). Em machos, as maiores longevidades foram alcançadas nas concentrações intermediárias (1,0; 1,5 e 2,0) e a adição/proporção leve à moderada de lipídios ocasionou aumento da longevidade. Na hipótese de lipídios não terem influência metabólica nesses insetos, a dieta fixa de proteína e carboidratos (meio γ) manteria os resultados de longevidade e fecundidade constantes, independentemente da presença de lipídios, o que não ocorreu. Esses resultados sugerem a possibilidade de lipídios interagirem com vias metabólicas relacionadas à longevidade em *D. melanogaster*.

O aumento da sobrevivência pode ser alcançado através da diminuição da vulnerabilidade à morte em curto prazo (diminuição da taxa de mortalidade basal ou inicial, IMR) ou por meio do retardo de acúmulo de danos irreversíveis (diminuição da taxa de envelhecimento, RoA), ou ainda através de uma combinação entre esses dois mecanismos (Mair *et al.*, 2003). Quase que a totalidade dos estudos com RD que utilizam alteração da proporção entre carboidrato e proteína como variável (RDP:C) ou restrição

calórica (RC) indica que esses estendem a longevidade de *D. melanogaster* através da redução da mortalidade inicial (Pletcher *et al.*, 2002; Mair *et al.*, 2003; Mair *et al.*, 2005; Partridge *et al.*, 2005). No entanto, em contraste com esses estudos, os efeitos da utilização de lipídios sobre a sobrevivência e a mortalidade além de modificar o IMR, também alterou RoA em ambos os sexos.

A importância de definir qual parâmetro está sendo alterado pela intervenção é devido ao entendimento geral de apenas a extensão da longevidade através da diminuição de RoA é evidência de intervenção efetiva no processo de senescência propriamente (Merry, 2005). A ideia é que uma intervenção que diminua IMR atue reduzindo o risco de morte através da melhora da habilidade em resistir a danos, representando apenas uma melhora da saúde geral do organismo (Pijl, 2012). Neste caso, uma vez retirada a intervenção, a trajetória de mortalidade voltaria a ser igual as trajetórias das populações controle, tendo efeito reversível e imediato, como ocorre em ensaios com RD tradicional em *Drosophila* e camundongos (Mair *et al.*, 2003, Merry, 2005). No entanto, caso a intervenção esteja agindo no retardo de RoA, através da diminuição do acúmulo de danos, a trajetória de mortalidade mudaria irreversivelmente e os efeitos seriam duradouros, como acontece em ensaio de RD com ratos (Merry, 2005) e alteração de temperatura do ambiente em *Drosophila* (Mair *et al.*, 2003).

Existem algumas falhas nessa interpretação. Para que seja verdadeira, é necessário presumir que o envelhecimento é resultado de um processo de uso/desgaste (“wear and tear”) e de acumulação de danos, o que não está comprovado (Mitteldorf, 2010). Se acúmulo de danos não for o principal fator atuando no processo da senescência, intervenções nela podem muito bem ter efeitos imediatos e reversíveis. Masoro (2005, 2006) argumenta ainda que o fato do aumento exponencial de mortalidade ser retardado por um período de tempo já é prova suficiente de que a taxa de envelhecimento foi retardada. Esse autor propõe que a taxa de envelhecimento pode de

fato ser alterada tanto pelo retardo do aumento exponencial da mortalidade associado à idade durante parte da vida adulta, quanto pela redução da taxa de mortalidade idade-específica ao longo da vida.

Ainda não foi estabelecido um consenso em relação à medida que melhor representa o curso da senescência. Alguns trabalhos questionam a utilização da longevidade, principalmente a longevidade máxima, como parâmetro de análise confiável do envelhecimento demográfico. A longevidade média não fornece nenhuma informação sobre taxas nem padrões específicos de determinada idade que estão contribuindo para as diferenças de envelhecimento entre as populações. A longevidade máxima é uma estatística de valor extremo, com amostra pequena, difícil de ser mensurada com precisão (Bronikowski e Flatt, 2010). Reanálise utilizando parâmetros de mortalidade de trabalhos publicados baseados em curvas de sobrevivência mostraram conclusões distintas da análise original, assim como no presente trabalho (Magalhães *et al.*, 2005).

Mair *et al.* (2003), Merry (2005) e Partridge *et al.* (2005) propõem que a taxa de mortalidade idade específica (*hazard*) é uma medida mais precisa de senescência, pois diferentemente da análise de sobrevivência, a primeira não é cumulativa, permitindo comparações entre a vulnerabilidade à morte em cada idade. No entanto, parâmetros de longevidade ainda são os mais utilizados em trabalhos com RD. Neste trabalho, resultados muitas vezes não se mostraram consistentes dependendo do parâmetro utilizado, com ápices de longevidade muitas vezes não coincidindo com menor mortalidade. Essa inconsistência entre os parâmetros torna difícil a inferência de conclusões confiáveis, principalmente quando as medidas são conflitantes. Talvez cada parâmetro seja capaz de mensurar um aspecto diferente, que ainda não foi isolado do envelhecimento demográfico. Estudos futuros mais aprofundados, mas que ao mesmo tempo consigam integrar cada um dos fatores conhecidos por intervir na senescência,

talvez possam elucidar a informação que cada parâmetro fornece sobre o processo de envelhecimento.

Qualquer que seja o parâmetro analisado, a resposta inesperada para *Drosophila* no presente trabalho pode ser consequência de vários fatores. A utilização de um novo componente dietético para avaliar seus efeitos na longevidade gera uma gama de novas possibilidades que a torna de complexa análise. Novas pesquisas nutrigenômicas evidenciam a profundidade da atuação de nutrientes na regulação gênica (Costa *et al.*, 2006; Zeisel, 2007; Lomba *et al.*, 2010). Além de nutrientes específicos, moléculas inteiras de origem alimentar podem modular a regulação gênica em organismos heterotróficos, como transferência interespecie de reguladores pós-transcricionais ativos, e.g. miRNAs (Zhand *et al.*, 2011).

O mecanismo pelo qual lipídios atuam na longevidade pode ser diferente do utilizado por RC ou RDP:C. De fato, há outras intervenções capazes de alterar RoA em *D. melanogaster*, como a diminuição da temperatura (Mair *et al.*, 2003) e algumas mutações (Clancy *et al.*, 2001), que servem como evidência de suporte para essa hipótese. A RDL pode ter alterado a longevidade de *D. melanogaster* através de alterações diretas na expressão gênica de genes envolvidos nas vias sensoras de nutriente e energia, ou no aumento da peroxidação lipídica e outros agentes oxidativos, com possível indução de resposta de resistência a estresse.

Lipídios interagem com vias metabólicas diferentes das influenciadas por glicose e aminoácidos (Canavoso *et al.*, 2001). Lipídios dietéticos têm efeitos profundos na expressão gênica (Jump, 1999; Kuvichkin, 2002; Raposo, 2010), que refletem uma resposta adaptativa à quantidade e qualidade de gordura ingerida. Ácidos graxos oriundos da dieta podem interagir diretamente com receptores de proteínas nucleares, que se ligam ao DNA modulando a transcrição de genes regulatórios (Benatti *et al.*, 2004). A atuação de lipídios dietéticos na regulação epigenética é de grande importância

na programação epigenética fetal, que contribuirá para a susceptibilidade a diversas doenças metabólicas na infância e idade adulta (Heerwagen *et al.*, 2010). Uma grande quantidade de genes é regulada por ácidos graxos alimentares, incluindo genes envolvidos no transporte, desnaturação e oxidação de ácidos graxos (Clarke e Jump, 1994; Meng *et al.*, 2005)..

A atuação de lipídios na regulação gênica de *D. melanogaster* também pode se dar de forma mais indireta. Assim como em humanos, o aparelho digestivo de insetos possui um microbioma próprio, que interfere na digestão e na regulação gênica. Modificações na dieta podem causar alterações na microbiota intestinal com sérias consequências metabólicas para o hospedeiro (Turnbaugh, 2009; Serino *et al.*, 2011). O microbioma intestinal de *D. melanogaster* modula o fator de sinalização insulina/IGF-1 (IIS), regulando a taxa de crescimento, tamanho corporal e metabolismo energético do hospedeiro (Shin *et al.*, 2011). A alteração na dieta, com adição de lipídios, pode ter alterado a microbiota intestinal de *Drosophila* levando ao retardo de crescimento e desenvolvimento, resposta fisiológica que está associada à maior longevidade.

Apesar da existência de alguma pesquisas pontuais sobre lipídios na dieta de *Drosophila*, principalmente envolvendo o metabolismo do colesterol (Shreve *et al.*, 2007; Niwa e Niwa, 2011), pouco se sabe sobre outras propriedades dos ácidos graxos dietéticos neste organismo. Como os nutrientes do meio estão diluídos numa matriz agarosa, nem todos podem estar igualmente disponíveis, de forma que a proporção da mistura do meio não é necessariamente a mesma que a mosca está de fato consumindo. Além disso, mesmo que o consumo desse nutriente específico seja determinado, pouco se sabe sobre sua absorção e biodisponibilidade em insetos (Arrese *et al.*, 2001).

A geometria nutricional pode ser uma ferramenta interessante para organizar e integrar dados nutricionais, podendo inferir efeitos provenientes de nutrientes específicos. Essa técnica de análise possibilita a criação de um espaço nutricional multidimensional,

em que cada dimensão corresponde a um nutriente, através do qual podem ser observados os efeitos específicos de cada um e suas proporções, numa infinidade de respostas, podendo ser avaliado os alvos nutricionais, de crescimento, de ingestão e o optima global (Simpson e Raubenheimer, 1995). Utilizando essa técnica, Lee *et al.* (2008) obtiveram maximização da superfície de resposta para tempo de vida e fecundidade de *D. melanogaster* em diferentes proporções entre proteína e carboidrato, com ápice de longevidade numa proporção 1:16, que diminuiu gradualmente com o aumento da concentração de proteínas. Em conjunto com outros estudos (Mair *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2005), esses resultados indicaram que a proporção entre proteínas e carboidratos é o fator crucial no efeito na longevidade em *D. melanogaster*.

Assim como no presente estudo, em Lee *et al.* (2008) a longevidade em ambos os sexos não se manteve ao curso da linha isocalórica, indicando que as diferenças dessas respostas não foram devido à restrição energética (RC). No entanto, no presente trabalho, a adição de lipídios foi capaz de alterar significativamente tanto a sobrevivência quanto a mortalidade de *D. melanogaster*, mesmo com a proporção entre proteínas e carboidratos mantidos constantes (1:8). Esse resultado demonstra que a complexidade da resposta à restrição dietética em *D. melanogaster* vai além da proporção entre proteína e carboidrato ou do conteúdo energético.

A dieta natural de *D. melanogaster* consiste fundamentalmente de micro-organismos fermentadores e sacarídeos de frutas em decomposição (Good e Tatar, 2001). Esse tipo de dieta é essencialmente baixa em ácidos graxos, o que pode indicar que a utilização de lipídios em quantidades maiores que essas seja levemente tóxica. A toxicidade da maior concentração de lipídios dietéticos em *D. melanogaster* explicaria diretamente a menor fecundidade de fêmeas e pior desempenho de machos no teste RING nesses meios (Figuras 5 e 7), além da diminuição da longevidade em fêmeas nos meios em que a única variável foi lipídios (meio γ). Paradoxalmente, essa toxicidade

também pode esclarecer o aumento de longevidade em machos alimentados em concentrações baixas a médias de lipídios, quando comparada com meios sem lipídios (Figura 7), além das inconsistências nos meios em que as outras variáveis estão atuando (meios α).

Baixas doses de um agente tóxico ou causador de estresse podem ter efeitos benéficos sobre um organismo, num fenômeno conhecido como hormese, provavelmente por induzir uma compensação extra a estresse em resposta a um distúrbio na homeostase (Calabrese *et al.*, 2011). É conhecida uma série de agentes com efeitos horméticos em *Drosophila*, como irradiação, calor, frio e hipergravidade (revisão em Le Bourg *et al.*, 2011). Considera-se inclusive que a própria restrição calórica ou dietética possa aumentar a longevidade através de possíveis efeitos horméticos (Gems e Partridge, 2008; Rattan, 2008; Pijl, 2012). A disponibilidade limitada de energia ou nutrientes específicos representa um estresse ambiental importante para o organismo, que pode incitar respostas metabólicas de proteção a fim de reestabelecer o balanço homeostático (Calabrese e Baldwin, 2003).

