

Índice

RESUMO	3
INTRODUÇÃO	5
MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
DESENVOLVIMENTO	9
INFLUÊNCIA GENÉTICA NO ENVELHECIMENTO	9
Genes de envelhecimento	11
Genes de longevidade	14
STRESS OXIDATIVO	17
Teoria da oxidação/radicais livres e a sua evolução.....	19
O papel das ROS e a mitohormesis.....	24
O mTOR E SEUS ANTAGONISTAS.....	27
Complexos mTOR e a sua atividade.....	28
mTOR como regulador da longevidade	30
Rapamicina	35
O PAPEL DAS TELOMERASES	37
Dinâmica dos telómeros e atividade das telomerasas no envelhecimento	39
A telomerase como enzima promotora da longevidade	42
DIETA, RESTRIÇÃO CALÓRICA E SEUS MIMÉTICOS	44
O papel da restrição calórica e da dieta saudável na longevidade.....	46
Sirtuínas e miméticos da RC	58
INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO NO ENVELHECIMENTO	61
CONCLUSÃO	69

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 74

Resumo

O envelhecimento e a longevidade humana são, fenómenos complexos determinados por vias fisiológicas influenciadas por múltiplos fatores - genéticos, comportamentais, dietéticos, ambientais, e estocásticos. O aumento da esperança média de vida nas últimas décadas traduziu-se num envelhecimento da população com um enorme impacto social e económico. O envelhecimento determina modificações no organismo humano que conduzem a uma maior vulnerabilidade e maior incidência de patologias crónicas características do idoso. Os mecanismos fisiopatológicos relacionados com o envelhecimento e abordados neste trabalho, como a informação genética, o *stress* oxidativo, a atividade do eixo mTOR (do inglês *mammalian target of rapamycin*) e a atividade das telomerasas, parecem ser determinantes neste processo, segundo vários estudos de investigação conduzidos em animais. Apesar da investigação em seres humanos também demonstrar esta relação, são necessários mais estudos em vertebrados superiores, como os mamíferos e primatas não-humanos, sobretudo na área do mTOR. É evidente neste trabalho de revisão, a interligação dos mecanismos determinantes do envelhecimento e da longevidade e as possíveis intervenções preventivas, incluindo a dieta, a restrição calórica e os seus miméticos e o exercício físico. A qualidade da dieta e o exercício físico têm um papel consensual na prevenção do desenvolvimento de patologias características do envelhecimento e na promoção de um envelhecimento com qualidade de vida, com independência funcional e livre de comorbilidades. Têm sido registados alguns avanços sobre a influência positiva da restrição calórica (RC), sobretudo quando associada a uma dieta equilibrada, no atraso do envelhecimento. Neste estudo podemos concluir que a melhor forma de promover um envelhecimento saudável e um aumento da longevidade, é a conjugação de várias intervenções terapêuticas, incluindo uma dieta de qualidade, prática regular de exercício físico

adequado ao indivíduo e à idade e possivelmente algum nível de RC. De referir ainda, o importante papel que os biomarcadores de envelhecimento poderão vir a ter no futuro para monitorizar a aplicação destas e outras terapias/intervenções.

Introdução

Envelhecimento na atualidade e evolução epidemiológica

O conceito de envelhecimento pode ser definido como um processo dinâmico e progressivo, caracterizado por alterações funcionais, morfológicas e psicológicas. Com a melhoria das condições de vida e dos cuidados de saúde, a esperança média de vida (48 anos em 1950 e a projeção de 76 anos em 2050) aumentou muito nas últimas décadas, o que se refletiu num aumento dramático do número de pessoas com idade superior a 60 anos. Atualmente cerca de 800 milhões de pessoas tem 60 ou mais anos, o que representa 11% da população mundial. Espera-se que em 2050, esse número aumente para mais de 2 mil milhões de pessoas, o que corresponde a 22% da população mundial (1). No estudo de 2009 do Instituto Nacional de Estatística (INE), o número de idosos (entendendo a Organização Mundial da Saúde como idoso as pessoas com mais de 65 anos de idade em países desenvolvidos e com mais de 60 anos de idade em países em desenvolvimento) em Portugal representava aproximadamente 17,9 % da população nacional, e as projeções para 2048 em Portugal, indicam que esta população atingirá 31,3 %. Números estes preocupantes no que diz respeito ao envelhecimento da população portuguesa e políticas de saúde a implementar.

Apesar dos avanços tecnológicos, da melhoria dos cuidados de saúde e da nutrição permitirem um aumento da esperança média de vida, isso não significa que esse aumento se traduza também num maior número de anos com saúde e qualidade de vida (2). Assim, o objetivo é um envelhecimento ativo, que a Organização Mundial de Saúde (OMS) define como um processo de otimização de oportunidade para a saúde, participação e segurança, no sentido de aumentar a qualidade de vida durante o envelhecimento, com a preocupação do seu enquadramento na cultura e no género em causa (3). As modificações que o envelhecimento

determina a nível do organismo humano, conduzem a uma perda da capacidade de adaptação ao meio ambiente, ocasionando mais vulnerabilidade e maior incidência de processos patológicos que se traduzem em patologia crónica. Esta evolução coloca novos desafios à política de saúde instituída em cada país e à sociedade em geral, pelo enorme impacto social e económico que daí advém. Por exemplo, a estimativa de gastos atribuível à sarcopenia (resultado do envelhecimento) nos E.U.A em 2000 foi de 18,5 bilhões de dólares, o que corresponde a 1,5 % do montante total das despesas na saúde (4).

A investigação que tem sido feita no sentido da promoção da longevidade com qualidade de vida, independência funcional e sem comorbilidades, é fundamental para que se encontrem soluções para este novo cenário da sociedade atual. Com as descobertas dos últimos anos sobre o complexo processo de envelhecimento foram implementadas algumas alterações na assistência médica e social a nível mundial que permitiram um aumento na esperança média de vida, tanto nos países desenvolvidos como nos países em vias de desenvolvimento. No entanto, ainda existe uma lacuna entre o que se sabe e o que se coloca em prática. Por isso, é fundamental que a compreensão dos processos biológicos e as intervenções na medicina clínica evoluam lado a lado com a cooperação dos organismos económicos, políticos e sociais (5).

Ainda há muito a fazer para implementar nas populações, um envelhecimento saudável e ativo. A nossa capacidade para organizar a sociedade, mudar o seu comportamento e alterar os fatores ambientais ainda permanece limitada, daí que consciencializar para os benefícios da modificação dos hábitos de vida seja de extrema importância. Deste modo, procura-se alertar a sociedade em geral para as vantagens de um adequado processo de envelhecimento que se vai refletir na melhoria da qualidade de vida dos idosos, bem como dos cuidadores e terá um enorme impacto económico a nível dos cuidados de saúde, com uma grande poupança para a sociedade.

O objetivo deste trabalho é abordar alguns dos mais importantes processos e fatores determinantes do envelhecimento, nomeadamente a genética, o *stress* oxidativo, o mTOR (do inglês *mammalian target of rapamycin*) e a atividade das telomerasas. Por outro lado, serão explorados os fatores e as medidas que permitem aumentar a longevidade e, acima de tudo, permitem um envelhecimento mais saudável e ativo com maior qualidade de vida. O exercício físico, a restrição calórica na dieta, bem como a atividade das sirtuínas são algumas das áreas em que se pode atuar a nível do envelhecimento. Ao longo deste estudo de revisão, procurar-se-á relacionar os fatores e medidas que aumentam a longevidade e os processos determinantes do envelhecimento. Sempre que possível, será dada maior relevância aos estudos realizados em humanos, uma vez que muitos dos estudos realizados em modelos animais, nem sempre têm uma correspondência quando replicados em humanos.

Materiais e Métodos

Para a realização deste trabalho de revisão, comecei por consultar um *summaries*, o *clinical evidence*, com o intuito de verificar que até ao momento não existe nenhuma revisão sistemática sobre o meu tema. A pesquisa e consulta de artigos científicos da *medline* foram realizadas com recurso ao *Pubmed*, da U.S. National Library of Medicine, entre outubro de 2014 e dezembro de 2014. Na pesquisa bibliográfica foram utilizados os termos *mesh* “aging”, “longevity”, “oxidative stress”, “genes”, “telomerase”, “TOR Serine-Threonine Kinase”, “inflammation”, “caloric restriction”, “diet”, “sirtuins” and “exercise” em diferentes combinações. Foram analisados sobretudo artigos dos últimos 10 anos, apesar de algumas exceções. A única limitação colocada foi a língua, apenas artigos em inglês e português.

Desenvolvimento

Influência genética no envelhecimento

O processo biológico do envelhecimento, também conhecido por senescência, resulta da acumulação de alterações, ao longo do tempo, na organização dos componentes celulares e moleculares com a respetiva acumulação de danos. O controlo deste processo é assegurado por uma variedade enorme de fatores genéticos e fatores não genéticos. A influência da componente genética no controlo dessas alterações e consequentemente no controlo da longevidade é conhecido desde o início da década passada (6), podendo ser responsável por uma variação de aproximadamente 25% na esperança média de vida (7), contribuição essa que se acredita ser mínima antes dos 65 anos e mais relevante a partir dos 85 anos (8). Neste contexto, é necessário relembrar que o padrão genético de um organismo determina não só o fenótipo individual, como as patologias hereditárias e as patologias mais predominantes do envelhecimento, mas também modula a resposta de cada indivíduo às agressões ambientais e às terapêuticas farmacológicas. A coexistência de longevidade quando comparamos gémeos verdadeiros numa taxa superior à dos gémeos falsos (6) e a maior esperança média de vida da descendência dos indivíduos mais idosos (9) são alguns dos argumentos que suportam a dependência dos fatores genéticos no processo de envelhecimento. O estudo de famílias com muitos elementos a atingirem uma idade avançada, constituem um ótimo suporte para o estudo da componente familiar na longevidade. É importante, no entanto, ter em atenção que a longevidade de uma determinada população pode estar relacionada com a exposição a determinados fatores ambientais e por isso, os estudos devem ser replicados em várias populações com diferentes localizações geográficas de modo a evitar-se este viés. Apesar de tudo, descobrir quais os genes envolvidos na longevidade, isto é, os genes protetores das

doenças relacionadas com a idade e que atrasam o progresso do processo de envelhecimento, ainda é um dos grandes desafios da atualidade. Primeiro, pela dificuldade em se recrutar centenários para um estudo e segundo, as técnicas usadas para analisar um grande número de alelos, uma vez que são desconhecidos os genes envolvidos, estão associadas a uma percentagem significativa de erro (10). Apesar disso, é necessário priorizar a investigação da variabilidade relativa ao aumento da sobrevivência em idades avançadas, em genes envolvidos nos processos fisiológicos básicos.

Os genes com influência no envelhecimento humano podem ser classificados em genes de envelhecimento ou genes de longevidade consoante a sua influência na evolução do processo de envelhecimento. Os genes de envelhecimento são os genes que de alguma forma podem acelerar o processo de envelhecimento. Estes genes podem diretamente contribuir no organismo humano para o aparecimento de patologias ou atuar indiretamente, a nível celular ou através dos sistemas integradores que modulam (sistema imunológico, endócrino, entre outros). O envelhecimento está associado a um aumento da vulnerabilidade e da incidência de processos patológicos, daí que alguns dos genes com influência na longevidade, sejam os mesmos que estão envolvidos em patologias como Doença de Alzheimer, Patologia cardiovascular, Disfunção hepática e a Diabetes tipo 2. É muito provável que em países com um sistema de saúde otimizado e com uma esperança média de vida da população elevada, uma grande percentagem da mortalidade seja atribuída a patologia cardiovascular e por isso os genes responsáveis por uma diminuição da progressão da aterosclerose tenham um papel preponderante na longevidade. Assim, os genes de longevidade deverão atrasar o processo de envelhecimento ao diminuir a senescência celular através de mecanismos de reparação ou aumentando a resistência aos fatores agressores do organismo.

Genes de envelhecimento

Gene WRN

A mutação, com perda de função, do gene WRN é responsável pela Síndrome Hereditária de Werner. Esta síndrome apresenta um quadro clínico semelhante ao envelhecimento prematuro, nomeadamente o aparecimento precoce de rugas, cabelo grisalho, cataratas, diabetes e osteoporose e maior prevalência de cancro. É um bom exemplo de patologia que demonstra a importância de correlacionar a idade do doente com as observações do exame físico.

O gene WRN é responsável pela formação de um elemento da família *RecQ* das helicases, o que sugere a influência do metabolismo do ADN no processo de envelhecimento. A caracterização inicial desta síndrome remonta há mais de um século e continua a ser um ótimo modelo na investigação da influência genética no envelhecimento. Vários estudos sugerem que ligeiras alterações na função do gene WRN, provocadas por polimorfismos, podem ter um papel no envelhecimento da população em geral (11). Este gene pode ter um papel complexo na regulação dos eventos celulares do envelhecimento e na predisposição para determinados carcinomas nos humanos (12). No entanto, pela baixa reprodutibilidade de alguns estudos nas mesmas ou em diferentes populações e pela dificuldade em se perceber quais os mecanismos moleculares responsáveis pelo quadro clínico do Síndrome de Werner, ainda não há um consenso sobre a sua influência no envelhecimento da população geral (11).

Gene LMNA (Progeria ou Síndrome de Hutchinson–Gilford)

Em condições normais, as proteínas lâmina A e C, codificadas pelo gene LMNA, formam em conjunto com a lâmina B, uma rede filamentosa chamada lâmina nuclear. Esta rede filamentosa confere estabilidade à membrana nuclear interna, sendo fundamental na manutenção da integridade nuclear durante a interfase. Tem também uma importante função

de suporte a algumas proteínas nucleares envolvidas na transcrição e replicação do DNA. As mutações no gene LMNA podem resultar em pelo menos 13 diferentes síndromes, nos quais se inclui a Progeria ou Síndrome de Hutchinson-Gilford. A clínica deste síndrome assemelha-se ao envelhecimento normal que ocorre muito prematuramente (no primeiro ano de vida), sendo a esperança média de vida aproximadamente 13 anos (geralmente a morte ocorre por complicações cardiovasculares). A causa genética mais comum é uma mutação pontual no gene LMNA que resulta na síntese de uma forma truncada da proteína lâmina A, chamada progerina (13). Há evidências, em vários estudos, de produção e acumulação de pequenas quantidades de progerina nas células humanas normais, bem como um aumento desse fenómeno com o avançar da idade. Num estudo americano com o objetivo de detetar variantes da LMNA que produzem menores quantidades de progerina promovendo por isso uma maior longevidade, os resultados foram positivos (14). Contudo, a não reprodutibilidade de algumas das amostras em estudo, possivelmente causada pela sua heterogeneidade, exige a realização de mais ensaios com amostras independentes com o objetivo de aumentar a consistência destes resultados.

Alguns estudos sugerem ainda uma relação entre a produção de progerina e algumas características do processo de envelhecimento, nomeadamente a lesão do DNA e o encurtamento do telómeros. Sabe-se também que a expressão da telomerase suprime estes acontecimentos, de acordo com estudos realizados em fibroblastos (13). Apesar destas semelhanças com o processo de envelhecimento, os agentes causadores destas lesões podem não ser os mesmos e por isso é importante saber-se o mecanismo exato responsável pela lesão dos telómeros, de modo a se estabelecer a relação desta síndrome com o processo inerente ao envelhecimento normal.