Os resultados do presente trabalho sugerem que a presença de lipídio pode também ter efeito hormético em *D. melanogaster*. Há evidências indiretas que fornecem apoio para essa suposição. Em mamíferos, gorduras dietéticas induzem a produção de sais biliares, que além das funções de emulsificação, transporte de lipídios e na homeostase do colesterol, têm papel essencial na sinalização de moléculas reguladoras da homeostase energética e na detoxificação de xenobióticos (Thomas *et al.*, 2008; Lefebvre *et al.*, 2009). Por serem detergentes e surfactantes, os ácidos biliares são levemente tóxicos e atuam como sinalizadores, induzindo resposta a estresse, resultando na melhora da saúde geral do organismo e extensão da longevidade (Goldberg *et al.*, 2010). Insetos não possuem sais biliares propriamente ditos, mas células homólogas ao hepatócitos de mamíferos, os oenócitos, expressam ortólogos de uma série de genes

envolvidos na síntese e metabolismos de sais biliares de mamíferos, como *17 β -hsd*, *hfn4*, *lpl* e família de gene *cy450* (Chiang, 2002), o que pode indicar função similar.

Produtos finais da peroxidação de lipídios também são capazes de ativar vias de sinalização de proteção a estresses (Uchida *et al.*, 1999). Dieta rica em gordura leva à redução na expressão de transportador de glicose nos tecidos, levando ao aumento no nível de glicose circulante, induzindo ao aumento de peroxidação lipídica (Udilova *et al.*, 2003). Diferentes tipos de ácidos graxos dietéticos consumidos servirão como diferentes substratos para a via metabólica ciclooxygenase, com maior ou menor atividade inflamatória e consequente maior ou menor susceptibilidade à peroxidação (Muntané *et al.*, 2005). Chen *et al.* (2006) sugerem que esse produtos podem ter efeito hormético através de indução de resposta adaptativa a estresse. De fato, há evidências de que a peroxidação lipídica represente um mecanismo de proteção ao câncer de mama, através de sua interação com mediadores de apoptose, que elimina células cancerígenas (Stoll *et al.*, 2002).

Partindo do princípio de que tanto a RD quanto a presença de lipídios dietéticos atuam como agentes causadores de estresse, que até determinada intensidade pode ter efeito hormético em *D. melanogaster*, a junção desses dois agentes cria uma sobrecarga de estresse que, conseqüentemente, pode gerar efeitos deletérios. Essa hipótese explicaria a menor longevidade de machos no meio α 0,25, no qual há uma intensa restrição dietética aliada à presença de lipídios, bem como a maior longevidade no meio α 1, 1,5 e 2, nos quais a disponibilidade de nutrientes não oferece estresse adicional ao produzido por lipídios. A presença de lipídios em meio energeticamente adequado pode criar a condição de estresse ideal para que a longevidade seja ampliada nesses meios. Essa ideia está bem representada nas superfícies de respostas das Figuras 8E e 9B. Pode ser notado que a maior longevidade em machos é observada tanto em meio com RD e pouco ou nenhum lipídio, quanto em meio hipercalórico com maior concentração de

lipídios. Esse resultado é surpreendente e fornece perspectivas animadoras, pois levanta evidências de que a adição de lipídios atuou de maneira análoga à de RD, sendo capaz de reverter os efeitos deletérios de dieta ricas em calorias oriundas de açúcar e aminoácidos.

De forma geral, a RDL conferiu efeitos diferentes na longevidade e mortalidade de fêmeas e machos. Diferenças entre tempo de vida entre fêmeas e machos são observadas em várias espécies (Tower, 2006), possivelmente como consequência de fatores como herança assimétrica de cromossomos sexuais, herança materna do genoma mitocondrial e produtos gênicos (Tower e Arbeitman, 2009) e pressões seletivas sexo-específicas (Ellegren e Parsch, 2007). As diferenças na arquitetura genética da longevidade entre os sexos de uma mesma espécie (Fox *et al.*, 2006) implica consequentemente que intervenções ambientais e genéticas conferem efeitos diferentes em fêmeas e machos. De fato, em *D. melanogaster*, repressão da via insulina/IGF-1 e RD confere maior aumento na longevidade de fêmeas do que de machos (Magwere *et al.*, 2004), enquanto estresse moderado tende a aumentar mais expressivamente o tempo de vida em machos do que em fêmeas (Sørensen *et al.*, 2007). Consistente com esses trabalhos, o fato da utilização de lipídios aumentar a longevidade em machos, mas não em fêmeas, fornece suporte à hipótese de que lipídios sejam levemente tóxicos, atuando como fator de estresse, que em quantidades leves ou moderadas confere efeito hormético. Além disso, essa evidência também sugere que o mecanismo de ação de lipídios no metabolismo e na longevidade é diferente do utilizado por RC e RDP:C.

A diferença na resposta entre machos e fêmeas também pode ter outra explicação. Devido a seu maior custo de reprodução, a necessidade energética/nutricional de fêmeas é maior do que de machos (Magwere *et al.*, 2004). Assim, meios que são nutricionalmente adequados para machos, podem se apresentar hipocalóricos para fêmeas. Observando a Figura 5B e 5C, nota-se que nos meios isocalóricos (meio β) e meios com composição de

proteína e carboidrato fixo (meio γ), a adição de lipídios diminuiu a longevidade. Nota-se também que, nas Figuras 8B, 8F, 9A e 9B, a maximização da longevidade e de MRDT ocorre em meio substancialmente mais calóricos em fêmeas do que em machos. Esses resultados podem indicar que o meio fixo de proteínas e carboidratos não seja suficientemente energético para cobrir todas as necessidades nutricionais/calóricas das fêmeas, criando de antemão uma situação de estresse similar à RD. Essa condição prévia de estresse em conjunto com o estresse oferecido pela presença de lipídios pode ter levado à efeitos deletérios. Assim, a adição de lipídios aumentou o nível de estresse já proporcionado pela RC involuntária. Na diluição hipercalórica do meio α , a longevidade não foi diferente do meio hipocalórico (Figura 5A). Nesse meio, a disponibilidade de nutrientes não impôs uma circunstância de estresse prévia, sendo a presença de lipídios o único agente atuante, ativando resposta a estresse com efeitos benéficos na longevidade. Essa conclusão também leva à suposição de que o estresse proporcionado por lipídios induz vias de proteção a estresses capazes de reverter os efeitos da falta disponibilidade energética e nutricional.

A resposta da longevidade à RD é geralmente interpretada como uma forma de ajuste evolutivamente conservado na alocação de energia para manter o equilíbrio metabólico entre o soma e a linhagem germinativa, a fim de aumentar o desempenho adaptativo ou *fitness* (Piper e Partridge, 2007). A ideia é de que na escassez de calorias/nutrientes seja mais vantajoso investir a energia disponível na manutenção do soma para sobreviver à fome. E então estar preparado para se reproduzir em épocas menos inóspitas, aumentando as chances de sobrevivência da progênie por suprir suas necessidades energéticas (Merry e Holehan, 1979; Longo e Finch, 2003; Partridge *et al.*, 2005).

Diante dessa interpretação, estabeleceu-se um modelo que determina se a restrição dietética é realmente o principal fator atuante no aumento da longevidade de

Drosophila através da existência de uma correlação inversa entre fecundidade e longevidade em decorrência da alteração dietética (Bass *et al.*, 2007a; Piper e Partridge, 2007). Assim, a restrição dietética ocasionaria uma realocação de energia para manutenção somática (estendendo o tempo de vida) em detrimento da reprodução (diminuindo fecundidade). Se em determinado *status* alimentar, longevidade e a reprodução decaíam, esse não seria um caso de RD, mas de desnutrição. Caso o índice de reprodução não aumente em face de maior concentração alimentar, também não estaríamos diante de um caso experimental de RD, mas provavelmente de toxicidade (Piper e Partridge, 2007).

No entanto, se este fosse sempre o caso, o aumento da longevidade decorrente de RD e a alta fecundidade ocasionada por alimentação *ad libitum* seriam mutuamente exclusivas, o que nem sempre acontece. É possível manter a extensão da longevidade em *D. melanogaster* com RDP:C e ainda assim restaurar a fecundidade original pela reintrodução de apenas um aminoácido, a metionina (Grandison *et al.*, 2009b). Outra evidência que se opõe à necessidade obrigatória dessa correlação é o fato da ablação de linhagens germinativas dessas moscas não estenderem a longevidade (Barnes *et al.*, 2006). No presente trabalho, não foi observada uma correlação negativa entre longevidade e fecundidade em nenhum meio testado. No entanto, a presença de certos padrões fornece substrato para novas interpretações. A quantidade de proteínas diminuiu com a diluição dos meios α e com o aumento da proporção de lipídios nos meios β isocalóricos. Nesses dois tipos de meio, a diminuição do conteúdo proteico, independentemente de conteúdo energético, diminuiu a fecundidade (Figuras 5A e 5B). Contudo, os resultados nos meios com quantidade de proteína constante (meio γ), ao mesmo tempo que apoiam os resultados anteriores, introduz uma nova variável. No meio γ , a adição de lipídio reduz significativamente a fecundidade (meios 0g/L e 3g/L), mas esta se mantém estável de maneira relativamente independente da quantidade lipídios

(meios 3g/L, 15g/L e 30g/L), demonstrando que, até certo limite, o lipídio é um fator qualitativo e não quantitativo. Os resultados indicam que a alocação de energia não é o fator exclusivo que modifica a longevidade em detrimento da fecundidade e que a quantidade de proteína é possivelmente o fator limitante da ovoposição, além de sugerir a existência de certa toxicidade do meio, ocasionada pela presença de lipídios.

Existem diversas evidências que indicam que RD, além de estender a longevidade, retarda o aparecimento dos primeiros sinais de senescência funcional de forma geral (Ingram *et al.*, 1987; Masoro, 2000; Barger *et al.*, 2003). O progressivo declínio funcional (senescência funcional) é uma das características principais do processo de envelhecimento. O declínio locomotor associado à idade reflete as deficiências funcionais progressivas do sistema nervoso e/ou muscular. Neste trabalho, o desempenho das moscas no teste RING teve deterioração associada com a idade, como previsto (Gargano *et al.*, 2005; Le Bourg *et al.*, 2001). No entanto, a restrição dietética não foi capaz de retardar o declínio neuromotor associado à idade de *D. melanogaster*. Além disso, o aumento na longevidade não levou a um melhor desempenho no teste RING. Em contraste, em alguns casos machos que atingiram maior longevidade foram os mesmos que obtiveram pior desempenho no teste de geotaxia negativa, tanto na juventude quanto em idades mais avançadas (e.g., meio padrão). No entanto, machos que tiveram longevidade mediana tiveram melhor desempenho no teste RING (e.g., meio 0g/L). No meio 45g/L, machos alcançaram menor longevidade média, mas tiveram um declínio mais suave de sua função neuromotora.

A interpretação mais simples desses resultados é de que a RD utilizando lipídios não necessariamente modifica longevidade pelos mesmos mecanismos pelo qual atua na deterioração funcional. Mesmo que atue pelos mesmos mecanismos, os efeitos não repercutem de maneira similar em todas as feições do envelhecimento em *Drosophila*. Apesar de haver intervenções que incrementam tanto a longevidade quanto outros

parâmetros de senescência, como a diminuição da temperatura ambiente (Grotewiel *et al.*, 2005), mutações *chico* (Gargano *et al.*, 2005), bem como outras capazes de aumentar a longevidade, nem sempre retardarão o declínio funcional, e vice-versa. Em acordo com essa hipótese, Bross *et al.* (2005) propõem que longevidade e senescência funcional são influenciadas por ambos, mecanismos comuns e distintos. Esses resultados estão em acordo com Bhandari *et al.* (2007), no qual RD, apesar de ter aumentado a longevidade, não alterou o declínio locomotor (em ensaio RING) e olfatório. Outros estudos já haviam proposto que os efeitos de RD na senescência funcional podem ser neutros ou até adversos, como o de Burger *et al.* (2006), no qual RD diminuiu a resistência à fome, ao frio e ao estresse oxidativo em moscas em idades avançadas.

Piper e Partridge (2007) propõem que para garantir que a RD esteja atuando, deve-se descartar a possibilidade de atuação de outros fatores, como desnutrição, desidratação e toxicidade. Contudo, por mais coerente que seja essa proposta, esses autores ignoram que esses mesmos fatores podem, de fato, ser o mecanismo pelo qual RD está atuando. Os resultados do presente trabalho indicam que agentes tóxicos ou causadores de estresse podem aumentar a longevidade através de seus efeitos horméticos, quando administrados em baixas doses. Piper e Partridge (2007) sugerem que além da longevidade, outros indicadores biológicos da qualidade nutricional sejam avaliados, como ensaios de ovoposição e comportamentais (e.g. geotaxia negativa), para que seja descartada a hipótese de toxicidade do meio. Através da utilização dessa sugestão, os resultados de fecundidade e teste RING no presente trabalho propõem exatamente o contrário, ou seja, a validação da toxicidade de RDL e seu efeito hormético sobre o organismo como mecanismo pelo qual a longevidade é estendida.