Gene APOE

O gene APOE conduz à síntese de proteínas designadas apolipoproteínas E. Estas proteínas combinam-se com lípidos no organismo humano, para formar lipoproteínas. As lipoproteínas ligam-se ao colesterol e outros lípidos, transportando-os através da corrente sanguínea. As três isoformas major da classe (APOE2, APOE3 e APOE4) são um componente major das VLDL (do inglês *Very-low-density Lipoprotein*) e são codificadas por diferentes alelos, por isso interagem de forma diferente com os recetores específicos das lipoproteínas. As VLDL removem o excesso de colesterol do sangue e transportam-no para o fígado para processamento. A manutenção de níveis normais de colesterol é essencial para a prevenção de doenças cardiovasculares. Em vários estudos, o gene da apolipoproteína E tem sido relacionada com a suscetibilidade a doenças relacionadas com a idade, nomeadamente a Doença de Alzheimer e a Doença Arterial Coronária, sendo o único gene com variantes comuns frequentemente associadas à longevidade (11). A maior parte dos estudos realizados conclui que a APOE4 aumenta a suscetibilidade a e à agressão ambiental, ao contrário da APOE2 que tem um papel protetor e tem maior prevalência que a APOE4 em pessoas de idade avançada (11). Uma das últimas investigações realizada no Canadá confirmou a relação da isoforma APOE4 com uma mortalidade precoce (15). Os portadores de cada uma das isoformas apresentam um risco de mortalidade diferente, sendo esse risco maior nos portadores de APOE4 (10 a 14% superior ao da APOE3) e menor nos portadores da APOE2 (12% inferior ao da APOE3) (11). Apesar de controverso, há maior consenso em considerar o gene APOE um "gene do envelhecimento" em detrimento de "gene da longevidade". Vários genes foram investigados, relativamente a sua influência no processo de envelhecimento, em diferentes populações e o gene APOE é um dos poucos que tem apresentado resultados consistentes.

Genes de longevidade

Eixo da Hormona do Crescimento / *Insulin-like Growth Factor-1*

O eixo da hormona de crescimento, um dos mais estudados, foi o primeiro mecanismo a ser descoberto com influência na longevidade animal. Este eixo, com um papel importante na promoção da proliferação celular e na inibição da apoptose, está envolvido na cascata de fosforilação (PI3K/AKT/PDK do inglês *phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/pyruvate dehydrogenase kinase*) que regula a translocação nuclear e a atividade da proteína FOXO. Vários estudos, em modelos animais e alguns em humanos, demonstram que as mutações que diminuem a atividade do eixo insulina/IGF-1 estão associadas a aumento da esperança de vida. Os polimorfismos da FOXO3A (do inglês *Forkhead Box O3*) representam uma das mais consistentes associações entre os fatores genéticos e a longevidade humana, tendo sido reproduzida em várias populações (16).

- *Insuline-like Growth Fator 1* (IGF1), Hormona de Crescimento 1 (GH1 do inglês *growth hormone 1*), Recetor da IGF1 (IGF1R do inglês *insuline-like growth fator 1 recetor*)

Num estudo de 2005 (17) envolvendo 1576 habitantes (83-105 anos) de Leiden na Holanda, foram avaliadas variantes de componentes IGF1, GH1, IGF1R do eixo IIS (do inglês *Insuline / IGF-1 signalling*). Nas mulheres, todas as variantes provocaram uma redução da atividade do eixo e foi demonstrado que os portadores das três variantes (GH1 SNP, IGF CA repeat, IRS1 SNP) têm um menor risco de mortalidade. Conclui-se ainda que, nas mulheres, a variante do componente GH1 está fortemente associada a um aumento da longevidade. Numa outra investigação anterior foi demonstrado que a presença de um alelo específico de IGF1R está associada a baixos níveis de IGF1 no plasma e a uma maior prevalência em indivíduos mais idosos (18).

- Gene AKT

Enquanto o aumento da atividade da AKT está associada à senescência celular, a inibição da sua atividade está associada ao aumento da esperança de vida de células humanas em cultura. Existem vários estudos com variantes da AKT que demonstram uma relação com a longevidade humana, estando aumentadas em populações com uma esperança média de vida elevada. Outras variantes encontravam-se pouco representadas nestas populações, possivelmente por estarem ligadas a mortes por patologia cardiovascular ou outro tipo de patologia (16).

- Gene FOXO

Os fatores de transcrição FOXO medeiam processos celulares com influência na expressão de genes que regulam a apoptose, a proliferação, a diferenciação celular. Estes fatores podem ser repensáveis pela regulação em diferentes genes e em diferentes tipos celulares da morte programada de células anormais ou danificadas, em detrimento da sobrevivência de outras, influenciando a longevidade do organismo (16).

Um dos estudos mais importantes teve como objetivo avaliar a contribuição genética da etnia chinesa HAN, indivíduos centenários e jovens, na longevidade. Foi demonstrada a associação de alguns SNPs (do inglês *single nucleotide polymorphism*) da FOXO1A com a longevidade no sexo feminino, tendo sido replicado este resultado noutras populações com localização geográfica da original. Três SNPs da FOXO3A estão também associados a um aumento da esperança de vida em ambos os sexos (19).

Todos estes estudos realizados com variantes de vários componentes do eixo da hormona de crescimento sugerem fortemente a influência deste eixo no processo de envelhecimento e ao mesmo tempo o contributo da componente genética na longevidade das

populações, uma vez que os genes que influenciam a longevidade são os genes cujas variantes aumentam a esperança média de vida.

Gene SIRT3

As sirtuinas humanas são uma família/classe de proteínas desacetilase dependentes de NAD⁺, envolvidas em mecanismos fisiológicos básicos e com provável influência no metabolismo energético, manutenção do genoma e envelhecimento. O gene SIRT3, codificador da proteína mitocondrial SIRT3 (do inglês *sirtuin protein deacetylase 3*), é homólogo do gene SIR2 na levedura e na *C. Elegans* cujos estudos evidenciaram uma influência determinante no tempo de vida destas espécies. Além desta influência do seu homólogo noutras espécies animais, a sua localização é outro fator que o coloca no grupo dos genes com uma provável associação com a longevidade. Este gene está localizado na região cromossômica 11p15.5 onde se encontram mais quatro genes (gene da tirosina hidroxilase (TH), gene da proinsulina (INS), gene da *insulina-like growth factor 2* (IGF2), gene HRAS1) potencialmente envolvidos na longevidade. Vários estudos de associação genética, tendo como população-alvo indivíduos com mais de 100 anos, demonstraram uma relação entre polimorfismos desses 4 genes e a longevidade. Partindo destas informações foram realizadas pesquisas com o intuito de identificar os polimorfismos do gene SIRT3 com uma provável influência na longevidade humana (20). Dos polimorfismos detetados, alguns evidenciaram uma associação positiva com a longevidade, nomeadamente o SNP rs11555236, rs4980329 e um VNTR no intrão 5. No entanto, alguns estudos, quando replicados noutras populações, não suportaram a associação. Os estudos com resultados positivos recorreram a amostras de indivíduos centenários ou de idade avançada em algumas populações italianas, nomeadamente, e uma germânica. Foi também patente nesses ensaios uma relevância diferente dos resultados consoante o género da amostra, o que sugere um papel seletivo dos

elementos genéticos da SIRT3 na longevidade. Apesar de algumas limitações no estudo de Troviso, como a análise de apenas um tipo de tecido e a negligência ou não consideração de outros fatores genéticos ou epigenéticos, o polimorfismo rs11555236 da SIRT3 é o que apresenta maior consistência no seu papel como marcador funcional e genético com impacto na longevidade humana (21, 22).

Os genes referidos, com provável influência no envelhecimento, estão envolvidos em diferentes mecanismos reguladores da resposta ao *stress* (agressores externos e internos), como o metabolismo mitocondrial, o metabolismo do ADN, a estabilidade da membrana celular, entre outros. Esta variedade de processos celulares sugere a complexidade relacionada com o processo de envelhecimento e que provavelmente a longevidade está relacionada com uma maior capacidade de integração e de controlo de múltiplos sistemas funcionais sobretudo quando o organismo é exposto ao *stress* provocado por fatores externos e internos. Provavelmente o processo de envelhecimento está relacionado com um menor controlo dessa integração, resultando numa menor capacidade de adaptação ao *stress* e num desequilíbrio da homeostasia com conseqüente aumento da fragilidade e vulnerabilidade do organismo.

Stress oxidativo

O *stress* oxidativo, como causa e conseqüência de reações celulares que caracterizam o processo de envelhecimento, é um dos fenómenos biológicos mais estudados nesta área. No entanto, ainda não está bem esclarecido o seu papel no envelhecimento saudável e na longevidade, uma vez que existem alguns resultados contraditórios relativamente à relação do *stress* oxidativo com a idade.

Podemos definir o *stress* oxidativo como uma condição biológica em que existe um desequilíbrio com predomínio da formação de espécies reativas do oxigênio (ROS do inglês *Reactive Oxygen Species*) em relação aos mecanismos responsáveis pela remoção ou reparação dos danos por elas causadas, tendo como consequência a lesão oxidativa das estruturas celulares e de moléculas envolvidas na sinalização celular. O *stress* oxidativo é assim uma das principais causas de toxicidade, devido interação das ROS com macromoléculas e interferência nas vias de sinalização celular (23). As ROS são moléculas químicas derivadas do oxigênio, tanto radicais como não- radicais, algumas delas altamente reativas, que resultam da redução parcial da molécula de oxigênio por influência de fatores externos/ambientais como a radiação ultravioleta, o fumo do cigarro ou de atividades enzimáticas endógenas como a inflamação ou a fosforilação oxidativa na mitocôndria. Concomitantemente, o *stress* oxidativo está envolvido na regulação de vias de sinalização, incluindo a atividade de proteínas cinases, fosfatases e a expressão gênica através da modulação dos fatores de transcrição. A lesão induzida pelas ROS depende da extensão e da especificidade da sua reatividade, uma vez que o radical pode não ser suficientemente instável para reagir com uma molécula. Em concentrações adequadas as ROS poderão ter efeitos celulares benéficos que envolvem mecanismos fisiológicos de resposta à agressão, por exemplo na defesa contra agentes infecciosos (23).

Há algum tempo que é reconhecida a importância de concentrações moderadas de ROS, como segundos mensageiros, na sinalização celular, no entanto, como referido, em excesso são fatores determinantes de toxicidade nas células e organismo. Os efeitos lesivos resultam da oxidação direta de macromoléculas intra e extra celulares e da alteração do estado redox dos fatores envolvidos na transdução de sinal, condicionando a hipo ou hiperfunção das vias de sinalização envolvidas (23).

Com o envelhecimento perde-se a eficácia dos mecanismos reguladores das defesas antioxidantes, resultando na lesão celular e tecidual e diminuição da resistência ao *stress* oxidativo (24). Alguns estudos visam compreender o papel do *stress* oxidativo no envelhecimento, nomeadamente, baseados na Teoria da oxidação/radicais livres e a sua evolução ou nos fundamentos da *mitohormesis*.

Teoria da oxidação/radicais livres e a sua evolução

Segundo esta teoria o declínio das funções fisiológicas resulta da lesão causada, a nível celular, pela acumulação de lesões de oxidação causadas por espécies reativas de oxigénio, como H_2O_2 , O_2^- e OH^- . (Denham Harman, 1956). Os princípios básicos desta teoria são:

- Os radicais livres podem ser gerados pelas células organismos aeróbios a partir da molécula de oxigénio
- A mitocôndria é a principal fonte de ROS
- As ROS são gatilho para os processos patológicos que resultam em alterações estruturais nas proteínas, lípidos e ADN
- A mitocôndria é o elo de ligação entre a lesão oxidativa causada pela acumulação de ROS e as alterações funcionais associadas ao envelhecimento
- As UCPs (do inglês *Uncoupling Proteins*) têm um papel fundamental na proteção contra as ROS

(25)

A atividade metabólica do organismo necessita de oxigénio e na sua utilização formam-se algumas espécies reativas de oxigénio. O principal processo endógeno responsável

pela formação de ROS é a via metabólica da fosforilação oxidativa, na qual ocorre transferência de elétrons dos doadores para os aceptores de elétrons, como o oxigênio molecular, numa reação de oxirredução. A formação de ROS pode resultar de diferentes processos, sendo o principal a transferência de elétrons para o oxigênio molecular ao nível da cadeia respiratória mitocondrial. O anião superóxido (O_2^-), o radical hidroxilo ($\cdot OH$) e o radical peróxido ($HOO\cdot$) são algumas da ROS formadas por este processo (24). Algumas resultam da reação entre os radicais com centro de carbono e a molécula de oxigênio, de que são exemplo o radical peroxilo ($ROO\cdot$) e o hidroperóxido orgânico ($ROOH$) (25).

A mitocôndria, como organelo da respiração celular, utiliza aproximadamente 90% do oxigênio celular (restantes 10% em reações extramitocondriais) e possui enzimas envolvidas na transferência de elétrons. Uma pequena percentagem desse consumo de oxigênio (aproximadamente 2%) resulta na acumulação de anião superóxido (O_2^-), em vez da sua redução para água (26). O anião superóxido pode ser oxidado para oxigênio através de enzimas antioxidantes ou noutras ROS. Além da cadeia respiratória na membrana interna mitocondrial, existem outras fontes geradores como o sistema monoaminoxidase, a proteína P66 Shc mitocondrial ou reações nas quais estão envolvidas enzimas como as flavina oxidases peroxissomais, a alfa-cetoglutarato desidrogenase, a xantina oxidase no reticulo endoplasmático, o citocromo P450, entre outros (23).

As alterações estruturais causadas pelo *stress* oxidativo nas biomoléculas (proteínas, lípidos ou DNA) acumulam-se com o avançar da idade, provocando alterações em vários processos biológicos por todo o organismo. A reação das ROS com as proteínas (algumas são mais vulneráveis que outras) resulta frequentemente na oxidação dos grupos amino com a criação de novas ligações inter e intramoleculares que condicionam alterações estruturais e funcionais dessas proteínas, dificultando muitas vezes a sua degradação. Em condições normais, as proteínas danificadas são reconhecidas pelo sistema de degradação e são digeridas

pelos proteossomas. A incapacidade destes complexos para digerirem as proteínas lesadas pela oxidação pode levar à sua acumulação em agregados que provocam alterações profundas na atividade celular. Relativamente à interação com os lípidos, a consequência habitual é a alteração da fluidez das membranas celulares como resultado da peroxidação de ácidos gordos insaturados (muito sensíveis à oxidação) que se encontram em grande quantidade nestas estruturas. Estas reações, designadas de peroxidação lipídica, resultam na acumulação de aldeídos, sendo o malondialdeído (MDA) o mais frequente e com elevada reatividade para as macromoléculas. A lesão oxidativa da molécula de ADN provoca alterações nas bases, rotura da cadeia e oxidação dos resíduos de desoxirribose do ADN, resultando na inibição da proliferação celular por ação da p53 no ponto de controlo, ao reconhecer a lesão molecular. A p53 tem assim um papel importante na diminuição da probabilidade de alterações genéticas, ao induzir a reparação celular e ao diminuir os níveis de ROS intracelulares (27). Numa perspetiva mais abrangente, estas lesões provocadas pelas ROS nas macromoléculas do organismo humano podem ser importantes fatores na origem de doenças como a Diabetes, o Cancro, a Aterosclerose ou a Doença de Alzheimer, quando os mecanismos de defesa e de controlo falham (25).

Mais tarde foi introduzido um novo conceito na teoria dos radicais livres que aborda a fragilidade do ADN mitocondrial para a acumulação de lesões, funcionando assim como elo de ligação entre a lesão oxidativa e as alterações funcionais, associadas ao processo de envelhecimento nos seres humanos. Segundo evidências de alguns estudos nesta área, a função mitocondrial, nomeadamente das enzimas respiratórias, diminui e a prevalência de mutações no ADN mitocondrial aumenta com o envelhecimento. Esta evolução provoca não só uma diminuição na síntese de ATP mas também um aumento do escape de eletrões na cadeia respiratória, resultando num aumento da produção de ROS (28). O défice de histonas, intrões e de mecanismos de reparação do ADN são características do ADN mitocondrial que

contribuem para a sua fragilidade e para a formação de lesões mais persistentes e mais extensas (25). O ADN mitocondrial codifica polipeptídeos envolvidos na fosforilação oxidativa e no transporte de eletrões, por isso, é normal que a lesão oxidativa esteja associada a um défice de ATP (29). O declínio da função mitocondrial afeta com maior gravidade os tecidos que apresentam maior dependência energética do ATP, como o tecido cerebral (70% do seu ATP usado na bomba sódio/potássio) e muscular. Em estudos animais ficou demonstrado que o aumento das ROS nas células musculares estimula as vias de sinalização (sensíveis ao estado redox) responsáveis pela indução da expressão de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e a catalase. Por outro lado, existem estudos a demonstrar a acumulação de moléculas oxidantes que contribuem para a lesão oxidativa e consequente alteração da homeostasia (25). Perante estes dois factos, a acumulação de lesão oxidativa como resultado da reação com as ROS pode ser explicada pela diminuição da capacidade de resposta do organismo ao *stress* oxidativo. A redução da atividade da glutathiona peroxidase, da catalase e da superóxido dismutase com a idade, evidenciada num estudo em fibroblastos da pele, pode explicar em parte o desequilíbrio entre a produção de ROS e sua remoção a nível celular. Esta nova perspetiva, abrangendo as lesões provocadas pelas ROS na própria mitocôndria, é conhecida como Teoria Mitocondrial do Radicais Livres e representa uma extensão da Teoria da Oxidação/Radicais Livres. Com a redução da eficácia dos mecanismos de resposta ao *stress* oxidativo, o organismo torna-se mais suscetível às ROS. A produção de ROS nas mitocôndrias e o efeito lesivo das ROS nestes organelos, em particular no ADN mitocondrial induz alterações nos polipeptídeos dos complexos respiratórios codificados por este ADN. Como consequência desta disfunção, há uma diminuição da atividade de transferência de eletrões e da atividade antioxidante, o que conduz a um aumento da produção de ROS e por isso estabelece-se um ciclo vicioso de *stress* oxidativo e declínio energético responsável pelo envelhecimento (23). De referir também que a maior suscetibilidade do

ADN em relação ao ADN nuclear deve-se também, em boa parte, à sua proximidade da cadeia respiratória, tornando-o um alvo fácil (30).

Relativamente às proteínas de desacoplamento (UCP, do inglês *Uncoupling Proteins*) referidas num dos princípios da Teoria dos Radicais Livres, existem fortes evidências do seu papel fundamental na prevenção dos efeitos lesivos das ROS. As UCPs são membros de uma família de proteínas mitocondriais responsáveis pelo transporte transmembranar de aniões e encontram-se na membrana mitocondrial interna. O sistema de fosforilação oxidativo gera um gradiente eletroquímico transmembranar na mitocôndria ao promover o transporte de prótons para o espaço intermembranar. Esse gradiente de prótons cria uma força motriz prótonica (FMP) que é utilizada na síntese de ATP, através do fluxo de prótons para a matriz mitocondrial por intermédio da ATP sintetase. Quanto maior a FMP através da membrana interna da mitocôndria, maior a capacidade dos doadores de eletrões para reduzir o oxigénio a anião Superóxido O_2^- . As UCPs respondem à produção de algumas ROS, nomeadamente o O_2^- , por permitirem a dissipação moderada desse gradiente (diminuição da FMP). Esta dissipação resulta na diminuição da produção de O_2^- na cadeia transportadora de eletrões e consequentemente da lesão causada por este e outras ROS, a custo de uma ligeira redução da eficiência da fosforilação oxidativa. A favor deste mecanismo foi também provado que a inibição das UCPs resulta num aumento do potencial de membrana, da produção de ROS e do *stress* oxidativo (31). Algumas descobertas sugerem ainda que as UCPs das mitocôndrias regulam o nível de ROS num tecido específico do organismo, ou mesmo por todo o organismo, através da redução da sua produção na mitocôndria, com o objetivo de proteger a células, os tecidos e o organismo do *stress* oxidativo (25).

O papel das ROS e a *mitohormesis*

Tendo em conta o efeito nocivo das ROS, resultantes do metabolismo aeróbio, demonstrado em vários estudos (32, 33), pensou-se na diminuição das ROS como um boa abordagem terapêutica no sentido de promover um envelhecimento saudável e um aumento da longevidade. Contudo, segundo alguns estudos relativamente recentes em organismos modelos, verificou-se que o estímulo do *stress* oxidativo pode ser benéfico para a promoção da longevidade. Por exemplo, a exposição da *C. Elegans* a condições que provocam um aumento do metabolismo energético e por isso um aumento da produção de ROS, induziu um aumento do *stress* oxidativo suficiente para promover a longevidade. Esta relação foi evidente com a redução da disponibilidade da glucose na *C. Elegans* através do inibidor da glicólise, induzindo um aumento da respiração e por isso um aumento do consumo de oxigénio (34). Este estado provocou um aumento da produção de ROS e conseqüente aumento do consumo da atividade antioxidante, resultando no aumento da longevidade deste organismo. Num outro estudo com ratinhos, a hipotermia foi associada a um aumento da longevidade, apesar da diminuição das taxas respiratórias e do aumento da produção de ROS (35). A ausência da enzima antioxidante mitocondrial, NADH cinase, com um papel crucial na defesa antioxidante do fungo filamentosso *Podospora Anserina*, favoreceu também a longevidade da espécie (36). O uso de antioxidantes para combater o *stress* oxidativo é outro exemplo que não demonstrou resultados benéficos para a saúde e em alguns casos foram mesmo associados a um aumento da incidência de patologias com efeitos adversos no envelhecimento. Um estudo realizado em humanos adultos de ambos os géneros, revelou um aumento da incidência de melanoma nas mulheres que tomaram diariamente, durante aproximadamente 7 anos, uma cápsula contendo a combinação de vários antioxidantes (vitamina C, vitamina E, β -caroteno, selénio, zinco) (37-39). Por um lado, não há dúvidas sobre o efeito lesivo e tóxico das ROS sobre o organismo, bem como o seu papel preponderante no processo de

envelhecimento. Por outro lado, alguns ensaios clínicos registaram uma relação positiva entre o aumento do *stress* oxidativo e a longevidade dos organismos (fungos, leveduras, camundongos) em estudo. Estes resultados aparentemente contraditórios, relativamente ao papel das ROS no envelhecimento, podem ser explicados com base no conceito de *hormesis*. Segundo este conceito, baixas doses de ROS podem ser fundamentais para o organismo criar mecanismos de resistência ao *stress* oxidativo e assim aumentar a esperança de vida mas a acumulação e exposição a doses demasiado elevadas de ROS é prejudicial para o organismo, promovendo a mortalidade precoce. Este fenómeno, conhecido como *hormesis* mitocondrial ou *mitohormesis*, tem sido atribuído ao papel ativo das ROS como moléculas de sinalização responsáveis pela comunicação entre a mitocôndria e outros compartimentos celulares, em resposta a estímulos fisiológicos e patofisiológicos. Várias descobertas recentes, indicam que níveis adequados de ROS são necessários para o normal funcionamento de vias de sinalização intracelular importantes para a promoção de um metabolismo saudável e de longevidade. O papel fundamental das ROS como moléculas de sinalização, nomeadamente de peróxido de hidrogénio produzido principalmente pelo complexo III, tem sido particularmente evidente em resposta à hipoxia (40-44). O aumento da produção de H₂O₂ durante a hipoxia requer o transporte de eletrões no complexo III da cadeia respiratória mitocondrial e é responsável pela ativação da HIF- α (do inglês *Hypoxia Inducible-Factors*), proteína reguladora de genes que promovem a sobrevivência em estados de défice de oxigénio. As ROS geradas nos *Qo* e *Qi sites* do complexo III são libertadas para a matriz e/ou espaço intermembranar/citoplasma, sendo evidente uma maior importância das moléculas de sinalização oxidantes provenientes do citoplasma. Os estudos indicam a libertação de superóxido do *Qo site* do complexo III para o espaço intermembranar e conseqüente libertação de H₂O₂ no citoplasma. Existem também evidências que a inibição do complexo III resulta na redução da formação de ROS induzida pela hipoxia, indicando a importância do complexo III na formação de ROS responsáveis pela

sinalização intracelular (42). Um outro exemplo da importância das ROS como moléculas de sinalização, é também evidente na sua relação com a inflamação, em que a oxidação de proteínas resulta na libertação de sinais inflamatórios, sendo a forma oxidada da peroxirredoxina (PRDX2, do inglês *Peroxiredoxin-2*) uma das proteínas libertadas em resposta aos estímulos inflamatórios. As células inflamatórias são sensíveis às ROS e sua função é regulada pela presença de oxidantes, ou seja, as enzimas pró-inflamatórias podem ser ativadas por genes reguladores, como o NF-κB (do inglês *Factor Nuclear kappa B*) em resposta à formação de oxidantes (45). Todas estas descobertas constituem evidências indiretas que suportam o conceito de *hormesis* mitocondrial e sugerem a importância da função de sinalização das ROS na resposta antioxidante ao *stress* oxidativo (gerado pelas mesmas), no sentido de promover a longevidade e prevenirem as alterações biológicas relacionadas com o envelhecimento. A resposta do organismo ao *stress* é um dos mecanismos mais evoluídos e melhor conservado com um papel determinante no envelhecimento e longevidade (24).

O papel protetor das ROS não é referido na Teoria dos Radicais Livres, sendo apenas referido o seu efeito prejudicial no organismo. O conceito de *hormesis* mitocondrial permite-nos compreender melhor a influência do *stress* oxidativo no envelhecimento e no funcionamento dos mecanismos condicionantes da longevidade. Neste sentido, surgem novas perspectivas para a aplicação de métodos anti envelhecimento ou promotores da longevidade como a restrição calórica.

O mTOR e seus antagonistas

A manipulação farmacológica ou genética da via de sinalização da proteína alvo da rapamicina, TOR (do inglês *Target Of Rapamycin*), mais concretamente a inibição da sua atividade, tem sido associada em alguns estudos com vários organismos modelos (leveduras, minhocas, moscas e mamíferos), a um aumento da longevidade e a um envelhecimento saudável (46). Em 2009 surgiu a primeira indicação que a inibição da via de sinalização TOR, neste caso recorrendo ao uso de rapamicina, poderia promover a longevidade em mamíferos, após um estudo realizado em ratos geneticamente heterogêneos em três laboratórios diferentes (47). A TOR é uma proteína serina/treonina cinase que regula o crescimento celular, a imunidade, a plasticidade sináptica, o envelhecimento e o metabolismo em vários organismos, desde a levedura ao humano (48, 49). A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR, do inglês *mammalian Target Of Rapamycin*), também conhecido como *FRAP1* (proteína associada à rapamicina) ou *RAFT1* (proteína alvo da rapamicina) tem um papel fundamental na integração de sinais provenientes de alterações nos fatores de crescimento, na disponibilidade de nutrientes, no balanço energético, no estado oxidação-redução e noutros fatores de *stress* fisiológico. A convergência destes sinais no complexo mTOR induz a ativação de processos celulares como a tradução do mRNA, a síntese proteica, a autofagia, a proliferação e o crescimento celular que têm um papel preponderante na adaptação ao ambiente e na longevidade dos organismos (50). De referir que os princípios do mecanismo de transdução de sinal utilizado por uma célula baseiam-se numa interação entre proteínas específicas numa determinada ordem e a sua fosforilação ou desfosforilação. Essas proteínas podem ser quinases, fosfatases, GTPases e moléculas adaptadoras sem atividade enzimática intrínseca (51).

Complexos mTOR e a sua atividade

Nos mamíferos, a mTOR é a subunidade catalítica de dois complexos distintos, o mTORC1 (do inglês *mTOR complex 1*) e mTORC2 (do inglês *mTOR complex 2*), formados pela associação do mTOR com outros componentes moleculares. A atividade enzimática do mTOR nestes complexos 1 e 2 é regulada pelas proteínas *raptor* (do inglês *regulatory-associated protein of mTOR*) e *riCTOR* (do inglês *rapamycin-insensitive companion of mTOR*), respetivamente. O complexo mTORC1 é ainda constituído pela LST8 que também entra na constituição do mTORC2 juntamente com a Sin1 (proteína cinase mitogénio-ativada associada à proteína 1) (49).

Complexo mTOR 1

Sinalização a montante de TOR (Figura 1)

A atividade do mTORC1 é regulada por múltiplos fatores, nomeadamente fatores de crescimento, lesões de macromoléculas como o ADN, hipoxia, défice ou excesso de nutrientes, entre outros. A proteína Rheb GTPase é a principal molécula envolvida na ativação deste complexo, sendo a sua atividade inibida pelo complexo TSC1/2 que converte a Rheb-GTP na forma inativa Rheb-GDP e assim reduz a atividade do mTORC1. O complexo TSC1/2 é inativado por vários fatores de crescimento, ao ser fosforilado pelas cinases ERK1/2 e Akt. Pelo contrário, determinados estímulos ativam o complexo TSC1/2 através da ativação da proteína cinase AMP (restrição calórica e lesão do DNA) ou da REDD1 (hipóxia), resultando na inativação da Rheb e inibição do mTORC1.

Os nutrientes apresentam uma importante função de regulação da atividade do mTORC, existindo evidências recentes que sugerem a inibição do mTORC1 através da fosforilação do raptor pela AMPK, uma via independente do complexo TSC1/2. Assim na presença de aminoácidos, o mTORC1 também pode ser ativado, por uma via independente do

TSC1/2, através Rag GTPases que transporta o complexo do citoplasma para as membranas lisossomais, onde é ativado pela Rheb. Outra hipótese de ativação do complexo mTORC1 na presença de aminoácidos, resulta da interação entre a leucil-tRNA sintetase com a Rag, promovendo a formação do complexo RagA/B-RagC/D e a sua ativação (RagA/B-GTP e RagC/D-GDP) (52).

Sinalização a jusante de TOR (Figura 1)

A via sinalização do mTORC1 na síntese proteica envolve a enzima S6 cinase 1 (S6K1) e o fator de iniciação da tradução eucariótica 4E ligado à proteína 1 (eIF-4BP1 do inglês *eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein-1*). A fosforilação do eIF-4BP1 pelo complexo mTORC1 provoca a sua dissociação, inibindo o seu efeito de supressão sobre a tradução do mRNA e promovendo assim a síntese proteica. No caso da enzima S6K1, a fosforilação induz a sua ativação e promove assim a tradução do mRNA (52). Estudos com vários organismos modelos, nomeadamente o ratinho (53) evidenciaram o papel regulador da longevidade do mTORC1 através da deleção da enzima S6K1, uma vez que a sua deleção induz a redução da atividade do mTORC1 e está associada a um aumento da longevidade nestes organismos. No entanto, o estudo dos ratinhos não inclui a comparação com jovens adultos, de modo a esclarecer se os efeitos observados resultam de um atraso do envelhecimento ou se são consequências independentes do processo de envelhecimento.