Os resultados na longevidade, mortalidade, fecundidade e geotaxia negativa obtidos neste trabalho apontam para a existência de um mecanismo de atuação utilizado por lipídios dietéticos diferente do empregado por restrição calórica ou restrição protéica,

além da possibilidade de lipídios oferecerem certa toxicidade com efeitos horméticos nesse organismo. Recursos energéticos e nutrientes específicos podem atuar de maneira a ter efeito/consequências semelhantes, ocasionados entretanto, por mecanismos distintos, que possivelmente evoluíram por pressões seletivas diferentes. A discriminação entre conteúdo energético e nutrientes específicos é de suma importância para elucidar os agentes e seus respectivos mecanismos de atuação na senescência demográfica e funcional (Ellers, 2011). O emprego de novas técnicas de nutrigenômica, geometria nutricional e marcação de isótopos pode auxiliar a desvencilhar a contribuição de cada fator na resposta de extensão da longevidade. O isolamento dos efeitos de cada componente da dieta e de outras intervenções capazes de proporcionar a desaceleração da senescência talvez seja crucial para a elucidação dos mecanismos atuantes no processo de envelhecimento. A perspectiva é de que no futuro esses agentes possam ser utilizados em conjunto, ajustados individualmente a cada genótipo e estágio de desenvolvimento, para melhorar a quantidade e qualidade de vida em humanos.

6.2. Parte II - Efeitos da interação entre resveratrol e restrição dietética na formação do pufe *Hsp22* e seus efeitos sobre o envelhecimento em diferentes linhagens de *Drosophila melanogaster*

No presente trabalho, a diluição do meio que maximizou a longevidade variou de maneira dependente do sexo e genótipo. Mutações de único gene capazes de alterar a longevidade em alguns organismos indicam a importância do genótipo na regulação do envelhecimento e patologias relacionadas (Friedman e Johnson, 1988; Clancy *et al.*, 2001; Kappeler *et al.*, 2008). As diferenças de longevidade e deterioração neuromotora em resposta à diluição do meio e administração de resveratrol entre as linhagens testadas nesse trabalho corroboram a ideia de que a resposta a intervenções ambientais depende do contexto genotípico, como proposto por Grandison *et al.* (2009a).

As linhagens Oregon-R OP e OT foram selecionadas para extremos de velocidade de desenvolvimento por mais de 1000 gerações (Loreto e Oliveira, 1988a). A análise de cinco sistemas enzimáticos nessas linhagens demonstrou divergência alélica em enzimas relacionadas com redução de NAD⁺ e NADP⁺ (Loreto e Oliveira, 1988a). Na linhagem OT está fixado um alelo com maior atividade enzimática do gene codificante de isocitrato desidrogenase dependente de NADP (IDH^F- *fast*, Da Cunha e Oliveira, 1996). Essa enzima está presente na mitocôndria e sua maior atividade na redução de NADP⁺ em NADPH, garante o substrato para processos que protegem a mitocôndria de danos oxidativos (Pastore *et al.*, 2003). Uma maior quantidade de NADPH disponível na mitocôndria otimiza o funcionamento da enzima glutathione redutase (GRS), que converte glutathione de sua forma oxidada (GSSG) em sua forma reduzida ativa (GSH). No entanto, para que a IDH/NADP⁺ seja ativada e consiga catalisar a redução de NADP⁺ em NADPH, ela precisa antes ser desacetilada. Em mamíferos, SIRT3 parece ser encarregada dessa tarefa, que assim como SIRT1, tem sua atividade dependente de NAD⁺, sendo induzida por restrição calórica (Greer e Brunet, 2008). Em *D. melanogaster*, SIRT4 é a homóloga de SIRT3 humana, mas não foi demonstrado se ela atua de fato na mitocôndria (Frye, 2000).

Someya *et al.* (2010) demonstraram correlação entre restrição calórica, indução de SIRT3, ativação de IDH e supressão de danos oxidativos. Esse pode ser um dos mecanismos pelo qual RD aumentou a longevidade em OC e OP. Além de outros efeitos, a ativação de sirtuínas na mitocôndria pode melhorar a eficiência geral da função exercida pelas enzimas codificadas pelo alelo “lento” dessas linhagens (IDH^S, *slow*) através da acetilação/ativação de maior quantidade de enzimas.

Admitindo-se esse contexto, o fato da linhagem OT com IDH^F mais eficiente não ter respondido positivamente à RD, tendo sua longevidade maximizada em meio hipercalórico, indica a possibilidade de que a desacetilação da enzima IDH/NADP

codificada pelo alelo rápido de *idh* desta linhagem não seja o fator limitante para sua eficiência funcional. Talvez essa maior eficiência compense um menor nível de ativação ou da quantidade de enzimas ativadas, suposição que pode indicar que esse alelo mais eficiente tenha uma maior habilidade adaptativa em lidar com o ambiente hipercalórico, o que implica numa grande importância no seu estudo nesse contexto. Contraditoriamente, sob aspecto de divergência genética estrutural, a linhagem OC apresentou maior similaridade à OT do que à OP em relação as variações entre alelos de p12 *loci* estudados nessas populações. No entanto, numa análise de divergência regulatória, utilizando o índice de Jaccard, a linhagem OT foi a que mais divergiu da OC (Loreto e Oliveira, 1988a). Isso fornece respaldo ao papel fundamental dos genes regulatórios na diversidade fenotípica. Assim, outros alelos fixados com a seleção sucessiva, principalmente de genes regulatórios, podem estar envolvidos na resposta anômala da linhagem OT e devem ser estudados.

No presente trabalho, a adição de resveratrol foi capaz de estender a longevidade das linhagens OT e Swt em praticamente todos os meios. No entanto, nas linhagens OP e OC o resveratrol não alterou significativamente a longevidade, ou, inesperadamente, teve efeitos deletérios. Utilizando diversas doses de resveratrol, Bass *et al.* (2007b) também não encontraram diferenças na longevidade nas linhagens Dahomey e Canton S de *D. melanogaster*. Análise das propriedades ativas do resveratrol foi feita, com resultado positivo, levando-os a questionarem a robustez dos efeitos do resveratrol na longevidade, além de cogitar a possibilidade de fatores ambientais desconhecidos terem resultado nessas diferenças.

Os efeitos benéficos do resveratrol parecem ocorrer de maneira dose-dependente (Mukherjee *et al.*, 2010). Administração de altas dosagens de resveratrol têm um forte efeito pro-apoptótico, provavelmente através da ativação da cascata de caspase (Ferry-Dumazet *et al.*, 2002). Em altas dosagens, resveratrol resultou em nefrotoxicidade, com

desenvolvimento de diversas patologias (Crowell *et al.*, 2004) e diminuição da longevidade em roedores (Pearson *et al.*, 2008) e promoveu arterosclerose em coelhos (Wilson *et al.*, 1996). Os efeitos deletérios de resveratrol nas linhagens OP e OC podem ser devidos a diferente grau de sensibilidade desses genótipos em particular. A variação genética pode ter um papel importante na variação da resposta linhagem-específica ao tratamento. Pacientes portadores do alelo de baixa atividade ou inativos do gene *cyp2d6* não toleram mais de 75mg/d da droga venlafaxina, menos da metade da dose tolerada por indivíduos com alelos plenamente funcionais (McAlpine *et al.*, 2007). O FDA americano lista mais de 23 drogas e biomarcadores genéticos, cuja resposta à dosagem dependem do polimorfismo enzimático (FDA, 2011).

O fato de a subexpressão de *Sir2* ocasionar, entre outros efeitos, diminuição da longevidade é amplamente documentado (Guarente, 2000; Astrom *et al.*, 2003; Blander e Guarente, 2004; Kaeberlein *et al.*, 2005). A baixa longevidade e alta mortalidade observada na linhagem Swt (genótipo $y^1 w^{67c23}$: selvagem para o locus *Sir2*) em relação à linhagem *Sir2*⁻ ($y^1 w^{67c23}$; *P{SUPor-P}**Sir2*KG00871: alelo hipomórfico de *Sir2*) neste trabalho gerou dúvidas quanto às linhagens. O genótipo *w67c23* consiste na deleção cromossômica nos pontos de quebra 3C2 e 3C5 impedindo o gene *white* de se expressar (Flybase, 2012) e *y1* consiste numa mutação de ponto sem sentido formando um alelo nulo (Drapeau, 2001). Além dos efeitos fenotípicos visíveis, as funções dos produtos dos ainda não são completamente conhecidas mas incluem a relação de *w* com biossíntese de amina celular e transporte de cGMP, e de *y* no comportamento sexual de machos, podendo atuar como um hormônio ou como um fator de crescimento (Drapeau *et al.*, 2003). Assim, os produtos desses genes podem influenciar outras vias metabólicas.

Devido à ausência de informações mais específicas sobre a longevidade dessas linhagens em outros laboratórios, há a possibilidade de terem ocorrido mutações espontâneas, que também necessita ser investigado. Lefevre and Green (1972)

documentaram o retardo na eclosão do adulto da pulpa, fato também observado no presente experimento. Além disso, a resposta da longevidade à subexpressão de *Sir2* depende do contexto genotípico. A expressão de *Sir2* em leveduras com mutações em genes relacionados ao aumento de resistência a estresse impede o aumento da longevidade ocasionado por essas mutações (Fabrizio *et al.*, 2005). A deleção de *Sir2* é capaz de aumentar ainda mais a longevidade de alguns mutantes com maior tempo de vida (Burnett *et al.*, 2011). Algumas linhagens de roedores com *sir2* nulo apresentam metabolismo semelhante aos mutantes de longa vida com deficiência na via insulín/IGF-1 (McBurney *et al.*, 2003), o que indica que subexpressão de *sir2* também pode paradoxalmente ter função antienvhecimento.

A maior longevidade em resposta a RD observados na linhagem com alelo hipomórfico de *Sir2* indica que os efeitos de extensão de longevidade de RD não são exclusivamente dependentes de *Sir2*. Evidências sobre a necessidade de *Sir2* para a presença de efeitos de extensão de longevidade causadas por restrição calórica são conflitantes (Tsuchiya *et al.*, 2006; Kaerberlein e Kennedy, 2005, 2007). Não apenas sirtuínas, mas outras vias sensoras nutricionais ou do *status* energético, como TOR e AMPK têm sua modulação alterada por RD (Kenyon, 2010). RD não dependeu de *Sir2* para prolongar a longevidade em algumas linhagens de leveduras (Kaerberlein *et al.*, 1999), sendo capaz de estender a longevidade de forma dependente de TOR e *Sch9* (Kaerberlein *et al.*, 2005). A via sensora mais ativamente induzida pela RD depende do tipo específico de restrição e como e quando ela é imposta (Kenyon, 2010), demonstrando que diferentes estímulos atuam através de diferentes mecanismos resultando em mudanças metabólicas que, mesmo distintas, frequentemente se justapõem, convergindo para estender a longevidade.

O resveratrol é reconhecido como um ativador de sirtuína, com potencial de mimetizar os efeitos de RC na longevidade (Baur, 2010). No entanto, a adição de

resveratrol estendeu a longevidade em fêmeas da linhagem Sir2- em todos os meios e em machos em meio hipocalórico. Há controvérsia em relação à ativação de Sir2 por resveratrol (Kaeberlein *et al.*, 2005; Baur e Sinclair, 2006), com evidências sugerindo que sirtuínas não são os únicos alvos desse polifenol (Mukherjee *et al.*, 2010). AMPK quinase, importante sistema sensor do status energético da célula, é intensamente ativado por resveratrol, de maneira independente de Sir2 (Zhang *et al.*, 2006). Resveratrol inibe as enzimas ciclooxygenase e lipoxigenase envolvidas no processo inflamatório (Atten *et al.*, 2005). Uma série de moléculas como JNK, p38, p53, FOXO, Bax, PKC/PKD, NF-κB e outras têm sua função alterada por resveratrol (Pirola and Frojdo, 2008).