O complexo mTOR1 está também envolvido na indução da lipogénese através da ativação dos fatores de transcrição SREBP1 e PPAR γ (do inglês *peroxisome proliferator-activated recetor*), na promoção do metabolismo oxidativo; na biogénese mitocondrial através da ativação do PGC1 α /YY1 e na inibição da autofagia através da fosforilação do complexo ULK1-Atg13-FIP200 (53).

Complexo mTOR2

Relativamente ao mTORC2 (Figura 1), os mecanismos de ativação ainda não estão bem esclarecidos, apenas recentemente se descobriu a influência de fatores de crescimento como a insulina, na sua ativação (54). É conhecido no entanto, a influência do mTORC2 no metabolismo, na apoptose, na organização do citoesqueleto e na resposta ao *stress* através da ativação de várias AGC cinases. Este complexo pode também ativar o complexo mTORC1 através da inativação do complexo TSC1/2, quando estimulado por fatores de crescimento(52).

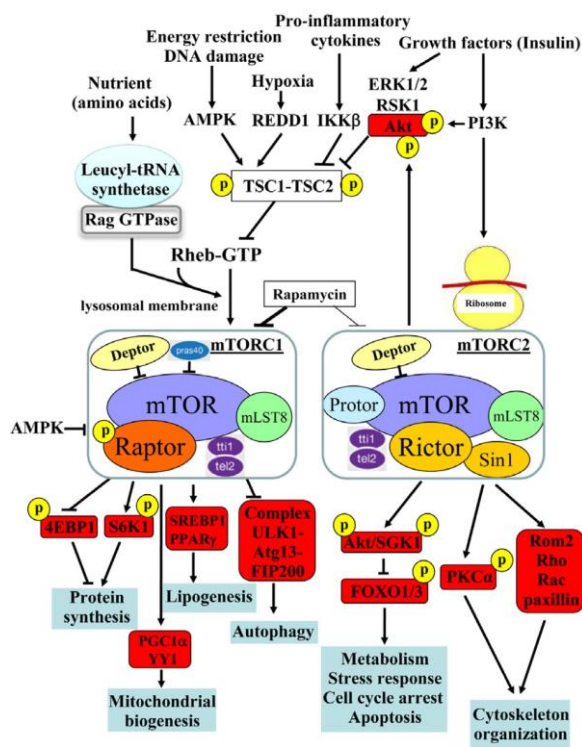


Figura 1. As características distintas dos dois complexos mTOR relativamente à sua composição, sensibilidade à rapamicina, sinalização a montante, substratos e funções biológicas.

Yang Z, Ming XF. mTOR signalling: the molecular interface connecting metabolic stress, aging and cardiovascular diseases. *Obes Rev.* 2012;13 Suppl 2:58-68. (52)

mTOR como regulador da longevidade

Tradução do mRNA

A promoção da tradução do mRNA e a consequente síntese proteica é uma das principais funções do mTORC1, sobretudo quando as condições do meio e do organismo são

favoráveis ao crescimento. Alguns estudos com vários organismos, nomeadamente leveduras, nemátodes, moscas da fruta e ratos, demonstraram que a regulação da tradução do mRNA pode influenciar a longevidade. Mutações na enzima S6K, o aumento da expressão do alelo ativado da 4E-BP, mutações de fatores iniciadores da tradução ou em proteínas ribossomais evidenciaram um aumento da longevidade dos organismos em estudo. No entanto, a razão pela qual a redução da tradução proteica está associada a um atraso do envelhecimento ainda não está bem esclarecida. Há quem defenda que o processo resulta da redução global da tradução, permitindo a reparação e manutenção das proteínas danificadas ou outra hipótese será a dependência de uma elevada síntese proteica por parte das patologias relacionadas com a idade (55). Também existem evidências, nomeadamente num estudo realizado com leveduras (56), que a tradução diferencial de determinados mRNA tem maior influência que a redução global da tradução de mRNA. Este estudo sugere que a inibição do mTORC1 favorece o aumento da tradução do ativador de transcrição (Gcn4) que regula a expressão de genes envolvidos na resistência ao *stress*.

Os mecanismos de regulação da tradução do mRNA pelo mTORC1 ainda não estão bem esclarecidos e segundo algumas investigações podem ser diferentes entre mamíferos e invertebrados (55). Um estudo recente realizado com fibroblastos de rato colocou algumas dúvidas sobre o principal regulador da atividade do mTORC1 na tradução do mRNA nos mamíferos, indicando que o 4E-BP possa assumir esse papel em vez da enzima S6K1 (57). Esse mesmo trabalho sugeriu diferenças no mecanismo de tradução diferencial do mRNA entre invertebrados e mamíferos.

Autofagia

A autofagia é um processo catabólico essencial na degradação lisossômica de organelos e macromoléculas disfuncionais que permite a reciclagem de aminoácidos em

períodos de fome, sendo uma das respostas do organismo ao jejum ou déficit nutricional. Este processo é também regulado pelo mTORC1, em que vários genes alvo do complexo mTOR 1 estão envolvidos na iniciação da formação do autofagossoma em células de mamíferos, incluindo os genes Atg13, ULK1 e ULK2. Numa situação de jejum, o mTORC1 dissocia-se do complexo formado pelas proteínas Atg13 e ULK1/2, permitindo a sua desfosforilação e consequente ativação da ULK1 e da ULK2 que desencadeia o processo da autofagia (50).

Tem-se observado, nomeadamente num estudo com ratos (58), uma diminuição da atividade autofágica com envelhecimento, resultando na acumulação de proteínas e organelos degenerados, uma disfunção celular comum no processo de envelhecimento. Além disso, a disfunção da autofagia tem sido associada ao aparecimento de patologias do envelhecimento, como Cancro, Diabetes, Patologia cardiovascular e Patologia neurodegenerativa. Num outro estudo realizado com ratos com Doença de Huntington, a inibição da mTORC1 induziu a autofagia, visível através da redução da toxicidade e dos agregados de poliglutamina (59). O aumento da longevidade, em vários organismos invertebrados, promovido pela indução da autofagia através da inibição do mTORC1 é mais um forte argumento a favor da relação entre a regulação do processo autofágico, a atividade do mTORC1 e o envelhecimento (55).

No entanto, a dificuldade em quantificar o fluxo autofágico, em determinar se autofagia é suficiente para aumentar a esperança de vida na ausência da inibição do mTORC1 (55) e se a indução da autofagia é acompanhada dos mesmos benefícios da inibição do mTORC1, são alguns dos obstáculos a comprovar o papel da autofagia na promoção da longevidade. A escassez de estudos que comprovem esta relação em mamíferos e humanos, também não permite avaliar a consistência deste mecanismo como regulador do envelhecimento em organismos superiores/vertebrados.

Mitocôndria

Como referido anteriormente, a mitocôndria é essencial à produção da energia celular através da fosforilação oxidativa, processo este que está associado à formação de ROS. Vários estudos demonstraram que o *stress* oxidativo resultante do aumento das ROS tem um papel importante no envelhecimento dos mamíferos. Há também um consenso relativamente ao papel da mitocôndria como determinante da longevidade, apoiado por algumas investigações que associam a incidência de patologias do envelhecimento em indivíduos com défice de função mitocondrial, nomeadamente por acumulação de mutações no ADN mitocondrial (60). O mTORC1 regula a função mitocondrial através da expressão dos genes do recetor ativado por proliferadores do peroxissoma γ (PPAR γ do inglês *peroxisome proliferator-activated recetor gamma*) e do coativador 1 alfa (PGC-1 α do inglês *peroxisome proliferator-activated recetor gamma coactivator 1-alpha*) com um papel crucial na biogénese mitocondrial em vários tecidos. Em células do músculo esquelético, a inibição do mTORC1 pela rapamicina está associada a um aumento da expressão destes e outros genes, resultando na redução da expressão de genes mitocondriais, do potencial de membrana mitocondrial e do consumo de oxigénio (50).

Estudos em leveduras também evidenciaram o papel preponderante da mitocôndria na longevidade através da redução da atividade do mTORC1, mas essa inibição resultou no aumento do potencial da membrana mitocondrial e no aumento da produção superóxido em quantidade suficiente para promover a adaptação ao *stress* oxidativo (hormesis mitocondrial) e assim aumentar a longevidade (61). Numa outra investigação com ratinhos, a redução da atividade do mTORC1 está associada a um aumento da respiração mitocondrial, sugerindo uma relação semelhante entre o mTORC1 e a função mitocondrial em mamíferos (62). No entanto, nesse mesmo estudo há referência a outros estudos em diferentes tecidos com

resultados contraditórios relativamente ao controlo positivo ou negativo da função mitocondrial pelo mTORC1, sugerindo uma dependência dos efetores do mTORC1 que se encontram em cada tecido. Apesar disso, há consenso quanto à influência do mTORC1 na homeostase mitocondrial dos mamíferos, sendo provavelmente um dos mecanismos pelo qual regula a longevidade. É assim necessário realizar mais estudos noutros tecidos e noutras espécies de mamíferos, nomeadamente nos humanos, para se comprovar e consolidar esta relação.

Inflamação

Tendo em conta que a influência da inflamação no desenvolvimento de patologias do envelhecimento e que a atividade aumentada do mTORC1 estimula o processo inflamatório, é possível que a redução da inflamação seja outro mecanismo pelo qual a inibição do mTORC1 possa prevenir o aparecimento destas patologias e assim prevenir o envelhecimento nos mamíferos (55). Em estudos recorrendo ao uso de rapamicina, foi demonstrado uma redução dos efeitos anti-inflamatórios em várias patologias, nomeadamente na insuficiência renal crónica em ratos (63) e placas ateroscleróticas em células humanas em cultura (64). Este resultado pode no entanto resultar de efeitos da rapamicina independentes do mecanismo do mTORC1.

Existem mais alguns mecanismos que têm vindo a ser estudados como possíveis reguladores da longevidade por intermédio do mTORC1. No entanto, tal como nos referidos neste trabalho, é necessário realizar mais investigações, sobretudo em mamíferos e humanos, que comprovem a sua influência na longevidade em organismos vertebrados. A complexa rede de processos em que a via de sinalização mTOR está envolvida torna difícil definir os mecanismos através dos quais o mTORC1 influencia verdadeiramente a longevidade.

Possivelmente a influência do eixo mTOR, sobretudo do complexo mTOR 1, na longevidade resulta do efeito conjunto dos vários mecanismos em que se encontra envolvido.

Rapamicina

A rapamicina é um fármaco inibidor da via de sinalização mTOR, preferencialmente do complexo mTOR 1. No entanto, há evidências que o tratamento crónico com rapamicina inibe tanto o mTORC1 como o mTORC2. Como já referido anteriormente, a relação entre a inibição farmacológica ou genética do eixo mTOR e o aumento da longevidade em animais invertebrados, nomeadamente leveduras, nemátodes e moscas da fruta, está comprovada por vários estudos nessa área (47).

Relativamente ao uso rapamicina em mamíferos, o primeiro estudo foi realizado em 2009 e comprovou um aumento do tempo de vida dos ratinhos que ingeriam rapamicina. Esta investigação foi realizada em três laboratórios independentes, com ratinhos geneticamente heterogéneos para evitar suscetibilidades a patologias decorrentes de um determinado genótipo. O estudo avaliou 2 grupos de ratinhos, um com animais com 270 dias e outro com animais com 600 dias (equivalente a um humano adulto, de aproximadamente 60 anos) (47). Este estudo demonstrou um aumento da longevidade em ambos os grupos e para ambos os sexos, apesar de os resultados serem menos consistentes para o grupo de animais com 270 dias. O aumento no tempo de vida destes animais está de acordo com o papel da inibição do eixo mTOR no atraso do processo de envelhecimento em mamíferos, no entanto não prova a existência de alteração do processo de envelhecimento através do estudo de vários órgãos, e de processos celulares normalmente alterados pela idade. O aumento da longevidade não significa necessariamente uma redução dos efeitos do envelhecimento, essa alteração poderia resultar principalmente da diminuição de patologias que limitam aumento da esperança de

vida como o cancro, uma vez que vários estudos demonstraram os efeitos antineoplásicos da rapamicina (65-67). No sentido de esclarecer se o efeito antineoplásico seria o principal fator ou apenas um dos efeitos benéficos da rapamicina no atraso do envelhecimento, um grupo de investigação liderado por *Frauke Neff* (68) realizou um estudo em larga escala para avaliar um grande número de fenótipos estruturais e funcionais característicos do processo de envelhecimento em vários tipos de células, de tecidos (total de 25) e órgãos. Tendo em conta que já se tinha comprovado em vários estudos, o efeito da administração crónica de rapamicina na longevidade nos dois sexos, neste estudo avaliaram apenas ratinhos *C57BL/6J* macho em 3 coortes com diferentes faixas etárias: 4 meses (juventude), 13 meses (meia-idade) e 20-22 meses (idade avançada). É, no entanto, limitante o estudo de um género e de apenas uma estirpe de ratinhos consanguíneos, assim como a dimensão das amostras. Neste estudo, um grande número de fenótipos avaliados não apresentou alterações com o uso da rapamicina e dos que apresentaram melhorias, a maioria demonstrou ser independente da idade, uma vez que se encontravam alterados tanto no grupo de ratinhos envelhecidos como no grupo mais jovem. Esta investigação evidenciou também uma diminuição na prevalência de lesões cancerosas e pré-cancerosas nos animais tratados com rapamicina. A melhoria na aprendizagem e memória, o aumento da atividade exploratória, o aumento dos glóbulos vermelhos e a melhoria da função cardíaca representam alguns dos efeitos coincidentes nos dois grupos de ratinhos, sendo a nefrotoxicidade e a gonadotoxicidade os principais efeitos adversos que não têm impacto suficiente para afetar a qualidade de vida. A melhoria da cognição é particularmente importante no envelhecimento pelo seu papel fundamental na qualidade de vida do ser humano. Um outro estudo recente (69) demonstrou também alguns benefícios com o uso da rapamicina, nomeadamente da lipose hepática, dos níveis de atividade motora e dos núcleos atípicos nos cardiomiócitos, não avaliando no entanto a dependência dos efeitos em relação ao processo de envelhecimento. Os resultados destes

estudos, sobretudo do trabalho de *Neff* e da sua equipa, sugerem que os efeitos da rapamicina estão com maior probabilidade associados à diminuição da incidência de patologias limitadoras da longevidade do que aos efeitos da rapamicina no processo de envelhecimento em mamíferos. A principal patologia limitadora é o cancro, sendo responsável por uma alta percentagem de mortalidade em algumas estirpes de ratos (70), como é o caso da estirpe *C57BL/6J* usada no estudo de *Neff et al.* Para esclarecer a verdadeira influência da administração de rapamicina, bem como possíveis efeitos adversos são necessários mais estudos com diferentes estirpes de ratos ou com outras espécies de mamíferos cujas principais causas de morte não sejam a patologia neoplásica.

O papel das Telomerasas

Os telómeros consistem em sequências repetitivas de ADN (TTAGGG nos vertebrados) revestidas por proteínas especializadas, conhecidas como *shelterins* e constituem as extremidades dos cromossomas lineares. O número de sequências repetitivas varia entre cromossomas e entre espécie (71). Alguns estudos demonstram algum componente de hereditariedade relativamente ao comprimento médio dos telómeros, no entanto existe alguma heterogeneidade/variação gerada na linha germinativa (71-73). Durante a divisão celular na mitose, devido à replicação incompleta, uma vez que a ADN polimerase é incapaz de replicar a extremidade 3' da cadeia original, a nova cadeia de ADN sintetizada é sempre mais curta que a molécula original de ADN. Assim, com as sucessivas divisões mitóticas ocorre um encurtamento dos cromossomas, mas a perda de informação genética é evitada em parte pela estrutura terminal, os telómeros, constituídos por longas sequências de ADN que não codificam genes específicos. A taxa de erosão/encurtamento dos telómeros parece variar de

cromossoma para cromossoma, segundo um estudo que demonstrou uma maior taxa de encurtamento cromossômico num cromossoma X inativo relativamente aos cromossomas autossômicos e ao cromossoma X ativo, por influência de fatores epigenéticos (74). Por isso, é possível que a diferença do comprimento médio entre cromossomas específicos possa ser gerada durante a proliferação e envelhecimento (75). As células humanas normais têm um limite de capacidade de divisão, quando os telómeros atingem um comprimento crítico, conhecido como limite de *Hayflick* (76), sendo ativados mecanismos que impedem a proliferação celular, nomeadamente através da proteína supressora tumoral p53 (77). A prevenção do reconhecimento indesejado de quebras da dupla cadeia de ADN (DSB do inglês *Double-Strand Break*) pelos mecanismos de reparação do ADN, assim como a evicção da fusão topo a topo dos cromossomas são outras funções importantes dos telómeros. Quando os cromossomas são demasiados curtos para proteger as extremidades dos cromossomas e as proteínas *shelterin* não são suficientes para evitar a ação dos mecanismos de reparação do ADN, existem outros mecanismos protetores como a via de sinalização ATM (do inglês *ataxia telangiectasia mutated*) e ATR (do inglês *ataxia telangiectasia and Rad3 related*), a junção de extremidades quebradas não-homólogas (NHEJ do inglês *classical non-homologous end-joining*), a NHEJ alternativo, a recombinação homóloga e ressecção, que evitam a afeção do material genético. A fusão de cromossomas topo a topo, a formação de aneuploidias e translocações não recíprocas são alguns dos marcadores de instabilidade dos cromossomas.

É também possível a reparação dos telómeros através da ação da telomerase, uma ribonucleoproteína com atividade de transcriptase reversa que adiciona sequências específicas e repetitivas de ADN à extremidade 3' dos cromossomas de células eucarióticas. A telomerase humana é um complexo enzimático constituído pelos seguintes componentes: uma componente proteica com atividade de transcriptase reversa (TERT, codificada pelo gene

hTERT), uma componente de ARN (TERC, codificada pelo gene hTERC), a disquerina (codificada pelo gene DKC1) que confere conformação e estabilidade adequada à componente de ARN, bem como outras proteínas que contribuem para a sua estabilidade. A sua expressão está reprimida na maior parte das células maduras dos humanos e por isso há um encurtamento dos telómeros com o envelhecimento, mas encontra-se ativa nas células estaminais adultas e embrionárias (78). A transcrição, o *splicing* alternativo, as modificações pós-tradução de vários componentes e do próprio complexo enzimático são alguns dos fatores que influenciam a expressão da telomerase. O oncogene *c-Myc* e os estrogénios são exemplos de fatores que estimulam a sua expressão, enquanto as proteínas supressoras tumorais Rb e p21 inibem a sua expressão (71).

Dinâmica dos telómeros e atividade das telomerases no envelhecimento

Na maioria das espécies a expressão da telomerase não se encontra restringida e os organismos morrem antes de atingirem o comprimento crítico dos telómeros, ao contrário do que acontece com o ser humano e algumas outras espécies. Um outro facto interessante nos mamíferos é a evidência de uma relação inversa entre o comprimento dos telómeros e a longevidade dos organismos (79, 80). Tendo em conta que os animais maiores estão sujeitos a um maior número de divisões celulares e vivem mais tempo, a acumulação de mutações é também maior, por isso os telómeros curtos podem funcionar como um mecanismo evolutivo de supressão tumoral (81), dada a maior probabilidade de carcinogénese. Esta é uma possível explicação para esta relação inversa, mas há, no entanto, algumas exceções como o rato toupeira pelado, o esquilo cinzento que têm telómeros mais curtos e têm uma esperança média de vida muito superior (mais de 20 anos) comparado com a maioria dos roedores próximos da sua espécie (82). Neste estudo com roedores, foi também evidente uma supressão da atividade

da telomerase com o aumento da massa corporal, podendo representar uma adaptação dada a maior probabilidade de desenvolver cancro. Infelizmente, estes mecanismos supressores tumorais têm um custo, o encurtamento dos telómeros na maioria dos nossos tecidos com o envelhecimento contribui para a perda da capacidade regenerativa dos tecidos e para a insuficiência orgânica observada em idades avançadas. Vários estudos sugerem uma enorme influência da biologia e da disfunção dos telómeros na longevidade dos mamíferos (83), como foi demonstrado num estudo com ratos com défice de atividade da telomerase que induziu uma redução no comprimento dos telómeros e um envelhecimento precoce (84).

Nos seres humanos, o comprimento dos telómeros exibe uma ampla variabilidade em qualquer idade, ou seja, indivíduos com idades diferentes podem ter os telómeros com o mesmo comprimento. Esta variabilidade opõe-se à hipótese do telómero como marcador ou mecanismo do envelhecimento, assim como dificulta a sua compreensão e o seu estudo (78). É, no entanto, consensual que existe um encurtamento dos telómeros com a replicação das células somáticas e por isso com o envelhecimento, funcionando como um "mitotic clock". De notar que esta erosão dos telómeros como a divisão celular no organismo humano é variável entre células e tecidos (71). Telómeros demasiado curtos tornam-se disfuncionais e desencadeiam a via de sinalização envolvida na resposta a danos do ADN que pode provocar a apoptose das células afetadas (85). Alguns estudos em humanos demonstraram uma correlação positiva entre o encurtamento dos telómeros e o envelhecimento (86, 87), assim como uma associação direta entre o encurtamento dos telómeros e a incidência de patologias relacionadas com o envelhecimento, nomeadamente Doença Arterial Coronária (88, 89). Um outro exemplo de estudo que apoia esta hipótese, demonstrou um aumento da mortalidade relacionada com o aumento da incidência de Patologia cardíaca e infecciosa em indivíduos (idade superior a 60 anos) com telómeros mais curtos nas células sanguíneas (90). Existe, no entanto, uma outra investigação com menor tempo de estudo e realizada em indivíduos entre

os 73 e 101 anos que não confirmou esta associação (91). Estudos realizados em indivíduos com e sem demência, neste caso associada à Doença de Alzheimer, também demonstraram uma relação entre telômeros mais curtos e pacientes com demência ou com um pior estado de demência (baixo score no MMSE (do inglês *Mini-Mental State Examination*) (92, 93). Nos últimos anos, vários estudos sugerem também que fatores relacionados com um estilo de vida pouco saudável e mortalidade precoce estão também associados a telômeros mais curtos. O stress crónico (94), o tabagismo (95), a obesidade (95, 96), a exposição ocupacional a poluentes (97) são alguns desses fatores, enquanto hábitos de vida saudáveis como uma dieta saudável e a prática de exercício aeróbio surgem pelo contrário associados a telômeros mais longos (98, 99). O *stress* oxidativo surge num estudo associado a um aumento da taxa de encurtamento dos telômeros, podendo indicar que o encurtamento dos telômeros pode não refletir apenas o historial proliferativo da célula mas também a acumulação de lesões oxidativas neste caso (100). Algumas síndromes de envelhecimento prematuro resultantes de mutações nas proteínas de reparação do ADN, nomeadamente a Síndrome de Hutchinson-Gilford e a Síndrome de Werner, são também caracterizadas por um aumento da taxa de encurtamento do telômeros (13, 101). As mutações em genes que expressam componentes da telomerase humana provocam um encurtamento dos telômeros e estão associadas a uma incidência aumentada de fibrose pulmonar idiopática e anemia aplástica (102-104). Todas estas evidências apoiam fortemente, a teoria de que a acumulação de telômeros curtos ou lesados, nomeadamente por défice de atividade da telomerase, é uma das principais causas de lesão do ADN, causando perda da capacidade regenerativa dos tecidos do organismo humano no envelhecimento.

Num estudo realizado com fibroblastos humanos em cultura foram detetadas proteínas CRAMP (do inglês *cathelin-related antimicrobial peptide*) e EF-1alfa (do inglês *elongation factor-1alfa, stathmin*) que são secretadas em resposta ao impacto da disfunção telomérica na

função celular ao longo do envelhecimento e nos indivíduos que sofrem de patologias crónicas. Estas proteínas podem assim funcionar como biomarcadores do envelhecimento humano, com utilidade clínica nas terapias aplicadas em idosos (105).

A telomerase como enzima promotora da longevidade

Num estudo recente com indivíduos centenários, foi demonstrado que estes apresentam telómeros mais compridos que os do grupo de controlo e que telómeros mais longos estão associados a uma maior proteção contra patologias do envelhecimento, bem como a uma melhor função cognitiva. Nessa investigação foi também detetado um haplótipo da hTERT que está associado tanto a uma maior longevidade como a um maior comprimento dos telómeros, o que sugere uma relação entre a variação genética da telomerase e uma melhor manutenção do comprimento dos telómeros, um envelhecimento saudável e uma longevidade excepcional (106).

Com a exceção dos ratos geneticamente modificados para serem resistentes ao cancro, o aumento da expressão de telomerase está associado a uma maior suscetibilidade para o desenvolvimento tumoral tanto em ratinhos como em humanos (107). A expressão constitutiva da telomerase é característica de quase todas as células cancerígenas e por isso animais transgénicos com expressão aumentada da subunidade catalítica da telomerase (mTERT) desenvolvem cancro em idades precoces, como foi demonstrado num estudo com ratinhos (108). Com o objetivo de se avaliar os potenciais benefícios do aumento da atividade da telomerase sem a influência tumoral, foi realizado um estudo com ratinhos altamente resistentes ao cancro através da expressão de supressores tumorais (p53, p16, p19ARF), no qual se observou um aumento da longevidade média em 40% e algumas propriedades de rejuvenescimento (109). Na maior parte dos estudos realizados, era o promovido o aumento

da expressão da TERT desde o desenvolvimento embrionário, o que provavelmente favorecia a expansão de células cancerígenas e o desenvolvimento de cancro mais tarde. Por isso, uma equipa de investigadores (107) decidiu avaliar os efeitos no envelhecimento quando se aumenta a expressão da TERT numa fase mais avançada da vida dos animais (ratinhos adultos) com recurso à terapia génica sem aumentar o risco tumoral. Recorreram ao uso de um vírus adenoassociado recombinante (rAAV, do inglês *recombinant Adenoassociated Viruses*), mais concretamente o vetor AAV9, para administrar a enzima mTERT, uma vez que estes vetores apresentam uma taxa de integração no genoma muito baixa e por isso perdem-se facilmente na alta taxa de proliferação celular característica das células tumorais, não promovendo o seu desenvolvimento. Esta intervenção permitiu a reativação da atividade das telomerasas num grande número de tecidos com vários benefícios na saúde dos animais em estudo, incluindo atraso do desenvolvimento de osteoporose e de resistência à insulina, melhoria da função metabólica, melhoria da coordenação neuromuscular e da capacidade cognitiva. Associado a estes efeitos de rejuvenescimento, foi detetado um aumento global de telómeros longos e uma redução de telómeros curtos, o que comprova a ação da telomerase na prevenção da erosão dos telómeros numa grande variedade de tecidos. Neste estudo, ficou ainda demonstrado que a forma mutante da mTERT incapaz de promover a extensão dos telómeros, não estava associada a um aumento da longevidade nem a efeitos de rejuvenescimento, o que indica a dependência da atividade da transcriptase reversa da telomerase no atraso do processo de envelhecimento (107). Este resultado constitui também uma evidência adicional para a influência do encurtamento dos telómeros no declínio funcional dos tecidos nos mamíferos.

A extrapolação de resultados obtidos em estudos com ratos para humanos, não é consensual. Um estudo realizado com células tumorais renais de murino cujos telómeros têm um comprimento semelhante ao das células humanas, revelou uma diferença fundamental na

regulação da atividade da telomerase entre o humano e o rato (110). Numa outra investigação mais recente, realizada com o objetivo de comparar a biologia do telómeros nas duas espécies (humano e ratinho), conclui-se que apesar de a deficiência de telomerase acelerar o encurtamento dos telómeros em ambas as espécies, as consequências nos diferentes órgãos e no organismo em si são muito divergentes (78). Apesar dos progressos feitos nos últimos anos, com a utilização da telomerase para a promoção da longevidade sem aumentar a incidência de cancro, a sua aplicação em humanos vai requerer estudos em humanos ou organismos modelos com funcionamento semelhante aos humanos. Estudos recentes indicam que o peixe-zebra pode ser um bom modelo (111), uma vez que apresenta telómeros com um comprimento semelhante ao humano e a expressão de telomerase nas células somáticas não é suficiente para prevenir o seu encurtamento com o envelhecimento.

Dieta, restrição calórica e seus miméticos

A importância da dieta no atraso do envelhecimento e na promoção da longevidade em organismos modelos e roedores é consensual (112-115). Dados epidemiológicos e experimentais comprovam que a dieta tem um papel central na patogénese das doenças relacionadas com o envelhecimento e no próprio mecanismo do envelhecimento. Mais concretamente, a ingestão calórica, o *timing* das refeições e os nutrientes que fazem parte da nossa alimentação estão envolvidos nas doenças crónicas do envelhecimento e no processo de envelhecimento do organismo humano (112). Vários alimentos foram classificados como alimentos “antienvelhecimento”, nomeadamente os feijões, o chocolate negro (principalmente atribuído aos flavonoides presentes no cacau), o peixe, os vegetais, os cereais integrais, as nozes e o abacate (rico em gorduras monoinsaturada, vitaminas e antioxidantes), sobretudo

pelas suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (116). Relativamente à restrição calórica (RC), a sua influência no aumento da longevidade é controverso como se demonstrou em estudos com roedores, principalmente no que diz respeito ao tipo de restrição calórica aplicado e à altura da vida em que se inicia a RC nas várias estirpes de ratos e camundongos (117). A RC, ou seja, a redução da ingestão calórica mantendo uma dieta equilibrada (com um nível adequado de todos os constituintes), é o único método reprodutível experimentalmente que promove um aumento da longevidade em várias espécies animais (118).