Os efeitos de RD no desempenho de machos no teste RING não foram consistentes, diferindo entre as linhagens e fase de vida (juventude e maturidade). Em acordo com os resultados da parte 1 deste trabalho, o aumento na longevidade não coincidiu com um melhor desempenho no teste RING. As linhagens OC e OP submetidas à RD tiveram longevidade estendida, mas apresentaram pior desempenho em RING. Contraditoriamente, os efeitos de RD em OT foram inversos, com redução de longevidade e melhora no desempenho RING. Esse efeito oposto da intervenção na longevidade e na função neuromotora indica que a senescência de ambos é regulado por mecanismos diferentes, como proposto na parte I deste trabalho.

Com exceção de Sir2-, todas as outras linhagens tiveram os efeitos da deterioração da resposta de geotaxia negativa associada à idade retardados quando tratados com resveratrol. Existem vários relatos dos efeitos benéficos do resveratrol na prevenção e adiamento de patologias neuromusculares associadas à idade, assim como na deterioração funcional em doenças crônico-degenerativas. Resveratrol apresenta efeitos terapêuticos em modelos animais de epilepsia, Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerose amiotrófica lateral e danos aos nervos (Rocha-González *et al.*, 2008) provavelmente por atenuar a apoptose através de sua interação com Bax, retardando a

degeneração neuronal (Long *et al.*, 2009; Gerhardt *et al.*, 2011). O fato da linhagem Sir2 nula não ter tido sua deterioração neuromotora retardada pela administração do resveratrol pode indicar o envolvimento dessa sirtuína nesse contexto.

Como foi mencionado anteriormente, adição de um novo componente à dieta gera uma série de outras possibilidades que explicam a resposta de *D. melanogaster* ao tratamento. Além das variáveis de diluição do meio (restrição calórica) e administração de resveratrol, é necessário considerar a utilização de lipídios nesse paradigma como indutor de mudanças gênicas e metabólicas capazes de alterar a longevidade, assim como capaz de interagir com a própria RC, resveratrol e os genes aqui estudados, com consequências diferentes.

Sirtuínas regulam aspectos importantes do metabolismo de lipídios, estando envolvidas na repressão de *PPAR γ* , *TNF α* , *IL-6*, *LXR* e *PGC-1 α* (Lomb *et al.*, 2010). Aumento na expressão de SIRT1 protege contra obesidade induzida por dieta hipercalórica e resistência à insulina por intensificar o metabolismo oxidativo no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo. Esses efeitos são mediados por uma alteração metabólica global, semelhante à resposta adaptativa a baixos níveis de energia, consequência da indução de vias que controlam a oxidação de ácidos graxos envolvendo a desacetilação de PGC-1 α , FOXO1, e p53 e indução de AMPK (Feige *et al.*, 2008).

Ácidos graxos dietéticos se ligam aos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), tornando-os capazes de se ligar ao DNA e promover a transcrição de genes relacionados à proliferação e diferenciação de células do sistema imune e à inflamação, como NF- κ B e AP-1, levando ao aumento de uma série de mediadores inflamatórios. Resveratrol é capaz de inibir NF- κ B e reverter a indução do processo inflamatório por ácidos graxos alimentares, num exemplo de possíveis interações entre lipídios alimentares e resveratrol (Kumar e Sharma, 2010). Tanto Sir2 quanto Hsp22 causam a inativação funcional de P53, promovendo a sobrevivência da célula sob

estresse (Luo *et al.*, 2001; Wadhwa *et al.*, 2009), embora o resveratrol pareça ativar p53 induzindo a via apoptótica (She *et al.*, 2001).

Apesar de algumas poucas exceções, ao contrario do esperado, a maior expressão de *Hsp22* não teve correlação direta com aumento de longevidade, nem com o desempenho no teste RING. Apesar das pesquisas que indicam função positiva de *Hsp22* na extensão da longevidade e contra danos oxidativos, a superexpressão desse gene pode diminuir a resistência a estresse e a longevidade. Acumulação experimental de *Hsp22* em moscas jovens diminuiu a resistência a estresse térmico e oxidativo, reduzindo a longevidade (Bhole *et al.*, 2004). Esse resultado pode demonstrar que a superexpressão de *Hsp22* em certas condições resulta em fenótipo atípico, com efeitos deletérios na longevidade e na resistência a estresses. A expressão normal desse gene em moscas selvagens é observada em estágios de vida tardios (Wheeler *et al.*, 1995). *Hsp22* pode apresentar pleiotropia antagônica, com expressão regulada durante o desenvolvimento e em adultos jovens, podendo ser benéficas nessas etapas da vida, mas quando acumulados, podem ser tóxicos em idades tardias (Bhole *et al.*, 2004). Essa hipótese pode explicar o fato de neste trabalho não ter sido observada correlação entre expressão de *Hsp22* em estágio larval com extensão da longevidade das moscas, pois apesar das evidências de maior expressão desse gene em idades avançadas serem benéficas, ainda é desconhecido os efeitos e interações de sua expressão em outras fases de vida.

Apesar das evidências da indução de sistemas de resistência a estresses por RD, diluição do meio não aumentou a formação de pufes onde se encontra o gene *Hsp22*, o que indica baixo nível de transcrição desse gene. Entretanto, de forma geral, a concentração do meio pareceu estar diretamente relacionada à presença de maiores pufes *Hsp22* em todas as linhagens, exceto Sir2-. Ainda não estão totalmente esclarecidos os mecanismos de regulação do gene *Hsp22*, mas alterações epigenéticas

parecem estar envolvidas. Deleção de Kdm4a, que codifica uma demetilase de histona, diminui os níveis de mRNAs de *Hsp22* em machos (Lorbeck *et al.*, 2010). Inibidores de enzimas desacetilases são capazes de aumentar a expressão de *Hsp22*, o que indica que acetilação de histonas pode ser um processo envolvido na regulação desse gene (Tao *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2004). De fato, mapeamento de *loci* alvos de Sir2 mostra alto nível de ligação dessa sirtuína na região 67B do braço 3L, onde está localizado o gene *Hsp22* (Van Steensel *et al.*, 2002). A inalteração do tamanho dos pufes na linhagem Sir- fornece mais indicativos da existência de interação genética ou física entre Sir2 e *Hsp22*.

Apenas no meio hipocalórico, adição de resveratrol foi capaz de aumentar significativamente o tamanho dos pufes *Hsp22* nas linhagens OT e Swt, mas não teve esse efeito na linhagem Sir2-. Há evidências de que o resveratrol altera o substrato alvo de Sir2, pois ao ligar-se à sirtuína, o resveratrol pode mudar sua conformação química ou estrutural, alterando sua afinidade com o substrato (Viswanathan *et al.*, 2005). Admitindo-se a hipótese do resveratrol alterar a afinidade química de Sir2, sua adição pode ter diminuído a afinidade pelo *locus* de *Hsp22*. Essa hipótese também é proposta para explicar o fato do resveratrol exercer atividade sobre substratos específicos *in vitro*, mas ter efeitos diferentes em diferentes vias metabólicas *in vivo* (Kaeberlein, 2005).

O fato de RD e resveratrol terem estendido a longevidade na linhagem Sir2- implica na utilização de mecanismo outro que não o de sirtuínas para tais efeitos. Uma possibilidade é a indução de expressão de genes envolvidos na desintoxicação de drogas, que aumenta as defesas contra pró-oxidantes e outras substâncias tóxicas (Bass *et al.*, 2007b). Vários compostos eletrofílicos podem induzir esta bateria de genes através da ativação do fator de transcrição NRF-2, que estimula a transcrição de genes com resposta antioxidante (Talalay *et al.*, 2003), sendo o resveratrol é um potente indutor desse sistema (Jang *et al.*, 1997). Em resposta a estresses ambientais, como desidratação, predação, infecções e escassez de nutrientes, plantas e outro organismos

autótrofos sintetizam uma infinidade de metabólitos secundários, ativando seu sistema de defesa contra determinado estresse específico (Lamming *et al.*, 2004). Esses metabólitos constituem uma assinatura química do *status* ambiental do ecossistema no qual a planta se encontra (Goldenberg *et al.*, 2010), podendo agir interespecificamente, sinalizando aos organismos heterotróficos que ingeriram a planta sobre as condições ambientais e possível escassez futura (Howitz e Sinclair, 2008). A adaptação metabólica do organismo heterotrófico como resposta ao metabólito pode alterar vias metabólicas resultando em extensão da longevidade. Ao agir como sinais químicos interespecíficos, esses metabólitos podem funcionar como uma pressão seletiva na evolução dos organismos heterotróficos com capacidade de antecipar o *status* ambiental e se preparar precocemente contra eventos adversos.

É pouco provável que fitofenóis como o resveratrol atuem no organismo heterotrófico por apresentarem toxicidade, como foi proposto para lipídios (Lamming *et al.*, 2004). Ao invés disso, a hipótese de xenohormese, sugerida para explicar os efeitos do resveratrol, propõe que esses polifenóis têm a habilidade de modular diretamente enzimas chaves na regulação de vias metabólicas envolvidas na determinação da longevidade (Goldberg *et al.*, 2010). Tais substâncias seriam produzidas com objetivo primário de inibir o crescimento proliferativo de organismos competidores ou parasitários, sendo o aumento da longevidade um efeito colateral dessas substâncias em indivíduos que já completaram os estágios de crescimento. Essa ideia se aplica a exemplos como a produção de rapamicina por bactérias do solo e de resveratrol nas cascas de uvas com o intuito de inibir crescimento de fungos (Blagosklonny, 2009).

Os resultados deste trabalho, além de retratarem a complexidade multifatorial da senescência, destacaram a importância do estudo da atuação específica de componentes isolados da dieta. Os efeitos do resveratrol observados nas diferentes linhagens evidenciam que ainda há muitas inconsistências em relação a esse polifenol no aumento

do tempo de vida. Estudos aprofundados levando em consideração outros marcadores genéticos são necessários para o entender quais diferenças genotípicas podem estar atuando de maneira a responder ou não ao tratamento com resveratrol.

Restrição dietética, lipídios e resveratrol parecem interagir com genes e vias metabólicas em comum que estão relacionadas com o aumento da longevidade. As evidências aqui presentes, ainda que indiretos, indicam que a relação epigenética entre os genes *Sir2* e *Hsp22*, assim como a influência dos fatores mencionados, deve ser estudada mais profundamente. Apesar de a epigenética ser uma área da genética relativamente nova, está cada vez mais clara a importância do epigenoma como interface entre o ambiente e o genoma, sendo o seu esclarecimento de suma importância para o desenvolvimento de fármacos (Jones e Divecha, 2004).

7. CONCLUSÕES

1. A alteração do componente lipídico da dieta foi capaz de alterar parâmetros de longevidade e mortalidade em *Drosophila melanogaster*, independentemente do conteúdo energético e a proporção entre carboidratos e proteínas, indicando a possibilidade de lipídios interagirem com vias metabólicas relacionadas à senescência nesse organismo;
2. A utilização de lipídios em ensaios de restrição dietética alterou a taxa de envelhecimento, em contraste à maioria dos ensaios de RD/RC tradicionais, os quais sugerem que a restrição não retarda o acúmulo de danos em *Drosophila*. Esse resultado pode indicar que a restrição calórica e a restrição/suplementação de um nutriente específico podem atuar através de mecanismos distintos, devendo ser estudadas isoladamente;
3. Os efeitos dos lipídios dietéticos na longevidade de *D. melanogaster* foram dependentes do sexo, aparentando ser levemente tóxicos com efeito similar ao hormético em machos;
4. A RD utilizando lipídios não foi capaz de retardar a deterioração neuromotora na maioria das linhagens, o que indica que esta intervenção, apesar de estender a longevidade, não necessariamente retarda a decadência funcional global do organismo;
5. As respostas de longevidade, mortalidade e no teste RING à RD e resveratrol diferiram entre as linhagens e entre fêmeas e machos de uma mesma linhagem, refletindo a significância do controle genotípico nas respostas às essas intervenções;
6. Os efeitos positivos da RD no mutante *sir2* hipomórfico corrobora a hipótese de que vários mecanismos e vias metabólicas, além das sirtuínas, são responsáveis pela extensão da longevidade em *Drosophila*;

7. O resveratrol, apesar de não ter estendido a longevidade de forma consistente em todas as linhagens, desacelerou a decadência das funções locomotoras em *D. melanogaster*. Juntamente com resultados positivos de pesquisas anteriores, esse resultado fornece uma forte evidência da possibilidade de utilização desse polifenol para retardar a deterioração de funções que impactam prioritariamente a qualidade de vida de idosos;
8. O aumento de longevidade após administração de resveratrol na linhagem *sir2* hipomórfica (*Sir2*⁻) foi particularmente significativo, demonstrando que, pelo menos na extensão de longevidade, *Sir2* não parece ser essencial para a ação desse fitonutriente;
9. Os resultados deste trabalho podem indicar que *Sir2* silencia a região onde se encontra *Hsp22*, inibindo diretamente sua expressão. Além disso, o resveratrol pode ser capaz de alterar a conformação química de *Sir2*, diminuindo sua afinidade pelo locus de *Hsp22*;