Os mecanismos envolvidos na RC ainda não foram completamente esclarecidos, mas existem alguns mecanismos que muito provavelmente influenciam o papel da RC no processo de envelhecimento e na promoção da longevidade. Informações recolhidas em estudo em organismos modelos animais (levedura, minhoca, mosca) e roedores indicam que estes mecanismos são os mesmos nas várias espécies e muito provavelmente estão relacionados com a diminuição da atividade das vias de sinalização do metabolismo energético proteico, como o eixo mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) e o IIS (*insulin/insulin-like growth factor 1 signalling*) (113, 119). Estudos genéticos evidenciam o papel da via metabólica mTOR no aumento da longevidade através da RC em leveduras e nemátodes. A deleção de genes codificadores de componentes homólogos do mTOR e de outros componentes, como o S6K e o 4E-BP1, impedem a replicação do efeito da RC na promoção da longevidade (55). Vários estudos sugerem também uma associação entre processos regulados pelo mTOR (incluindo a autofagia e a tradução do mRNA) e o efeito da RC na longevidade. O eixo mTOR e o eixo IIS apresentam uma forte ligação ao mediar a atividade um do outro, principalmente através da família FOXO (do inglês *Forkhead Box O*) como foi demonstrado em estudos realizados com moscas da fruta e com células de mamíferos (55). Alguns estudos sugerem que os efeitos da RC calórica poderão estar relacionados com a redução do *stress* oxidativo em vários tecidos, como foi demonstrado num estudo com roedores, bem como a

redução de marcadores do *stress* oxidativo evidente num estudo com humanos. O aumento da resistência ao *stress* pode ser explicado pela *hormesis* mitocondrial, uma hipótese que reúne consenso, em que os baixos níveis de *stress* associados à baixa ingestão de nutrientes estimulam o aumento da atividade de vias de resistência ao *stress*, nomeadamente a ativação de genes codificadores da FOXO3 (do inglês *Forkhead Box O3*), cuja expressão é aumentada pela RC (120). Algumas evidências também sugerem que essa redução poderá resultar da diminuição da atividade metabólica e consequente subprodução de ROS. Aparentemente, alguns dos efeitos saudáveis da RC poderão também ser parcialmente atribuídos à regulação da homeostasia energética através da ativação das sirtuínas, sobretudo da SIRT-1. Por último, a via de sinalização mTOR, como já foi referido anteriormente, é uma via sensível à disponibilidade energética e de aminoácidos, e este mecanismo tem por isso, também, alguma responsabilidade nos efeitos da RC (121).

O papel da restrição calórica e da dieta saudável na longevidade

O papel da restrição calórica na promoção da longevidade foi comprovado há aproximadamente 80 anos num estudo com ratos (122). Desde então, vários estudos confirmaram a associação entre a RC e o aumento do tempo de vida de várias espécies, nomeadamente a levedura, a mosca, a minhoca e o macaco (112, 113, 123). Em organismos superiores, como os roedores, os macacos e o humano, esta redução da ingestão calórica está também associada a um atraso da perda da funcionalidade e à diminuição da incidência de patologias do envelhecimento, com se demonstra pela alteração de marcadores metabólicos destas patologias (113). Muitas das adaptações estruturais, metabólicas e hormonais observadas nos roedores sujeitos a um regime de RC, como redução da massa gorda, aumento da sensibilidade à insulina, redução da inflamação e da lesão oxidativa, são também evidentes

nos estudos com macacos e com humanos. As alterações observadas em ratos e humanos, apresentam, no entanto, algumas diferenças, como é exemplo a redução do nível sérico da IGF-1 (do inglês *Insulin Like Growth Factor*) evidente nos roedores e que em humanos apenas se verifica caso a ingestão proteica também seja reduzida (113). Num estudo realizado com ratos (machos), quando aplicado um regime de RC de 60% numa dieta essencialmente constituída por soja rica em proteína, quase um terço dos ratos morreu sem lesões morfológicas severas que fossem consideradas a causa de morte dos animais (124). Há um argumento contra o efeito da RC no aumento da longevidade, confirmado por um estudo com roedores com ancestrais selvagens, que sugere o efeito da RC calórica como um fenómeno de laboratório que não se verifica em animais selvagens (125). Neste estudo, o aumento da longevidade dos animais selvagens sujeitos a CR não foi estatisticamente significativo.

Os regimes de *alternate-day fasting* (ADF) e de restrição do aporte da metionina são outros exemplos de dietas que também estão associados a um aumento da longevidade, a um atraso no desenvolvimento de alterações características do envelhecimento, à prevenção de doenças crónicas em algumas espécies de roedores. O ADF consiste num regime que geralmente envolve um "*feast day*" no qual a comida é consumida *ad libitum* que alterna com um "*fast day*" no qual o consumo é reduzido, ou seja, limita-se a ingestão calórica e não se altera a frequência das refeições. Em humanos, o regime ADF está também associado à modulação de fatores de risco através de alguns efeitos metabólicos positivos (por exemplo, o aumento dos níveis séricos de HDL (do inglês *High-Density Cholesterol*) e diminuição dos triglicéridos) (114, 126). É possível que a redução de uma determinada fonte de calorias seja mais importante que a redução da ingestão calórica total, como indicam também estudos realizados em moscas e leveduras (127). Estudos em humanos com vários regimes alimentares, nomeadamente vegans, CRONies (do inglês *Calorie Restriction with Optimal Nutrition*) e atletas com alto consumo proteico demonstraram concentrações mais baixas de

IGF-1 nos regimes alimentares com baixo consumo proteico, o que sugere uma maior influência da ingestão proteica relativamente à ingestão calórica na modulação dos níveis de IGF-1 (112). São necessários mais estudos para estabelecer os verdadeiros benefícios da ADF e dos regimes de restrição proteica, sobretudo em humanos.

Os primatas não-humanos são um modelo adequado para o estudo do envelhecimento humano, tendo em conta as suas semelhanças anatómicas, fisiológicas e comportamentais. Na atualidade existem apenas dois grupos de investigadores (*National Institute on Aging* (NIA) e o *Wisconsin National Primate Research Center* (WNPRC)) a estudar o impacto da RC no envelhecimento saudável e na longevidade em espécies primatas não-humanas. Ambos os estudos utilizaram a espécie de macacos *Rhesus* (esperança média de vida de aproximadamente 27 anos e longevidade máxima aproximadamente 40 anos) durante 20 anos e aplicaram um nível de RC de 30%, tendo sido observada uma diminuição da ingestão calórica associada ao envelhecimento pós idade adulta em ambos os estudos. O macaco *Rhesus* (*macaca mullatta*) com o envelhecimento, exhibe muitos dos fenótipos observados nos humanos, nomeadamente a redistribuição da gordura corporal, a perda de tónus muscular, o branqueamento do cabelo e a perda da elasticidade cutânea. Uma outra semelhança são as patologias do envelhecimento (diabetes, neoplasia, sarcopenia, perda da densidade óssea e declínio da função imunológica) cujas manifestações clínicas também aumentam, nesta espécie de primatas, com o avançar da idade (128).

No estudo NIA (129), foram utilizados macacos de várias idades, agrupados por faixas etárias, com o objetivo de avaliar o impacto da idade com que se inicia a RC nos processos biológicos relacionados com o envelhecimento. Os animais de estudo foram divididos em dois grupos: *young-onset* and *old-onset*, com os animais com idade superior ou igual a 16 anos a pertencerem ao *old-onset*. Neste estudo, foi considerado que o grupo de controlo tinha um regime alimentar *ad libitum*, apesar de não ter acesso contínuo a alimentos (alimentados

duas vezes por dia com base na idade e peso). Após os 26 anos de idade, a diminuição da ingestão calórica característica do envelhecimento conduz a uma diminuição da dieta por RC inicialmente aplicada aos grupos controle (o nível de RC passou para 20% nos machos e 12% nas fêmeas). Os resultados obtidos ao fim de 20 anos de estudo não demonstraram um aumento da longevidade/esperança média de vida dos macacos do grupo sujeito a RC em comparação com os do grupo controle, em nenhum dos grupos etários. No *old-onset* verificou-se ainda que as causas de morte do grupo de estudo comparativamente ao grupo de controle não apresentavam diferenças significativas, no que respeita a doenças do envelhecimento, como a doença cardiovascular e a neoplasia, a serem igualmente representadas nos dois grupos. Apesar deste estudo não demonstrar um aumento da longevidade, é evidente uma melhoria de vários parâmetros metabólicos e da função global, mais concretamente, no *old-onset* foi observada uma diminuição dos níveis séricos de triglicéridos, colesterol, concentração da glicémia em jejum e níveis inferiores do isoprostano, um indicador de *stress* oxidativo. Em relação ao grupo *young-onset*, conclui-se que existe um atraso do desenvolvimento de patologias relacionadas com o envelhecimento, o que indica uma diminuição da incidência destas patologias quando a RC é iniciada em idades jovens. É importante ter em conta que esta investigação ainda não terminou, uma vez que 50% dos animais do *young-onset* ainda estão vivos, e por isso a curva final da longevidade ainda não foi obtida. Os dados obtidos nos 20 anos de estudo indicam uma redução da incidência de cancro no *young-onset* (nenhum caso identificado até ao momento), bem como uma melhoria da regulação dos níveis de glicose. Nos dois grupos RC, *young* and *old-onset*, os animais demonstraram uma fragilidade do sistema imune após o regime de RC, apesar da melhoria dos parâmetros imunológicos. Um outro estudo realizado em primatas sugere que pode haver um período ótimo durante a vida adulta para se iniciar a RC de modo a melhorar a imunidade destes animais, ao atrasar a senescência das células imunológicas (130).

O estudo WNPRC (131) que incluiu apenas animais adultos demonstrou um atraso na incidência de patologias do envelhecimento (neste caso avaliou-se a incidência de cancro, diabetes, doença cardiovascular e atrofia cerebral), uma diminuição da incidência de mortes relacionadas com o envelhecimento e um aumento significativo da longevidade que é a principal diferença em relação ao estudo NIA. A diferença entre o impacto da RC na longevidade dos primatas dos dois estudos pode ser explicada pela diferença na composição das dietas implementadas, nomeadamente as fontes de proteína, gordura, composição em sacarose, bem como os suplementos usados em cada estudo. A dieta do WNPRC rica em proteínas e hidratos de carbono refinados e processados assemelha-se à dieta ocidental, enquanto a dieta do NIA é uma dieta mais saudável, rica em peixe e alimentos de origem vegetal pouco processados que se assemelha a uma dieta mediterrânea. Esta constatação apoia a importância da composição da dieta, além da RC, na longevidade dos primatas. Uma outra diferença entre os dois estudos foi o regime alimentar aplicado ao grupo controlo do estudo NIA que não foi verdadeiramente *ad libitum*, este ponto pode explicar a ausência de diferença significativa entre a longevidade no grupo de estudo e o grupo de controlo. Assim, a dieta mais saudável dos animais do estudo NIA e alimentação ligeiramente restritiva do grupo de controlo deste estudo podem explicar a ausência de diferença estatística significativa na longevidade entre o grupo sujeito a RC e o grupo controlo, uma vez que tanto os macacos macho do grupo RC como os do grupo de controlo apresentam um tempo de vida mais longo (aproximadamente 45%) que os macacos *rhesus* mantidos em cativeiro (117). Por outro lado, a alimentação *ad libitum* usada no estudo WNPRC pode não simular verdadeiramente a alimentação destes animais no habitat natural e por isso o aumento da longevidade no grupo sujeito a RC pode ser um fenómeno laboratorial como resultado da alimentação do grupo de controlo não ser semelhante à alimentação do animal selvagem e que por isso induz uma mortalidade precoce. Por último, as diferentes origens dos macacos usados nos dois estudos

podem também contribuir para a diferença dos resultados obtidos. Os macacos usados no NIA são oriundos da China e Índia e por isso apresentam uma maior diversidade genética relativamente aos macacos oriundos da Índia, usados no estudo WNRPC. Um estudo realizado com roedores de diferentes estirpes demonstrou que a RC afeta de forma diferente a longevidade destes animais, o que levanta a hipótese de o aumento da longevidade com a RC não ser universal (igual para todos os genótipos) e que o nível de RC benéfico possa variar de estirpe para estirpe (132).

Relativamente à influência da RC na longevidade humana, existe uma enorme lacuna de resultados e de conclusões, pela normal dificuldade em se realizar estudos de longa duração com a sobrevivência como ponto de avaliação. Existem, no entanto, vários estudos que demonstram inúmeras adaptações metabólicas como a melhoria de parâmetros bioquímicos e de biomarcadores de longevidade em grupos sujeitos a RC ou em grupos de indivíduos que praticam RC com ingestão adequada de nutrientes como por exemplo os CRONies (do inglês *Calorie Restriction with Optimal Nutrition*). Neste último grupo, é provável que os efeitos benéficos resultem não inteiramente da RC, mas da alta qualidade dos alimentos consumidos por estes praticantes de RC. De referir que os biomarcadores de longevidade ou envelhecimento são parâmetros que refletem a idade funcional e fisiológica, estes sofrem alterações significativas relacionadas com o envelhecimento e a sua evolução pode ser modificada através de intervenções/tratamentos que promovem a longevidade. A temperatura corporal e hormonas como a insulina e a DHEA-S (do inglês *dehydroepiandrosterone sulfate*) foram identificados como marcadores da longevidade em roedores e macacos. Presume-se que estes biomarcadores sejam indicadores da esperança de vida e que possam ser mensurados de forma confiável (133).

Hoje, sabe-se que a nutrição tem um papel fundamental na prevenção de doenças do envelhecimento como as Patologias cardiovasculares, a Diabetes tipo 2 e as Neoplasias.

Algumas estatísticas indicam que 80% dos casos de Doença Arterial Coronária e de Diabetes tipo 2, bem como 40% dos casos de neoplasias, podem ser prevenidos através da modificação dos hábitos alimentares (120). Informação obtida em estudos epidemiológicos e experimentais sugere que a ingestão calórica, e a frequência das refeições, assim como os nutrientes/alimentos que constituem a nossa dieta estão envolvidos na patogênese destas doenças e na biologia do próprio envelhecimento (112). Várias investigações associam a ingestão de proteína de origem animal, ácidos gordos saturados e sal a um elevado risco cardiovascular, assim com o protetor do consumo de frutos e vegetais. Recentemente foi demonstrado que o metabolismo por parte da flora intestinal da fosfatidilcolina e l-carnitina presentes na carne vermelha está associado a produção de N-óxido de trimetilamina que promove a aterosclerose que por sua vez aumenta o risco cardiovascular (134, 135). A dieta mediterrânea rica em alimentos de origem vegetal (legumes, vegetais, fruta, sementes, frutos secos, azeitonas), consumo limitado de alimentos de origem animal (carne vermelha e ovos), vinho tinto à refeição e com o peixe e o azeite virgem como fonte primária de gordura é um exemplo de dieta que demonstrou reduzir a incidência de Patologia cardiovascular, Diabetes tipo 2, Hipertensão Arterial e Obesidade (116). O estudo de indivíduos (homens e mulheres) que praticam um regime de RC com ingestão adequada de alimentos, nomeadamente os considerados no CRONies, demonstra uma proteção contra a Obesidade Abdominal, Diabetes tipo 2, Dislipidemia, Hipertensão Arterial, Doença Aterosclerótica e inflamação. Estes indivíduos apresentam uma melhoria de vários parâmetros metabólicos, como baixos valores de colesterol LDL e triglicéridos, pressão arterial sistólica extremamente baixa, baixos valores de proteína C-reativa e de glicose no sangue (80 mg/dl) e espessamento da artéria carótida comum muito inferior aos valores encontrados em indivíduos com dietas ocidentais. Apesar de algumas das alterações referidas anteriormente, também se encontrarem em indivíduos vegan estritos e sem restrição na ingestão calórica, outros parâmetros como o

colesterol HDL, a adiponectina, o TNF- α , a hormona triiodotironina e os níveis de glicémia não apresentam valores tão favoráveis, o que sugere a importância da RC além da qualidade da dieta (112). Estudos em vários modelos animais, demonstraram que a RC é também uma das mais potentes intervenções fisiológicas para proteção contra a incidência de cancro (136). Em humanos é consensual que o aumento da adiposidade está associado a um aumento da incidência de vários tipos de cancro, mas o efeito anti tumoral da RC em humanos ainda é desconhecido, apesar da melhoria de alguns parâmetros como a redução dos níveis de insulina, de hormonas sexuais e de citocinas inflamatórias, habitualmente envolvidos na Patologia neoplásica. Existe também uma forte associação entre a concentração sérica de IGF-1 e o risco de incidência de várias neoplasias (137). Os níveis de IGF-1 e de aminoácidos essenciais estimulam as vias de sinalização PI3K/AKT e mTOR que como referido anteriormente estão envolvidas no controlo da apoptose e proliferação celular, ou seja, no desenvolvimento de neoplasias e no envelhecimento. A sua inibição tem um papel crucial no atraso do envelhecimento e no aumento da longevidade (112, 113).