8. BIBLIOGRAFIA

- Adams MD, Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.
- Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW and Harley CB (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci* 89:10114-10118. 1992.
- Antosh M, Whitaker R, Kroll A, Hosier S, Chang C, Bauer J, Cooper L, Neretti N and Helfand SL (2011) Comparative transcriptional pathway bioinformatic analysis of dietary restriction, Sir2, p53 and resveratrol life span extension in *Drosophila*. *Cell Cycle* 10(6): 904-911.
- Apfeld J, O'Connor G, McDonagh T, DiStefano PS and Curtis R (2004) The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev* 18:3004-3009.
- Arrese EL, Canavoso LE, Jouni ZE, Pennington JE, Tsuchida K and Wells MA (2001) Lipid storage and mobilization in insects: current status and future. *Directions. Insect Biochem Mol Biol* 31:7-17.
- Ashburner M and Berendes HD (1978) Puffing of polytene chromosomes. In: *The Genetics and Biology of Drosophila* (Ashburner, M. and Wright, T.R.F., eds.). Academic Press, New York, 315-376.
- Astrom SU, Cline TW and Rine J (2003) The *Drosophila melanogaster* Sir2(+) gene is nonessential and has only minor effects on position-effect variegation. *Genetics* **163**: 931-937.
- Atten MJ, Godoy-Romero E, Attar BM, Milson T, Zopel M and Holian O (2005) Resveratrol regulates cellular PKC alpha and delta to inhibit growth and induce apoptosis in gastric cancer cells. *Invest New Drugs* 23:111-119.
- Barger JL, Kayo T, Vann JM, Arias EB, Wang J, Hacker TA, Wang Y, Raederstorff D, Morrow JD, Leeuwenburgh C et al. (2008) A Low Dose of Dietary Resveratrol Partially Mimics Caloric Restriction and Retards Aging Parameters in Mice. *PLoS ONE* 3(6):e2264.
- Barger JL, Walford RL and Weindruch R (2003) The retardation of aging by caloric restriction: its significance in the transgenic era. *Exp Gerontol* 38: 1343-1351.
- Barnes AL, Boone JM, Jacobson J, Partridge L and Chapman T (2006) No extension of lifespan by ablation of germ line in *Drosophila* *Proc R Soc B* 273: 939-947.
- Bass TM, Grandison RC, Wong R, Martinez P, Partridge L and Piper MDW (2007a) Optimization of dietary restriction protocols in *Drosophila*. *Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62: 1071-1081.
- Bass TM, Weinkove D, Houthoofd K, Gems D and Partridge L (2007b) Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* 128:546-552.
- Basta G, Schmidt AM and Caterina RD (2004) Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res* 63:582-592.
- Baur JA (2010) Resveratrol, Sirtuins, and the Promise of a DR Mimetic. *Mech Ageing Dev* 131(4): 261-269.
- Baur JA e Sinclair DA (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5:493-506.
- Beckham KB and Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78:547-581.

- Bellizzi D, Rose G, Cavalcante P, Covello G, Dato S, De Rango F, Greco V, Maggiolini M, Feraco E, Mari V, et al. (2005) A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages. *Genomics* 85: 258–263.
- Benatti P, Rose G, Cavalcante P, Covello G, Dato S, Rango FD, Greco V, Maggiolini M, Feraco E, Mariet V et al. (2004) Polyunsaturated Fatty Acids: Biochemical, Nutritional and Epigenetic Properties. *J Am Coll Nutr* 23(4): 281–302.
- Benndorf R and Welsh MJ (2004) Shocking degeneration. *Nat Genet* 36:547-548.
- Berendes HD (1965) Salivary gland function and chromosomal puffing patterns in *Drosophila hydei*. *Chromosoma* 17:520-552.
- Berger EM and Dubrovsky EB (2005) Juvenile Hormone Molecular Actions and Interactions During Development of *Drosophila melanogaster*. *Vitam Horm* 73:175-215.
- Berlett BS and Stordtman ER (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272:20313–20316.
- Bhandari P, Jones MA, Martin I and Grotewiel MS (2007) Dietary restriction alters demographic but not behavioral aging in *Drosophila*. *Aging Cell* 6:631–637.
- Bhole D, Allikian MJ and Tower J (2004). Doxycycline-regulated overexpression of hsp22 has negative effects on stress resistance and life span in adult *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev* 125, 651-663.
- Birch-Machin MA (2006) The role of mitochondria in ageing and carcinogenesis. *Clin Exp Dermatol* 31:548–552.
- Bishayee A (2009) Cancer Prevention and Treatment with Resveratrol: From Rodent Studies to Clinical Trial. *Cancer Prev Res* 2:409-418.
- Bishop, NA and Guarente L (2007) Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. *Nat Rev Genet* 8:835-844.
- Blagosklonny MV (2009) Inhibition of S6K by resveratrol: In search of the purpose. *Aging* 1(6):511-514.
- Blander G and Guarente L (2004) The sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* 73:417–35.
- Bonawitz ND, Chatenay-Lapointe M, Pan Y and Shadel GS (2007) Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression. *Cell Metab* 5:265–277.
- Boocock DJ, Patel KR, Faust GES, Normolle DP, Marczylo TH, Crowell JA, Brenner DE, Booth TD, Gescher A and Steward WP (2007) Quantitation of trans-resveratrol and detection of its metabolites in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 848: 182-187.
- Bordone L and Guarente L (2005) Calorie restriction, sirt1 and metabolism: understanding longevity. *Nature* 6:298-305.
- Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, McDonagh T, Lemieux M, McBurney M, Szilvasi A et al. (2006) Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic B cells. *PLoS Biol* 4(2):e31.
- Bosch TCG (2007) Why polyps regenerate and we don't: Towards a cellular and molecular framework for *Hydra* regeneration. *Dev Biol* 303(2):421-433
- Bronikowski AM and Flatt T (2010) Aging and Its Demographic, Measurement. *Nature Education Knowledge* 1(12):1-3
- Bross TG, Blanka Rogina and Helfand SL (2005) Behavioral, physical, and demographic changes in *Drosophila* populations through dietary restriction. *Aging Cell* 4:309–317.
- Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-820.

- Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY et al. (2004) Stress-dependent regulation of foxo transcription factors by the sirt1 deacetylase. *Science* 303:2011-2015.
- Burger JMS, Hwangbo DS, Corby-Harris V and Promislow DEL (2006) The functional costs and benefits of dietary restriction in *Drosophila*. *Aging Cell* 6 (1): 63–71.
- Burnett C, Valentini S, Cabreiro F, Goss M, Somogyvári M, Piper MD, Hodginott M, Sutphin GL, Leko V, McElwee JJ et al. (2011) Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature* 477:482-486.
- Calabrese EJ (2011) Resveratrol and hormesis: an assessment of its dose-response. *Belle newsletter* 16(2):1-65.
- Calabrese EJ, Cornelius C, Cuzzocrea S, Iavicoli I, Rizzarelli E and Calabrese EJ. (2011) Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity. *Mol Aspects Med* 32:279–304.
- Calderwood SK, Murshid A and Prince T (2009) The Shock of Aging: Molecular Chaperones and the Heat Shock Response in Longevity and Aging – A Mini-Review. *Gerontology* 55:550–558.
- Campisi G, Chiappelli M, Martinis MD, Franco V, Ginaldi L, Guiglia R, Licastro F and Lio D (2009) Pathophysiology of age-related diseases. *Immun Ageing* 6:1. 2009.
- Campos SRC, Rieger TT and Santos JF (2007) Homology of polytene elements between *Drosophila* and *Zaprionus* determined by *in situ* hybridization in *Zaprionus indianus*. *Genet Mol Res* 6 (2):262-276.
- Canavoso LE, Jouni ZE, Karnas KJ, Pennington JE and Wells MA (2001) Fat metabolism in insects. *Annu Rev Nutr* 21:23–46.
- Chaudhuri TK and Subhankar P (2006) Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *FEBS Journal*, 273: 1331–1349.
- Chen Z-H, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N and Niki E (2006) Adaptive response induced by lipid peroxidation products in cell cultures. *FEBS Letters*, 580:479–483.
- Chiang JYL (2002) Bile Acid Regulation of Gene Expression: Roles of Nuclear Hormone Receptors. *Endocr Rev* 23(4):443–463.
- Chiu CP and Harley CB (1997) Replicative Senescence and Cell Immortality: The Role of Telomeres and Telomerase. *Proc Soc Exp Biol Med* 214: 99-106.
- Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, Oldham S, Stocker H, Hafen E, Leivers SJ and Partridge L (2001) Extension of Life-Span by Loss of CHICO, a *Drosophila* Insulin Receptor Substrate Protein. *Science* 292:104-106.
- Clarke SD and Jump DB (1994) Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu Rev Nutr* 14:83–98.
- Colinet H, Lee SF and Hoffmann A (2010) Knocking down expression of Hsp22 and Hsp23 by RNA interference affects recovery from chill coma in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 213: 4146-4150.
- Corces V, Holmgren R, Freund R, Morimoto R and Meselson M (1980) Four heat shock proteins of *Drosophila melanogaster* coded within a 12-kilobase region in chromosome subdivision 67B. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **77**: 5390-5393.
- Costa KA, Kozyreva OG, Song J, Galanko JA, Fischer LM and Zeisel SH (2006) Common genetic polymorphisms affect the human requirement for the nutrient choline. *FASEB J* 20:1336–1344.
- Crowell JA, Korytko PJ, Morrissey RL, Booth TD and Levine BS (2004) Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol Sci* 82:614-619.
- Cunha GL and Oliveira AK (1996) Citric acid cycle: a mainstream metabolic pathway influencing life span in *drosophila melanogaster*? *Exp Gerontol* 31(6) 705-715.
- Dang W, Steffen KK, Perry R, Dorsey JA, Johnson FB, Shilatifard A, Kaeberlein M, Kennedy BK and Berger SL (2009) Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan. *Nature* 459: 802-807.

- Drapeau MD (2001) The Family of Yellow-Related *Drosophila melanogaster* Proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 281:611–613.
- Drapeau MD, Radovic A, Wittkopp PJ and Long AD (2003) A Gene Necessary for Normal Male Courtship, *yellow*, Acts Downstream of *fruitless* in the *Drosophila melanogaster* Larval Brain. *Wiley Periodicals Inc J Neurobiol* 55: 53–72.
- Dryde SC, Nahhas FA, Nowak JE, Goustin A-S and Tainsky MA (2003) Role for Human SIRT2 NAD-Dependent Deacetylase Activity in Control of Mitotic Exit in the Cell Cycle. *Mol Cell Biol* 23(9): 3173–3185.
- Ellegren H and Parsch J (2007) The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. *Nat rev genet* 8:689-698.
- Ellers J, Ruhe B and Visser B (2011) Discriminating between energetic content and dietary composition as an explanation for dietary restriction effects. *J Insect Physiol* 57:1670–1676.
- Erjavec N, Larsson L, Grantham J and Nyström T (2007) Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p. *Genes Dev* 21:2410-2421.
- Fabris N (1991) Neuroendocrine-immune interactions: a theoretical approach to aging. *Arch Gerontol Geriatr* 12(2-3):219-230.
- Fabrizio P, Gattazzo C, Battistella L, Wei M, Cheng C, McGrew K and Longo VD (2005) Sir2 Blocks Extreme Life-Span Extension. *Cell* 123,655–667.
- Fatehi-Hassanabad Z and Chan CB (2005) Transcriptional regulation of lipid metabolism by fatty acids: a key determinant of pancreatic β -cell function. *Nutri Metab* 2:1-12.
- Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A and Merillon JM (1997) Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci* 61:2103-2110.
- FDA (2011). Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labels. <http://www.fda.gov/drugs/scienceresearch/researchareas/pharmacogenetics/ucm083378.htm>. Consulta em 19/11/2011.
- Feige JM, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, Lambert PD, Matakis C, Elliott PJ and Auwerx J (2008) Specific SIRT1 Activation Mimics Low Energy Levels and Protects against Diet-Induced Metabolic Disorders by Enhancing Fat Oxidation. *Cell Metab* 8:347–358.
- Ferry-Dumazet H, Garnier O, Mamani-Matsuda M, Vercauteren J, Belloc F, Billiard C, Dupouy M, Thiolat D, Kolb JP, Marit G et al. (2002) Resveratrol inhibits the growth and induces the apoptosis of both normal and leukemic hematopoietic cells. *Carcinogenesis* 23:1327-1333.
- Finkel T and Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247.
- Fletcher JC, Burtis KC, Hogness DS and Thummel SC (1995) The *Drosophila* E74 gene is required for metamorphosis and plays a role in the polytene chromosome puffing response to ecdysone. *Development* 121:1455-1465.
- Flybase (2011). A database of *Drosophila* genes & genomes. <http://flybase.bio.indiana.edu/> Consulta em 02/08/2011.
- Flybase (2012). Aberration Dmel\Df(1)w67c23. <http://flybase.org/reports/FBab0001030.html>. Consulta em 17/03/2012.
- Fontana L, Meyer TE, Klein S and Holloszy JO (2004) Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *PNAS* 101(17): 6659–6663.
- Ford E, Voit R, Liszt G, Magin C, Grummt I and Guarente L (2006) Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes & Dev* 20:1075–1080.