O estudo CALERIE(133) é o primeiro estudo randomizado que pretende examinar os efeitos da RC de longa duração no processo de envelhecimento em adultos não-obesos com o apoio do NIA e decorre em três centros clínicos (*Washington University, Tufts University, and Pennington Biomedical Research Center*). Numa primeira fase, 61 indivíduos foram sujeitos a um regime de RC de 20-30% durante 6-12 meses. Numa segunda fase que ainda se encontra em execução, pretende-se avaliar os efeitos da RC de 25% em 250 voluntários entre os 21 e os 45 anos. Os resultados da primeira fase do estudo foram favoráveis com redução dos valores de dois dos três biomarcadores de longevidade, da temperatura corporal e da concentração da insulina em jejum. Outras alterações positivas encontradas foram a redução da gordura visceral e subcutânea em 27% (sem alteração da distribuição no abdómen), redução da incidência de patologias do envelhecimento como a Diabetes tipo 2, melhoria da

sensibilidade à insulina (no entanto sem significância) e da resposta das células beta à glicemia, redução do risco cardiovascular em 28% (redução dos triglicerídeos, redução da pressão arterial sistólica, aumento do colesterol HDL), adaptação com redução do metabolismo energético e redução do *stress* oxidativo do ADN. Relativamente às adaptações endócrinas tal como nos CRONIEs, os resultados indicam uma redução dos níveis da hormona tiroideia T3 que está associada a uma redução da taxa metabólica. Outros parâmetros endócrinos como as concentrações de GH, IGF-1 e a DHEA-S não se encontravam alteradas, o que poderá estar relacionado com a curta duração do estudo e com a idade cronológica dos indivíduos do estudo na altura em que iniciaram o regime de RC, uma vez que macacos que iniciaram a restrição calórica em idades avançadas também não sofreram uma atenuação da diminuição dos valores da DHEA associada ao envelhecimento. Os níveis de atividade física espontânea não melhoraram, no entanto os participantes reportam uma melhoria da capacidade física. Um outro ponto de avaliação deste estudo foi a possibilidade de efeitos negativos da RC no bem-estar psicológico, funcionamento cognitivo e humor que são fundamentais para a qualidade de vida. Neste estudo a restrição calórica não foi associada ao desenvolvimento de sintomas de distúrbios alimentares, nem à redução da qualidade de vida, nem a humor depressivo ou disfunção cognitiva, na verdade muitos destes pontos até melhoraram (133) (Figura 2). Esta primeira fase do estudo dá-nos algumas informações sobre um regime de curta duração, para já ainda não há resultados da fase 2 que corresponde a um estudo de maior duração.

Resposta Comportamental/Psicológica

Desenvolvimento de sintomatologia de distúrbios alimentares

- ↓ Desinibição
- ↓ Compulsão alimentar
- ↓ Preocupação sobre a forma e tamanho corporal
- ↔ Medo de engordar
- Comportamento Purgativo/Bulímico

Humor Depressivo

- ↓ Avaliação multifatorial da escala de depressão de sintomas de distúrbio alimentares
- ↔ Classificação subjetiva da fome, sensação de estômago cheio e desejo de comer

Qualidade de vida

- ↑ Aptidão Física
- ↔ Vitalidade

Performance Cognitivo

- ↔ Memória Verbal
- ↔ Memória a curto-prazo e retenção

Figura 2. Sumário da resposta psicológica e comportamental a um regime de RC em humanos durante 6 meses.

Adaptado de Redman LM, Ravussin E. Caloric restriction in humans: impact on physiological, psychological, and behavioral outcomes. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(2):275-87. (133)

As únicas informações relativas a um regime de longa duração foram obtidas a partir do estudo da população de *Okinawan* (120), a população do mundo com maior longevidade, com uma alta prevalência de indivíduos centenários (50 por 100000 pessoas, 4-5 vezes superior à média da maioria dos países industrializados) e na qual os fatores nutricionais parecem ter um papel relevante. Esta população apresenta um perfil de doenças crônicas que contrasta com a maioria dos países desenvolvidos, como uma percentagem de mortalidade relacionada com a doença arterial coronária e com neoplasias muito inferior, 80% e 40% respetivamente, quando comparada com a população americana. A informação

epidemiológica, demográfica e nutricional de 5 décadas (da década de 50 até à década de 90) desta população sugere um déficit energético da população adulta consistente com um regime de restrição calórica (de 11% de acordo com a equação de *Harris Benedict*, 1785 Kcal por dia). As adaptações metabólicas a este regime incluem um baixo peso corporal, uma altura inferior e um baixo IMC (Índice de Massa Corporal). Poderia argumentar-se que esta longevidade poderia ser influenciada por fatores genéticos, no entanto a vantagem da longevidade "desapareceu" nas gerações mais jovens coincidindo com a alteração do regime alimentar. Há quem defenda esta alteração nas gerações mais jovens com base nas alterações epigenéticas resultantes da RC nas gerações anteriores, no entanto as alterações dos hábitos alimentares conjugada com estilo de vida pouco ativo das sociedade moderna explica perfeitamente o novo perfil dos habitantes mais jovens de Okinawa. Além da RC, as propriedades dos alimentos da dieta tradicional (alguns mimetizam os efeitos biológicos da RC) desta população também podem contribuir para esta longevidade excecional. As batatas-doces, açafrão, alimentos de origem marinha ricos em carotenoides (como as algas), gengibre e pimentos são alguns dos alimentos que fazem parte da dieta desta população. A sua dieta é rica em compostos como os carotenoides, flavonoides e outros fitoquímicos que mimetizam a restrição calórica e induzem uma resposta adaptativa ao *stress* oxidativo. Muitos destes compostos também funcionam como ativadores das sirtuinas e são potentes ativadores da transcrição do FOXO3 que tem um papel chave na via de sinalização insulina/IGF-1. Como referido anteriormente, variações alélicas do gene FOXO3 sugerem uma forte associação deste com a longevidade humana. A dieta da população de *Okinawa* sugere assim que uma dieta rica em alimentos de origem vegetal, fontes magras de proteína e gorduras saudáveis, o que se assemelha à dieta Mediterrânea, parece ser a escolha prudente para uma maior longevidade e maior qualidade de vida (120).

O estilo de vida tradicional mediterrâneo, além de ser caracterizado pelo consumo de determinados tipos de alimentos (já referidos) também se caracteriza pela prática de atividade física diária. Outros locais do mundo, incluindo Sardenha em Itália, Loma Linda na Califórnia, Península de Nicoya na Costa Rica e Icária na Grécia também pertencem à *Blue Zones*, um conceito usado para identificar áreas geográficas e demográficas onde as pessoas apresentam uma longevidade acima da média. Níveis elevados de atividade física diária, atitude positiva, dieta rica em fruta, plantas silvestres e vegetais, assim como um baixo consumo de carne são alguns dos hábitos de vida comuns a estas populações (116). O consumo de vegetais e fruta tem sido associado a uma redução da mortalidade em populações idosas, sobretudo devido à alta concentração de polifenóis, carotenoides, ácido fólico e vitamina C (116). O estudo da população de Icária, o consumo moderado de peixe demonstrou estar associado a uma baixa prevalência de sintomas depressivos e uma melhoria da função renal entre indivíduos idosos, sobretudo devido ao efeito anti-inflamatório e antioxidante dos ácidos gordos essenciais omega-3 (116). Um estudo também demonstrou que o consumo de azeite (rico em oleuropeína) característico da dieta Mediterrânea promove a redução da extensão do enfarte e a proteção do miocárdio da lesão oxidativa após um evento coronário agudo (138).

A influência da RC no atraso do processo de envelhecimento e na promoção da longevidade em humanos, ainda não é verdadeiramente conhecida. Os dados recolhidos de grupos sujeitos RC de longa duração como os CRONies e a população de *Okinawa* demonstram adaptações consistentes com um atraso do envelhecimento, no entanto é difícil perceber se a melhoria dos biomarcadores de longevidade, dos parâmetros metabólicos ou mesmo longevidade acima da média estão associados à redução da ingestão calórica ou à qualidade da dieta. É consensual que a dieta tem um papel crucial qualidade de vida e no atraso do envelhecimento, no futuro é necessário investigar se a RC por si só permite

influenciar a longevidade, bem como o nível de RC adequado a cada organismo e a idade ideal para se iniciar a RC. De acordo com alguns estudos, nomeadamente em roedores, é provável que a ingestão calórica adequada e essencial para uma vida saudável varie de indivíduo para indivíduo sendo por isso necessário descobrir biomarcadores que nos ajudem a ajustar o nível de RC a aplicar de modo a evitar a fome e a má nutrição. Um outro ponto que é necessário esclarecer com mais investigações, é a compreensão dos efeitos da ingestão proteica e influência da composição proteica da dieta no envelhecimento, independentemente de outros fatores de risco modulados pela RC.

Sirtuinas e miméticos da RC

A aplicação da RC em leveduras resultou na descoberta do papel das sirtuinas, uma família de genes que tem a sua atividade aumentada durante a RC, possivelmente responsável pela regulação da longevidade em vários organismos modelos, incluindo moscas e minhocas (139). Mais tarde, nos humanos foram identificados genes ortólogos das sirtuinas envolvidos na prevenção de patologias associadas ao envelhecimento (140). Os mamíferos têm 7 sirtuinas: a SIRT-1, a SIRT-6 e a SIRT-7 são nucleares, a SIRT-3, a SIRT-4 e a SIRT-5 são mitocondriais e a SIRT-2 é citoplasmática. O gene mais estudado da família das sirtuinas é o SIRT-1 (ortólogo do Sir2 da levedura) que está envolvido nas reações celulares de resposta ao *stress*, nomeadamente na resposta ao *stress* oxidativo através da desacetilação de fatores de transcrição da família FOXO que regulam genes antioxidantes como o SOD2 (141). O aumento da expressão deste gene em roedores e humanos demonstrou ser benéfico na prevenção e na evolução de determinadas patologias relacionadas com o envelhecimento, como a Doença de Alzheimer, a Diabetes, a Patologia cardiovascular, a Esteatose hepática e a resposta inflamatória (140, 141). Relativamente à sua influência na longevidade dos

mamíferos, nomeadamente ratos, o aumento da expressão genética do SIRT-1 especificamente a nível cerebral demonstrou estar associado com um aumento do tempo de vida. Apesar disso, o aumento da expressão deste gene em todo organismo não está relacionado com um aumento da longevidade (139). Ratinhos com um regime de RC vivem mais tempo, mas a atividade da SIRT-1 parece auxiliar a regulação das alterações fisiológicas e o aumento da longevidade, uma vez que um estudo com ratinhos SIRT-1 *knockout* num regime de RC resultou na redução do tempo de vida destes animais (142). Um estudo relativamente recente, sugere que a SIRT-6 tem potencial para influenciar a longevidade, uma vez que a ausência desta sirtuina em ratinhos está associada a um encurtamento da longevidade e o aumento da expressão desta em camundongos macho está associada a um aumento da longevidade (143).

Nos humanos, a única sirtuína que demonstrou estar verdadeiramente relacionada com a longevidade é a SIRT-3, já abordada anteriormente, em que alguns estudos demonstraram a associação de polimorfismos do seu *locus* genómico com um aumento da longevidade (139). Este gene também está envolvido na ativação de enzimas que têm um papel crucial na manutenção do nível celular das ROS. Um estudo com ratos SIRT-3 *knockout* demonstrou que estes não apresentavam redução da peroxidação lipídica e carbonilação proteica típica da RC (141). A SIRT-3 está aumentada em vários tecidos (músculo esquelético, tecido adiposo e tecido hepático durante a RC e é responsável pela ativação de enzimas importantes para este processo, envolvidas na oxidação de cadeias longas de ácidos gordos e na formação de cetonas (143). A RC também induz a expressão da SIRT-1 em humanos e a sua expressão está diminuída no tecido adiposo de indivíduos obesos. Um estudo demonstrou também que a prevenção da neuropatologia amiloide, típica da Doença de Alzheimer, através da RC, poderá estar relacionada com a ativação da SIRT-1 (144). Além disso, o resveratrol (um potente ativador da SIRT-1) induz um aumento da lipólise no tecido adiposo humano (141). As

sirtuínas reforçam a resistência das células dos mamíferos ao *stress*, ao regularem o metabolismo, a resposta inflamatória e aumentarem a capacidade para lidar com as ROS. Estes mecanismos perdem eficácia com o envelhecimento e por isso a estimulação da atividade das sirtuínas pode representar uma intervenção adequada para atenuar este declínio da função fisiológica no envelhecimento (143) (Figura 3).

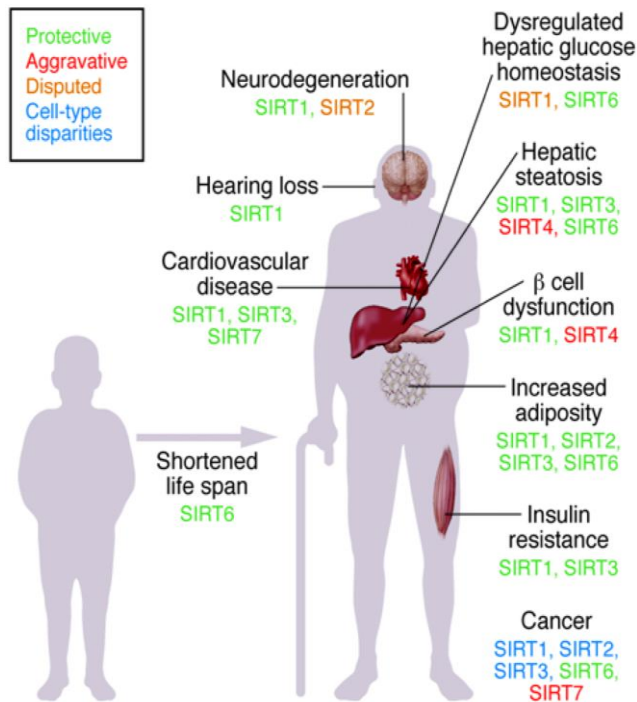


Figura 3 O efeito da ativação específica de determinada isoforma das sirtuínas nas doenças características do envelhecimento. Quando não há certeza na literatura se o mais benéfico é a ativação ou a inibição da sirtuína, estas são classificadas como “*disputed*”. No caso do cancro, o efeito antissupressor tumoral de algumas sirtuínas depende do tipo celular e do tecido e por isso classifica-se como “*cell-type disparities*”.

Hall JA, Dominy JE, Lee Y, Puigserver P. The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies. *J Clin Invest.* 2013;123(3):973-9. (143)

É consensual que a ativação das sirtuínas, sobretudo a SIRT-1 e SIRT-3, promove uma atenuação das alterações fisiológicas características do processo de envelhecimento dos mamíferos, nomeadamente dos humanos, e que a RC aumenta a sua expressão. No entanto a sua influência na longevidade humana, à exceção dos polimorfismos da SIRT-3, não parece ser significativa.