- Fortini ME, Skupski MP, Boguski MS and Hariharan IK (2000) A survey of human disease gene counterparts in the *Drosophila* genome. *J Cell Biol* 24:F23-30.
- Fox CW, Scheibly KL, Wallin WG, Hitchcock LJ, Stillwell RC and Smith BP (2006) The Genetic Architecture of Life Span and Mortality Rates: Gender and Species Differences in Inbreeding Load of Two Seed-Feeding Beetles. *Genetics* 174: 763–773.
- Friedman DB and Johnson TE (1988) A mutation in the *age-1* gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* 118: 75-86.
- Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ and Burrell MA (2001) The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E827-E847.
- Frye RA (2000) Phylogenetic Classification of Prokaryotic and Eukaryotic Sir2-like Proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 793–798.
- Gago-Dominguez M, Jiang X and Castelao JE (2007) Lipid peroxidation and the protective effect of physical exercise on breast cancer. *Med Hypotheses* 68: 1138–1143.
- Gargano JW, Martin I, Bhandari P and Grotewiel MS (2005) Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Exp Gerontol* 40: 86-95.
- Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY and Jameson JL (1997) Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14138–14143.
- Gems D and Partridge L (2008) Stress-Response Hormesis and Aging: “That which Does Not Kill Us Makes Us Stronger”. *Cell Metabolism* 7:200-203.
- Gerhardt E, Gräber S, Szego EM, Moiso N, Martins LM, Outeiro TF and Kermer P (2011) Idebenone and Resveratrol Extend Lifespan and Improve Motor Function of HtrA2 Knockout Mice. *PLoS ONE* 6(12): e28855.
- Giannakou ME, Goss M and Partridge L (2008) Role of dFOXO in lifespan extension by dietary restriction in *Drosophila melanogaster*: not required, but its activity modulates the response. *Aging Cell* 7:187–198.
- Gillette-Guyonnet S and Vellas B (2008) Caloric restriction and brain function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11:686–692.
- Goldberg AA, Kyryakov P, Bourque SD and Titorenko VI (2010) Xenohormetic, hormetic and cytostatic selective forces driving longevity at the ecosystemic level. *Aging* 2(8):461-470.
- Good TP and Tatar M (2001) Age-specific mortality and reproduction respond to adult dietary restriction in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 47:1467–1473.
- Goto S, Takahashi R, Araki S and Nakamoto H. (2002) Dietary restriction initiated in late adulthood can reverse age-related alterations of protein and protein metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 959:50-56.
- Grandison RC, Wong R, Bass TM, Partridge L and Piper MD (2009a) Effect of a Standardised Dietary Restriction Protocol on Multiple Laboratory Strains of *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 4(1): e4067.
- Grandison RC, Piper MDW e Partridge L (2009b) Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila*. *Nature* 462:1061-1064.
- Gredilla R (2011) DNA damage and base excision repair in mitochondria and their role in aging. *J Aging Res*, doi:10.4061/2011/257093.
- Greer EL and Brunet A (2008) Signaling networks in aging. *J Cell Sci* 121(4):407-412 .
- Greer EL, Banko MR and Brunet A (2009) AMP-activated protein kinase and foxo transcription factors in dietary restriction-induced longevity. *Ann N.Y. Acad Sci* 1170: 688–692.

- Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP and Brunet A (2007) The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J Biol Chem.* 282(41):30107-30119.
- Griswold AJ, Chang KT, Runko AP, Knight MA and Min KT (2008) Sir2 mediates apoptosis through JNK-dependent pathways in *Drosophila*. *PNAS* 105(25):8673–8678.
- Grønbæk M, Becker U, Johansen D, Gottschau A, Schnohr P, Hein HO, Jensen G and Sørensen TIA (2000) Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease, and cancer. *Ann Intern Med* 133:411-419.
- Grotewiel MS, Martin I, Bhandari P and Cook-Wiens R (2005) Functional senescence in *Drosophila melanogaster*. *Ageing Res Rev* 4:372–397.
- Guarente L (2011) Sirtuins, Aging, and Medicine. *N engl j med* 364: 2235-2234.
- Guarente L and Kenyon C (2000) Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev* 14: 1021-1026.
- Guarente L and Picard F (2005) Calorie restriction - the SIR2 connection. *Cell* 120: 473–482.
- Haigis MC and Guarente LP (2006) Mammalian sirtuins—emerging roles in physiology, aging and calorie restriction. *Gen develop* 20: 2913–2921. 2006.
- Heemst DV, Beekman M, Mooijaart SP, Heijmans BT, Brandt BW, Zwaan BJ, Slagboom PE and Westendorp RGJ (2005) Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity. *Aging Cell* 4:79–85.
- Heerwagen MJR, Miller MR, Barbour LA and Friedman JE (2010) Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299:R711-R722.
- Helfand SL and Rogina B (2003) Genetics of aging in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Genet* 37:329–48.
- Henchcliffe C and Beal MF (2008) Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nat Clin Pract Neurol* 4(11): 600-609.
- Henderson SD (2004) The chromosomes of *Drosophila melanogaster*. In: *Methods in molecular biology: Drosophila cytogenetics protocols*. Edited by: D. S. Henderson © Humana Press Inc., Totowa, NJ. 247:1-43.
- Hiral K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M et al. (2001) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21(9):3017–3023.
- Honjoh S, Yamamoto T, Uno M and Nishida E (2009) Signalling through RHEB-1 mediates intermittent fasting-induced longevity in *C. elegans*. *Nature* 457: 726–730.
- Hotamisligil GS (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867.
- Howitz KT and Sinclair DA (2008) Xenormesis: sensing the chemical cues of other species. *Cell* 133(3):387-391.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang L-L et al. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425:191-196.
- Huang J, Gan Q, Han L, Li J, Zhang H, Sun Y, Zhang Z and Tong T (2008) Sirt1 overexpression antagonizes cellular senescence with activated erk/s6k1 signaling in human diploid fibroblasts. *PLoS ONE* 3(3).E1710
- Hutter E, Unterluggauer H, Uberall F, Schramek H and Jansen-Dürr P (2002) Replicative senescence of human fibroblasts: the role of Ras-dependent signaling and oxidative stress. *Exp Gerontol* 37(11):1165-1174.
- Ikizler M (2006) Protective Effects of Resveratrol in Ischemia-Reperfusion Injury of Skeletal Muscle: A Clinically Relevant Animal Model for Lower Extremity Ischemia. *Chin J Physiol* 49(4):204-209.

- Imai S-I, Armstrong CM, Kaeberlein M and Guarente L (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403:795-800.
- Ingram DK, Weindruch R, Spangler EL, Freeman JR and Walford RL (1987) Dietary restriction benefits learning and motor performance of aged mice. *J Gerontol* 42, 78–81.
- Ja WW, Carvalho GB, Zid BM, Mak EM, Brummel T and Benzer S (2009) Water- and nutrient-dependent effects of dietary restriction on *Drosophila* lifespan. *PNAS* 106(44):18633–18637.
- Jiang T, Liebman SE, Lucia MS, Phillips CL and Levi M (2005) Calorie Restriction Modulates Renal Expression of Sterol Regulatory Element Binding Proteins, Lipid Accumulation, and Age-Related Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 16: 2385–2394.
- Jones DR and Divecha N (2004) Linking lipids to chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 14:196–202.
- Kadowaki T (2000) Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models. *J Clin Invest* 106(4):459–465.
- Kaeberlein M and Kennedy BK (2005) Large-scale identification in yeast of conserved ageing genes. *Mech Ageing Dev*, 126:17-21.
- Kaeberlein M, Powers III RW, Steffen KK, Westman EA, Hu D, Dang N, Kerr EO, Kirklandd TK, Fields S and Kennedyy BK (2005) Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* 310:1193–1196.
- Kaeberlein M and Kennedy BK (2007) Does resveratrol activate yeast Sir2 *in vivo*? *Aging cell* 415(6):415-416.
- Kappeler L, De Magalhaes Filho C, Dupont J, Leneuve P, Cervera P, Périn L, Loudes C, Blaise A, Klein R, Epelbaum J et al. (2008) Brain IGF-1 receptors control mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism. *PLoS Biol* 6, e254.
- Kennedy DO, Wightman EL, Reay JL, Lietz G, Okello EJ, Wilde A and Haskell CF. (2010) Effects of resveratrol on cerebral blood flow variables and cognitive performance in humans: a double-blind, placebo-controlled, crossover investigation. *Am J Clin Nutr* 91: 1590-1597.
- Kenyon C (2005) The Plasticity of Aging: Insights from Long-Lived Mutants. *Cell* 120:449–460.
- Kenyon C (2010) The genetics of ageing. *Nature* 464:504-512.
- Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A and Tabtiang R (1993) *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366: 461–464.
- Kim HJ (2008) Transcriptomic and proteomic studies on longevity induced by over-expression of HSP22 in *drosophila melanogaster*. Collection Mémoires et thèses électroniques. Université Laval.
- Kim S, Kaminker P and Campisi J (2002) Telomere, ageing and cancer: in search for a happy ending. *Oncogene* 21:503-511.
- Kimura KD, Matsubara K and Horikoshi M (1997) *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277: 942-946.
- King V and Tower J (1999) Aging-specific expression of *Drosophila hsp22*. *Dev Biol* 207: 107–118.
- Kirkwood TBL and Holliday R (1979) The evolution of aging and longevity. *Proc R Soc Lond B* 205: 531-554.
- Kirkwood TBL and Rose MR (1991) Evolution of senescence-late survival sacrificed for reproduction. *Phil Trans R Soc Lond B* 332: 15-24.
- Kirkwood TBL and Shanley DP (2005) Food restriction, evolution and ageing. *Mech Ageing Dev* 126:1011–1016.

- Koren III J, Jinwal UK, Lee DC, Jones JR, Shults CL, Johnson AG, Anderson LJ, and Dickey CA (2009) Chaperone signalling complexes in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 13(4): 619–630.
- Koubova J and Guarente L (2003) How does calorie restriction work? *Genes Dev* 17: 313–321.
- Kourtis N and Tavernarakis N (2011) Cellular stress response pathways and ageing: intricate molecular relationships. *The EMBO Journal* 30(13):2520–2531.
- Kubo C, Johnson BC, Day NK and Good RA (1992) Effects of calorie restriction on immunologic functions and development of autoimmune disease in NZB mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 201(2):192–199.
- Kumar S and Sharma SS (2010) NF- κ B inhibitory action of resveratrol: A probable mechanism of neuroprotection in experimental diabetic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 394:360–365.
- Kurapati R, Passananti HB, Rose MR and Tower J (2000) Increased *hsp22*RNA Levels in *Drosophila* Lines Genetically Selected for Increased Longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55(11): B552–B559.
- Kuvichkin VV (2002) DNA–lipid interactions in vitro and in vivo. *Bioelectrochemistry* 58:3–12.
- Lamming DW, Wood JG and Sinclair DA (2004) Small molecules that regulate lifespan: evidence for xenohormesis. *Mol Microbiol* 53:1003–1009.
- Langley E (2002) Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* 21(10): 2383–2396.
- Lavrov S, Déjardin J and Cavalli G (2004) Combined Immunostaining and FISH analysis of polytene chromosomes. In: *Methods in molecular biology: Drosophila cytogenetics protocols*. Edited by: D. S. Henderson © Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Le Bourg E (2011) Using *Drosophila melanogaster* to study the positive effects of mild stress on aging. *Exp Gerontol* 46: 345–348.
- Le Bourg E, Valenti P, Lucchetta P and Payre F (2001) Effects of mild heat shocks at young age on aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology* 2 (3), 155–164.
- Lee CK, Klopp RG, Weindruch R and Prolla TA (1999) Gene Expression Profile of Aging and Its Retardation by Caloric Restriction. *Science* 285: 1390–1393.
- Lee KP, Simpson SJ, Clissold FJ, Brooks R, Ballard JWO, Taylor PW, Soran N and Raubenheimer D (2008) Lifespan and reproduction in *Drosophila*: New insights from nutritional geometry. *PNAS* 105(7):2498–2503.
- Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F and Staels B (2009) Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 89: 147–191.
- Lefevre G and Green MM (1972) Genetic duplication in the white-split interval of the X chromosome in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 36: 391–412.
- Leroi AM, Bartke A, Benedictis GD, Franceschi C, Gartner A, Gonos E, Feder ME, Kivisild T, Lee S, Kartal N et al. (2005) What evidence is there for the existence of individual genes with antagonistic pleiotropic effects? *Mech Ageing Dev* 126:421–429.
- Lin SJ, Defossez P-A and Guarente L (2000) Requirement of NAD and SIR2 for Life-Span Extension by Calorie Restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289: 2126–2128.
- Lomb DJ, Laurent G and Haigis MC (2010) Sirtuins regulate key aspects of lipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804:1652–1657.
- Lomba A, Martínez JA, García-Díaz DF, Paternain L, Marti A, Campión J and Milagro FI (2010) Weight gain induced by an isocaloric pair-fed high fat diet: a nutriepigenetic study on FASN and NDUFB6 gene promoters. *Mol Genet Metab* 101, 273–278.

- Long J, Gao H, Sun L, Liu J and Zhao-Wilson X (2009) Grape Extract Protects Mitochondria from Oxidative Damage and Improves Locomotor Dysfunction and Extends Lifespan in a *Drosophila* Parkinson's Disease Model. *Rejuvenation research* 12(5):321-331.
- Longo VD and Finch CE (2003) Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? *Science* 299:1342–1346.
- Lorbeck MT, Singh N, Zervos A, Dhatta, Lapchenko M, Yang C and Elefant F (2010) The histone demethylase DmKdm4A controls genes required for lifespan and male-specific sex-determination in *Drosophila*. *Gene* 450(1-2): 8–17.
- Loreto ELS and Oliveira AK (1988a) Selection of *D. melanogaster* for extreme developmental rates. I. Structural and regulatory genetic divergence. *Rev Brasil Genet* 11(2):253-265.
- Loreto ELS and Oliveira AK (1988b) Selection of *D. melanogaster* for extreme developmental rates. II. Sexual and reproductive isolation due to hybrid inferiority. *Rev Brasil Genet* 11(2):267-274.
- Lowell BB and Shulman GI (2008) Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307:384–387.
- Luo J, Nikolaev AY, Imai S-I, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L and Gu W (2001) Negative Control of p53 by Sir2 Promotes Cell Survival under Stress. *Cell* 107: 137–148. 2001.
- Macville M, Schrock E, Padilla-Nash H, Keck C, Ghadimi BM, Zimonjic D, Popescu N and Ried T (1999) Comprehensive and Definitive Molecular Cytogenetic Characterization of HeLa Cells by Spectral Karyotyping. *Cancer research* 59, 141–150.
- Magalhães JP, Cabral JAS and Magalhães D (2005) The Influence of Genes on the Aging Process of Mice: A Statistical Assessment of the Genetics of Aging. *Genetics* 169(1):265-274.
- Magwere T, Chapman T and Partridge L (2004) Sex Differences in the Effect of Dietary Restriction on Life Span and Mortality Rates in Female and Male *Drosophila Melanogaster*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59A(1):3-9.
- Maillet L, Boscheron C, Gotta M, Marcand S, Gilson E and Gasser SM (1996) Evidence for silencing compartments within the yeast nucleus: a role for telomere proximity and Sir protein concentration in silencer-mediated repression. *Genes & develop* 10:1796-1811.
- Mair W, Goymer P, Pletcher SD and Partridge L (2003) Demography of dietary restriction and death in *Drosophila*. *Science* 301:1731-1733.
- Mair W, Piper MDW and Partridge L (2005) Calories Do Not Explain Extension of Life Span by Dietary Restriction in *Drosophila*. *PLoS Biol* 3(7): e223.
- Manev H, Dimitrijevic N and Dzitoyeva S (2003) Techniques: *Drosophila* as models for neuropharmacological research. *Trends Pharmacol Sci* 24(1):41-3.
- Martinez J and Moreno JJ (2000) Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem Pharmacol* 59(7):865–870.
- Masoro EJ (2000) Caloric restriction and aging: an update. *J Gerontol* 35:299–305.
- Masoro EJ (2005) Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev* 126, 913–922.
- Masoro EJ (2006) Caloric Restriction and Aging: Controversial Issues. *J Gerontol* 61A(1):14–19.
- Mattson MP and Wan R (2005) Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. *J Nutr Biochem* 16(3):129-137.
- McAlpine DE, O'Kane DJ, Black JL and Mrazek DA (2007) Cytochrome P450 2D6 genotype variation and venlafaxine dosage. *Mayo Clin Proc* 82(9):1065-1068.

- McBurney MW, Yang X, Jardine K, Hixon M, Boekelheide K, Webb JR, Lansdorp PM and Lemieux M (2003) The mammalian SIRT2 α protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Mol Cell Biol* 23, 38–54.
- Meng Y, Ma Q-Y, Kou X-P and Xu J (2005) Effect of resveratrol on activation of nuclear factor kappa-B and inflammatory factors in rat model of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 11(4):525-528.
- Merry BJ (2005) Dietary restriction in rodents—delayed or retarded ageing? *Mech Ageing Dev* 126:951–959.
- Merry BJ and Holehan AM (1979) Onset of puberty and duration of fertility in rats fed a restricted diet. *J Reprod Fertil*, 57:253–259.
- Michaud S, Marin R and Tanguay RM (1997) Regulation of heat shock gene induction and expression during *Drosophila* development. *Cell mol life sci* 53:104–113.
- Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC and Horikawa I (2005) Evolutionarily Conserved and Nonconserved Cellular Localizations and Functions of Human SIRT Proteins. *Mol Biol Cell*, 16:4623–4635.
- Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R and Smith-Wheelock M (2005) Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell* 4:119–125.
- Mitteldorf J (2010) Aging Is Not a Process of Wear and Tear. *Rejuvenation* 13(2):323-326.
- Mitteldorf J (2010) Aging Is Not a Process of Wear and Tear. *Rejuvenation res* 13(2)322-326.
- Monte ES (2010) Gene period: análise da assinatura seletiva e mapeamento em *Drosophila willistoni*. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Morrow G, Battistini S, Zhang P and Tanguay RM (2004a) Decreased lifespan in the absence of expression of the mitochondrial small heat shock protein Hsp22 in *Drosophila*. *J Biol Chem* 279:43382–43385.
- Morrow G, Samson M, Michaud S. and Tanguay RM (2004b) Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress. *FASEB J* 18: 598-599.
- Moskalev A, Shaposhnikov M and Turysheva AE (2009) Life span alteration after irradiation in *Drosophila melanogaster* strains with mutations of Hsf and Hsps. *Biogerontology* 10:3–11.
- Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, Liu P, Mostoslavsky G, Franco S, Murphy MM et al. (2006) Genomic instability and aging- like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 124: 315–329.
- Mukherjee S, Dudley JI and Das DK (2010) Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose-Response* 8:478–500.
- Muntané J, Mitjavila MT, Rodrà MC, Parellada PP, Fernande Y and Mitjavà S (2005) Dietary Lipid and Iron Status Modulate Lipid Peroxidation in Rats with Induced Adjuvant Arthritis. *J Nutr* 133:1930-1937.
- Niculescu MD and Lupu DS (2011) Nutritional influence on epigenetics and effects on longevity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14(1):35-40.
- Niwa R and Niwa YS (2011) The Fruit Fly *Drosophila melanogaster* as a Model System to Study Cholesterol Metabolism and Homeostasis. *Cholesterol* 2011:1-6.
- Nowak SJ and Corces VG (2000) Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci. *Genes Dev* 14: 3003-3013.
- Orentreich N, Matias JR, Defelice A and Zimmerman JA (1993) Low Methionine Ingestion by Rats Extends Life Span. *J Nutr* 123: 269-274.
- Partridge L, Piper MDW and Mair W (2005) Dietary restriction in *Drosophila*. *Mech Ageing Dev* 126:938–950.

- Pastore A, Federici G, Bertini E and Piemonte F (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 333(1):19-39.
- Patel KR, Brown VA, Jones DJ, Britton RG, Hemingway D, Miller AS, West KP, Booth TD, Perloff M, Crowell JA, Brenner DE et al. (2010) Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 70: 7392-7399.
- Paul C, Manero F, Gonin S, Kretz-Remy C, Ljubic-Thibal V, Ducasse C, Diaz-Latoud C and Arrigo A-P (1999) Small lipids as regulators of apoptosis. *Biol Cell* 91:535-565.
- Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, Swindell WR, Kamara D, Minor RK, Perez E et al. (2008) Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending lifespan. *Cell Metab* 8(2): 157–168.
- Pijl H (2012) Longevity. The allostatic load of dietary restriction. *Physiol Behav* 106:51–57.
- Piper MDW and Partridge L (2007) Dietary restriction in *Drosophila*: Delayed aging or experimental artefact? *PLoS Genet* 3(4): e57.
- Piraino S, Boero F, Aeschbach B and Schmid V (1996) Reversing the Life Cycle: Medusae Transforming into Polyps and Cell Transdifferentiation in *Turritopsis nutricula* (Cnidaria, Hydrozoa). *Biol Bull* 190: 302-312.
- Pirola L and Frojdo S (2008) Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life* 60:323-332.
- Pletcher SD, Macdonald SJ, Marguerie R, Certa U, Stearns SC, Goldstein DB and Partridge L (2002) Genome-Wide Transcript Profiles in Aging and Calorically Restricted *Drosophila melanogaster*. *Current Biology* 12:712–723. 2002.
- Prinzinger R (2005) Programmed ageing: the theory of maximal metabolic scope. *EMBO reports* 6:S14-S19.
- Putics A, Végh EM, Csermely P and Soti C (2008) Resveratrol Induces the Heat-Shock Response and Protects Human Cells from Severe Heat Stress. *Antioxid Redox Signal* 10(1):65-75.
- Raposo EF (2010) Efeito dos ácidos graxos n-3 e n-6 na expressão de genes do metabolismo de lipídios e risco de aterosclerose. *Rev. Nutr* 23(5):871-879.
- Rattan SIS (2008) Hormesis in aging. *Ageing Res Rev* 7:63–78.
- Rimm EB, Klatsky A, Grobbee D and Stampfer M (1996) Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits? *BMJ* 312:731-736.
- Rivera L, Morón R, Zarzuelo A and Galisteo M (2009) Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol* 77(6):1053-1063.
- Rocha-González HI, Ambriz-Tututi M and Granados-Soto V (2008) Resveratrol: a natural compound with pharmacological potential in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci Ther* 14(3):234-47.
- Rogina B and Helfand SL (2004) Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *PNAS* 101(45):15998–16003.
- Rogina B, Helfand SL and Frankel S (2002) Longevity regulation by *Drosophila* Rpd3 deacetylase and caloric restriction. *Science* 298:1745.
- Rosenberg MI and Parkhurst SM (2002) *Drosophila* sir2 is required for heterochromatic silencing and by euchromatic hairy/e(spl) bhlh repressors in segmentation and sex determination. *Cell* 109:447–458.
- Roth GS, Ingram DK and Lane MA (2006) Caloric Restriction in Primates and Relevance to Humans. *Ann N Y Acad Sci* 928:305-15
- Schaeffer SW, Bhutkar A, McAllister BF, Matsuda M, Matzkin LM, O'Grady PM, Rohde C, . Valente VLS, Aguade M, Anderson WW, Edwards K et al. (2008) Polyene

- chromosomal maps of 11 *Drosophila* species: the order of genomic scaffolds inferred from genetic and physical maps. *Genetics* 179: 1601-1655.
- Schieke SM and Finkel T (2007) TOR and Aging: Less Is More. *Cell Metab* 5:233-235.
- Schwer B and Verdin E (2008) Conserved Metabolic Regulatory Functions of Sirtuins. *Cell Metab* 7: 104-112.
- Serino M, Luche E, Gres S, Baylac A, Berge M, Cenac C, Waget A, Klopp P, Iacovoni J, Klopp C et al. (2011) Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut* 61:543-553.
- Shay JW and Wright WE (2000) Hayflick, his limit, and cellular ageing. *J Mol Cell Biol*, 1:72-76.
- She QB, Bode AM, Ma WY, Chen NY and Dong Z (2001) Mediated by Extracellular-Signal-regulated Protein Kinases and p38 Kinase. *Cancer Res* 61:1604-1610.
- Shin SC, Kim SH, You H, Kim B, Kim AC, Lee KA, Yoon JH, Ryu JH and Lee WJ (2011) *Drosophila* Microbiome Modulates Host Developmental and Metabolic Homeostasis via Insulin Signaling. *Science* 334: 670-674.
- Shreve SM, Yi SX and Lee RE (2007) Increased dietary cholesterol enhances cold tolerance in *Drosophila melanogaster*. *CryoLetters* 28(1):33-37.
- Simmons DL, Botting RM and Hla T (2004) Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol Rev* 56:387–437.
- Simpson SJ and Raubenheimer D (1995) The geometric analysis of feeding and nutrition: a user's guide. *J Insect Physiol* 41(7): 545-553.
- Sinha K, Chaudhary G and Gupta YK (2002) Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sciences* 71(6):655-665.
- Someya S, Yu W, Hallows WC, Xu J, Vann JM, Leeuwenburgh C, Tanokura M, Denu JM and Prolla TA (2010) Sirt3 Mediates Reduction of Oxidative Damage and Prevention of Age-Related Hearing Loss under Caloric Restriction. *Cell* 143, 802–812.
- Sørensen JG, Kristensen TN, Kristensen KV and Loeschcke V (2007) Gender specific effects of heat induced hormesis in Hsf-deficient *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol* 42:1-9.
- Steensel B, Delrow J and Henikoff S (2001) Chromatin profiling using targeted DNA adenine methyltransferase. *Nat Genet* 27:304-308
- Stoll B (2002) A. n-3 Fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. *Br J Nutr* 87, 193–198
- Sun Y and MacRae TH (2005) The small heat shock proteins and their role in human disease. *FEBS Journal* 272(11): 2613–2627.
- Suh Y, Atzmon G, Cho MO, Hwang D, Liu B, Leahy DJ, Barzilai N and Cohen P (2008) Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:3438–3442.
- Tao D, Lu J, Sun H, Zhao YM, Yuan ZG, Li XX and Huang BQ (2004) Trichostatin A extends the lifespan of *Drosophila melanogaster* by elevating *hsp22* expression. *Acta Biochim Biophys Sin* 36: 618–622.
- Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J and Schoonjans K (2008) Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 7: 678-693.
- Timmers S, Auwerx J and Schrauwen P (2011) Calorie Restriction-like Effects of 30 Days of Resveratrol Supplementation on Energy Metabolism and Metabolic Profile in Obese Humans. *Cell Metabolism* 14: 612–622.
- Tower J (2006) Sex-specific regulation of aging and apoptosis. *Mech Ageing Dev* 127:705–718.
- Tower J and Arbeitman M (2009) The genetics of gender and life span. *Journal of Biology* 8:38.

- Tsuchiya M, Dang N, Kerr EO, Hu D, Steffen KK, Oakes JA, Kennedy BK and Kaeberlein M (2006) Sirtuin-independent effects of nicotinamide on lifespan extension from calorie restriction in yeast. *Aging Cell* 5: 505–514.
- Tullet JM, Hertweck M, An JH, Baker J, Hwang JY, Liu S, Oliveira RP, Baumeister R and Blackwell TK. (2008) Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell* 132:1025–1038.
- Turnbaugh PJ (2009) The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Sci Transl Med* 1(6):6-14.
- Uchida K, Shiraishi M, Naito Y, Torii Y, Nakamura Y and Osawa T (1999) Activation of Stress Signaling Pathways by the End Product of Lipid Peroxidation 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J Biol Chem* 274(4): 2234–2242.
- Udilova N, Jurek D, Marian B, Gille L, Schulte-Hermann R and Nohl H (2003) Induction of lipid peroxidation in biomembranes by dietary oil components. *Food Chem Toxicol* 41(11):1481-1489.
- Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L and Cellerino A (2006) Resveratrol Prolongs Lifespan and Retards the Onset of Age-Related Markers in a Short-Lived Vertebrate. *Current Biology* 16:296–300.
- Vidavalur R, Otani H, Singal PK and Maulik N (2006) Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited. *Exp Clin Cardiol* 11(3):217-225.
- Vijg J and Campisi J (2008) Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature* 454:1065-1071.
- Viswanathan M, Kim SK, Berdichevsky A and Guarente L (2005) A Role for SIR-2.1 Regulation of ER Stress Response Genes in Determining *C. elegans* Life Span. *Dev Cell* 9: 605–615.
- Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, Stopat E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K and Cerami A (1994) Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4766-4770.
- Wadhwa R (2009) Proliferative Functions of *Drosophila* Small Mitochondrial Heat Shock Protein 22 in Human Cells. *J Biol Chem* 285(6): 3833–3839.
- Waterland RA and Rached MT (2006) Developmental establishment of epigenotype: a role for dietary fatty acids?. *Scand J Food Nutr* 50(S2):21-26.
- Weinert BT and Timiras PS (2003) Invited review: theories of ageing. *J Appl Physiol* 95:1706-1716.
- Wenzel U (2006) Nutrition, sirtuins and aging. *Genes Nutr* 1(2): 85-94.
- Wheeler JC, Bieschke ET, Tower J (1995) Muscle-specific expression of *Drosophila* hsp70 in response to aging and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(22):10408–10412.
- Wilson T, Knight TJ, Beitz DC, Lewis DS and Engen RL (1996) Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sci* 59:PL15-21.
- Wing RR, Blair EH, Bononi P, Marcus MD, Watanabe R and Bergman RN (1994) Caloric Restriction Per Se Is a Significant Factor in Improvements in Glycemic Control and Insulin Sensitivity During Weight Loss in Obese NIDDM Patients. *Diabetes care* 17(1): 30-36.
- Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M and Sinclair D (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430: 686-689.
- Woong CH and Huh WK (2011) The implication of Sir2 in replicative aging and senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging* 3(3):319-324.
- Wu JM and Hsieh TC (2011) Resveratrol: a cardioprotective substance. *Ann NY Acad Sci* 1215 :16–21.

- Yu BP and Chung HY (2006) Stress Resistance by Caloric Restriction for Longevity. *Ann N Y Acad Sci* 928:39-47.
- Yusuf N, Nasti TH, Meleth S and Elmets CA (2009) Resveratrol enhances cell-mediated immune response to DMBA through TLR4 and prevents DMBA induced cutaneous carcinogenesis. *Mol Carcinog* 48(8):713-723.
- Zeisel SH (2007) Nutrigenomics and metabolomics will change clinical nutrition and public health practice: insights from studies on dietary requirements for choline. *Am J Clin Nutr* 86(3): 542–548.
- Zhan W, Deng H, Bao X, Lerach S, Girton J, Johansen J and Johansen KM (2006) The JIL-1 histone H3S10 kinase regulates dimethyl H3K9 modifications and heterochromatic spreading in *Drosophila*. *Development* 133:229-235.
- Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, Li J, Bian Z, Liang X, Cai X et al. (2011) Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research* 22:107–126.
- Zhao Y, Sun H, Lu J, Li X, Chen X, Tao D, Huang W and Huang B (2005) Histone acetylation regulates both transcription initiation and elongation of *hsp22* gene in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Comm* 326:811–816.
- Zheng Y, Liu Y, Ge J, Wang X, Liu L, Bu Z and Liu P (2010) Resveratrol protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression. *Mol Vis* 16:1467-1474.
- Zhimulev IF and Koryako DE (2009) Polytene Chromosomes. In: *Encyclopedia of Life Sciences ELS*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

9. CURRICULUM VITAE (LATTES)

Nicole de Melo Leoni

Dados pessoais

Nome Nicole de Melo Leoni
Nascimento 10/12/1984 - Bauneário de Camburiú/SC - Brasil
Carteira de Identidade 6586249 sds - PE - 19/04/2000
CPF 057.352.174-37

Formação acadêmica/titulação

2010 - 2012 Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Modulação dietética utilizando lipídios e resveratrol na senescência e formação do pufe *Hsp22* em *Drosophila melanogaster*
Orientador: Prof. Dr. José Ferreira dos Santos

2003 - 2007 Graduação em Ciências Biológicas / Ciências Ambientais.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Desempenho hemisférico no processamento visual de estímulos hierárquicos em imagens com diferentes graus de dificuldade
Orientador: Prof. Dr. Valdir Luna da Silva

Áreas de atuação

1. Genética
 2. Genética Animal
 3. Nutrigenômica
-

Projetos

Projetos de pesquisa **2010 – Atual** Interação entre resveratrol e restrição calórica na expressão do pufe hsp22 e seus efeitos sobre o envelhecimento em *Drosophila*

Descrição: Os efeitos do resveratrol e da utilização de lipídios em ensaio de restrição dietética (RD) sobre a senescência demográfica, a resposta neuromotora e a expressão do gene *Hsp22* foram analisados em cinco linhagens de *Drosophila melanogaster*

Integrantes: Nicole de Melo Leoni; Prof. Dr. José Ferreira dos Santos (Responsável); Dr. Gilson Luis da Cunha.

Projeto de pesquisa **2011 – Atual** Longevidade e deposição de gordura em células eonocíticas de *Drosophila melanogaster* em resposta a frutose dietética.

Descrição: A proposta deste projeto possibilita averiguar os efeitos de uma dieta rica em frutose em *Drosophila melanogaster*, com o intuito de observar especialmente o acúmulo de gordura nos eonócitos, células homólogas ao hepatócitos de mamíferos. Isso é importante, pois os resultados podem fornecer mais evidências para estabelecer o modelo de *D. melanogaster* nas pesquisas de distúrbios hepáticos, abrindo caminho para estudos metabólicos e teste de novas drogas para o tratamento das causas da esteatose e outras doenças hepáticas humanas, além das diversas disfunções crônicas ocasionadas pelo consumo excessivo desse açúcar.

Integrantes: Jackeline Maria da Silva Prof. Dr. José Ferreira dos Santos (Responsável)
Nicole de Melo Leoni.

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. FERNANDES, S. P. C., FERREIRA, A, ALBUQUERQUE, F. et al.

Coleopteroфаuna Arborícola em Áreas de Caatinga. In: XI Congresso Nordestino de Ecologia. Anais do XI Congresso Nordestino de Ecologia. , 2006.

2. FERNANDES, S. P. C., LEONI, N., FERREIRA, A et al.

Entomofauna Arborícola em Áreas de Caatinga In: XXI Congresso Brasileiro de Entomologia. Anais do XXI Congresso Brasileiro de Entomologia, 2006.

3. FERNANDES, S. P. C., LEMOS, A., LEONI, N., ALMEIDA-CORTEZ, J. et al.

Influência da Luminosidade Sobre a Biometria de *Miconia Prasina* (Sw.) DC. (MELASTOMATACEAE). In: XXIX Reunião Nordestina de Botânica. Anais da XXIX Reunião Nordestina de Botânica, 2006.

4. MONTE, E. S. ; LEONI, N. M. ; OLIVEIRA, D. L. ; SANTOS, J. F. ; FREITAS, N. S. A. ; RIEGER, T. T. "DNA selective signature of period gene in *Drosophila willistoni*". In: "1st Brazilian-German Meeting of Plant Systems Biology and Bioenergy", 2010, Recife. "1st Brazilian-German Meeting of Plant Systems Biology and Bioenergy", 2010.

5. MONTE, E. S.; MOURA, APS; TERTO, A.S.J.; LEONI, N.M.; SANTOS, J.F. ; RIEGER, T. T. Photographic map of polytene chromosomes and inversions of *Drosophila sturtevantii* (Duda, 1939). In: 57 Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia (SP). Anais do 57 Congresso Brasileiro de Genética. Ribeirão Preto: SBG, 2011.

6. LEONI, N.M.; ADRIANNY, R.; MONTE, E.S.; RIEGER, T.T.; CUNHA, G.L.; SANTOS, J.F. Interaction of resveratrol and dietary lipids on ageing in *Drosophila melanogaster*. Anais do 57 Congresso Brasileiro de Genética. Ribeirão Preto: SBG, 2011.

7. SILVA, J.M.; LEONI, N. ; RIEGER, T.T.; CUNHA, G.L.; SANTOS, J.F. Efeitos da alteração lipídica do meio na longevidade, fecundidade e deterioração neuromotora em *Drosophila melanogaster*. In: XIX Encontro de Genética do Nordeste. Juazeiro: Engene, 2012.