O resveratrol, um dos miméticos da RC mais amplamente estudado, é um polifenol abundante na casca das uvas vermelhas que chamou a atenção da comunidade científica pela sua associação com vários benefícios na saúde, nomeadamente melhoria da função cognitiva e

dos fatores de risco cardiovasculares. Este mimético que estimula a atividade SIRT-1 ou do ortólogo Sir2, tem um efeito positivo na longevidade semelhante ao da RC, demonstrado por alguns estudos que evidenciaram um aumento da longevidade de animais invertebrados como a minhoca, a mosca da fruta e a levedura. Em espécies superiores como os roedores, o aumento da longevidade com suplementação com resveratrol apenas foi evidente em animais com uma dieta altamente calórica e não com uma dieta padrão, apesar de atrasar o declínio cognitivo, fisiológico e vascular. Nos humanos, os benefícios do resveratrol são específicos de alguns tecidos, com melhoria dos fatores de risco cardiovasculares como a glicemia, a frequência cardíaca e os triglicérides. No entanto, a maioria dos estudos sugere que este tem um efeito cardioprotetor apenas nos indivíduos de risco, por exemplo uma investigação relativa à suplementação com resveratrol demonstrou um aumento da sensibilidade em indivíduos obesos mas não em indivíduos com um peso normal. Apesar de alguns efeitos semelhantes com a RC, como a melhoria do *stress* oxidativo e da sensibilidade à insulina, na minha opinião o resveratrol está longe de ser um bom mimético da RC capaz de atrasar o envelhecimento e influenciar a longevidade (121).

Influência do exercício físico no envelhecimento

O exercício físico pode ser definido como o uso dos músculos esqueléticos, numa sequência sistematizada de movimentos de diferentes segmentos corporais, executados de forma planeada e com um determinado objetivo a ser atingido. O exercício físico é acompanhado por aumento do gasto energético em relação ao estado de descanso.

Os efeitos do exercício físico, segundo alguns estudos em humanos, parecem resultar do aumento dos níveis da SIRT-1, da atividade da NAMPT (do inglês *Nicotinamide*

phosphoribosyltransferase), da GLUT4 (do inglês *Glucose transporter type 4*) e da PGC-1 α nuclear (do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptor gama coactivator 1 alfa*) acompanhados por um aumento da biogênese mitocondrial (145). A prática de exercício de *endurance* ao longo da vida, está associada a uma diminuição dos marcadores inflamatórios, melhoria da sensibilidade à insulina e diminuição dos triglicerídeos, independentemente da idade. A maioria dos estudos conclui que o aumento do tempo investido na prática de exercício físico diminui os níveis de PCR (do inglês *C-reactive protein*), de IL-6 (do inglês *Interleukin-6*) e em alguns casos de TNF-alfa (do inglês *Tumor Necrosis Factor α*), tanto em ratos como em humanos (45, 146). De referir que os níveis de IL-6 e PCR normalmente estão elevados na população idosa. Alguns estudos demonstraram que a prática de exercício físico previne o aumento da carbonilação proteica (marcador de stress oxidativo) associado ao envelhecimento e induz um aumento da atividade das enzimas antioxidantes como a GPX1 (do inglês *Glutathione Peroxidase 1*), a SOD2 (do inglês *Superoxide Dismutase 2*) e a catalase no músculo esquelético de ratos, assim como um aumento da atividade antioxidante no músculo esquelético humano (147, 148). Os idosos devem praticar exercício físico com intensidade apropriada à sua condição física, uma vez que uma intensidade desapropriada pode esgotar a atividade antioxidante que tem um papel fundamental ao prevenir/minimizar o aumento do *stress* oxidativo associado ao envelhecimento (148). Apesar do mecanismo pelo qual a atividade antioxidante é estimulada num curto período após o exercício ser desconhecido, a PGC-1 α (do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivador 1-alpha*) poderá ter um papel importante na redução dos níveis de TNF- α e no aumento dessa atividade antioxidante (147). Uma outra informação resultante de um estudo realizado com ciclistas demonstrou uma maior atividade das enzimas antioxidantes CAT (do inglês *Catalase*) e GPX em ciclistas profissionais relativamente a ciclistas amadores, o que sugere uma associação entre o aumento da atividade antioxidante e capacidade máxima

aeróbia ($VO_{2Máx}$)(148). Apesar de a prática regular de exercício resultar na diminuição dos níveis de IL-6, também é consensual que existe um aumento marcado dos níveis circulantes de IL-6 após a prática de exercício. A IL-6 estimula a entrada em circulação das citocinas anti-inflamatórias IL-1Ra (do inglês *Interleukin-1 receptor antagonist*) e IL-10, além de inibir a produção de TNF- α . É possível que, com a prática regular de exercício, os efeitos anti-inflamatórios destas sessões “agudas” de exercício, protejam o organismo contra a inflamação crónica sistémica característica do envelhecimento (149, 150).

Vários trabalhos de investigação indicam que a atividade física regular está associada a uma redução de aproximadamente 30% da mortalidade em geral e, por patologia cardiovascular em particular, tanto no género masculino, como no feminino (151). A redução deste risco corresponde entre 1 a 2 anos de vida adicional atribuídos a uma atividade física adequada em detrimento de um estilo de vida mais sedentário (152). Os benefícios da atividade física na mortalidade, sobretudo na mortalidade cardiovascular, estão relacionados com uma variedade de mecanismos protetores, incluindo efeitos na função endotelial, inflamação, densidade óssea, entre outros (152) (Figura 4).

Mecanismos Protetores

Melhoria da função endotelial e estabilidade das placas ateroscleróticas

Redução da inflamação sistêmica

Efeitos benéficos sobre a regulação autonômica da função cardiovascular

Melhor controle dos fatores de risco cardiovascular

- Aumento da concentração do colesterol HDL
- Redução dos triglicerídeos e do colesterol LDL
- Redução da pressão arterial
- Redução da massa gorda corporal
- Redução da resistência à insulina e melhoria do metabolismo da glicose

Potencial efeito antitrombótico e antiplaquetar

Mecanismos Cardíacos Intrínsecos

- Pré-condicionamento Isquêmico com redução da lesão do miocárdio após isquemia prolongada
- Prevenção das arritmias ventriculares induzidas por reperfusão

Melhoria da capacidade aeróbia (VO₂Máx)

- Redução da mortalidade em geral e da patologia cardiovascular em particular
- Melhoria da capacidade funcional, da qualidade de vida e da realização das atividades físicas diárias
- Melhoria da função pulmonar
- Melhoria da função hemodinâmica central (débito cardíaco/volume sistólico)
- Melhoria do metabolismo do músculo esquelético

Melhoria da função do músculo esquelético (resistência física)

- Melhoria da força e massa muscular desenvolvida pelos grupos musculares
- Melhoria da capacidade funcional muscular (resistência muscular)
- Melhoria da qualidade muscular, do recrutamento muscular e do tecido conectivo
- Redução dos défices funcionais e das comorbilidades
- Melhoria da qualidade de vida e da realização das atividades diárias de forma independente

Melhoria da densidade mineral óssea e da ultraestrutura óssea

Melhoria da função cromossômica

- Melhoria da atividade enzimática da telomerase
- Redução do encurtamento dos telómeros

Melhoria da função cognitiva (treino aeróbio e de resistência)

Figura 4. Mecanismos fisiopatológicos subjacentes ao efeito positivo do exercício físico.

Adaptado de Gremeaux V, Gayda M, Lepers R, Sosner P, Juneau M, Nigam A. Exercise and longevity. *Maturitas*. 2012;73(4):312-7. (152)

Um estudo desenvolvido em mulheres com idade compreendida entre os 34 e 59 anos e com estilo de vida sedentário (menos de 1h de atividade física por semana) conclui que estas apresentam um aumento de 52% no risco de mortalidade em geral, bem como um aumento da mortalidade por causa cardiovascular e neoplásica quando comparadas com mulheres ativas fisicamente (153, 154). Muitos outros trabalhos de investigação, além da redução do risco cardiovascular, demonstraram também uma relação inequívoca entre a atividade física regular e a redução do risco de Diabetes tipo 2, Osteoporose, Obesidade, Neoplasia do cólon e mama, Distúrbios de ansiedade e Depressão, bem como redução do risco de quedas, prevenção da disfunção cognitiva e melhoria da memória, da aprendizagem e da qualidade do sono (153, 155). Demonstrou-se também uma relação positiva entre a atividade física e a longevidade, com o aumento da intensidade do exercício físico a resultar em benefícios positivos, como é sugerido por estudos com ex-atletas olímpicos e atletas de alta competição que apresentam maior longevidade quando comparados com um grupo controlo de indivíduos sedentários (152). Apesar de não ser consensual a associação entre treinos de alta intensidade e a prevenção da mortalidade precoce em atletas de elite, a maioria dos estudos em humanos suporta que uma prescrição regular de exercício aeróbio de alta intensidade é uma intervenção útil para melhorar o estado de saúde e a longevidade da população em geral. Um exemplo contraditório é a história dos membros da equipa de remo de Harvard de 1948 que morreram prematuramente de patologia cardíaca (153). A incidência de morte súbita de causa cardíaca é também maior em jovens atletas do que em não atletas, o que pode ser explicado pela manifestação de doenças cardíacas hereditárias quando estes são sujeitos a níveis intensos de atividade física (153). A favor da atividade física intensa temos, como exemplos, os estudos com participantes do Tour de France, campeões de ski finlandeses e atletas praticantes de remo que demonstram uma relação positiva com a longevidade quando comparados com a população em geral (153). Um outro estudo de longa duração realizado em Copenhaga

conclui que a prática de *jogging* (considerado um exercício de alta intensidade) está associada a uma maior longevidade (superior a 6 anos que os não praticantes de *jogging*) (156). No entanto, este aumento da longevidade pode estar relacionado com o estilo de vida saudável dos praticantes de *jogging*, funcionando como variável de confundimento. Os benefícios do exercício incluem alguns dos benefícios da RC e outros distintos como a manutenção da capacidade aeróbia, da massa e força muscular e a melhoria do metabolismo óssea com prevenção da sarcopenia (2). Por isso, a combinação de RC com exercício físico pode maximizar os efeitos benéficos destas duas intervenções. Todas estas evidências sugerem que a prática regular de exercício físico moderado tem um papel preponderante no atraso do aparecimento de alterações associadas com o envelhecimento, na redução do risco de morte prematura e da qualidade de vida, mas sem atrasar o processo de envelhecimento. Tem assim, um papel muito importante na prevenção da mortalidade prematura e na realização de uma vida independente e ativa entre as pessoas idosas, mas sem alterar a longevidade máxima (2).

Uma população de 63 indivíduos de ambos os sexos (idades compreendidas entre 65 e 95 anos) provenientes da mesma instituição, ou seja com uma dieta semelhante, foi dividida em dois grupos de estudo: um de controlo e um grupo de exercício (157). O grupo de exercício foi por sua vez dividido em dois grupos, um grupo que praticou exercício aeróbio e outro que praticou treino de força, três vezes por semana durante 16 semanas. Este estudo concluiu que os dois tipos de treinos resultam em benefícios semelhantes nos indicadores metabólicos de saúde, nomeadamente HDL-C (do inglês *high Density lipoprotein cholesterol*), LDL-C (do inglês *Low density lipoprotein cholesterol*), DBP (do inglês *Diastolic blood pressure*), TG (do inglês *Triglycerides*), TC (do inglês *Total cholesterol*), BMI (do inglês *Body mass index*) e hs-CRP (do inglês *High-sensitivity C-reactive protein*) (157) (Figura 5).

	Before	After
Body weight [kg]	73.1 (11.0)	72.3 (10.7)*
Waist circumference [cm]	93.9 (10.1)	90.5 (10.0)**
Body mass index [kg.m ⁻²]	30.6 (5.0)	30.3 (4.9)*
Blood pressure [mm Hg]		
Systolic	149.1 (20.7)	149.8 (19.2)
Diastolic	76.6 (9.5)	74.2 (9.3)*
Triglycerides [mmol.L ⁻¹]	1.35 (0.58)	1.20 (0.54)*
Total cholesterol [mmol.L ⁻¹]	5.64 (0.86)	5.29 (1.03)*
HDL-cholesterol [mmol.L ⁻¹]	1.31 (0.25)	1.37 (0.32)*
LDL-cholesterol [mmol.L ⁻¹]	2.36 (0.77)	2.05 (0.86)**
Total Cholesterol/HDL-cholesterol	4.40 (0.92)	4.02 (0.81)**
hs-CRP [mg.L ⁻¹]	5.41 (3.94)	3.99 (1.97)*
6-minute walk distance [m]	387.0 (75.9)	437.2 (82.5)**

Values are mean (SD).

*p < 0.05, **p < 0.01 compared with before.

HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein.

Figura 5. Grupo de exercício.

Verissimo MT, Aragao A, Sousa A, Barbosa B, Ribeiro H, Costa D, et al. Effect of physical exercise on lipid metabolism in the elderly. *Rev Port Cardiol.* 2002;21(10):1099-112. (161)

Relativamente à intensidade do exercício físico, dois estudos de um mesmo autor, sendo um deles baseado em estudos observacionais, indicam que a intensidade está inversamente relacionada com a mortalidade (158, 159). No entanto, tal como é necessário um determinado nível de atividade física para obter resultados benéficos também existe um limite além do qual os efeitos adversos se sobrepõem aos benéficos (160). Num outro estudo, realizado em indivíduos com idades entre os 65 e 94 anos, integrados num programa de exercício físico durante 8 meses com intensidade entre 60-80% da frequência cardíaca de

reserva, implementado de forma gradual, obteve alterações lipídicas muito favoráveis (161). O programa de exercício aplicado, poderá ser um bom modelo para a população idosa, tendo em conta a ausência de complicações e a adesão ao programa durante o estudo. Relativamente ao tempo e à intensidade do exercício, um estudo recente indica que 15 minutos por dia ou 90 minutos por semana de exercício de intensidade moderada (4-6 MET (equivalentes metabólicos)) é o mínimo necessário para se obter benefícios relativamente à expectativa de vida, mesmo em indivíduos com risco cardiovascular (162). Com o desenvolvimento de algumas tecnologias, como um contador de passos, num estudo realizado com idosos da população japonesa de Nakanojo que utilizavam este dispositivo, chegou-se à conclusão que o limiar para uma melhoria do bem-estar físico é 8000 passos por dia e o limiar para uma melhor função cognitiva é 4000 passos por dia (152). A intensidade necessária também vai depender da capacidade física de cada um, por exemplo um estudo demonstrou que em mulheres sedentárias, um programa de 8 semanas de subida de escadas caracterizado por várias sessões de curta duração de atividade intensa resulta numa importante redução do risco cardiovascular (163). Baixo nível de atividade física cardiorrespiratória representa um fator preditivo de mortalidade tão ou mais forte que os fatores convencionais, como o fumo do tabaco e a hipercolesterolemia (163).

São necessários, no entanto, mais estudos para uma melhor compreensão de qual a intensidade, a duração e tipo de exercício que conferem melhores resultados, maiores benefícios para a saúde humana. Não há, no entanto, dúvidas que a atividade física é crucial para um envelhecimento saudável com manutenção do bem-estar físico e mental e independência funcional na ausência de doenças crónicas.

Conclusão

A complexidade do processo de envelhecimento é evidente ao longo deste trabalho de revisão, tal como a dificuldade do estudo do processo em humanos ou em organismos que permitam a extrapolação dos resultados para humanos. Apesar de ser consensual a influência da genética no envelhecimento e na longevidade (responsável por uma variação de 25% na esperança média de vida), a dificuldade em identificar os genes e os polimorfismos associados a um aumento da longevidade, bem como a replicação dos resultados em diferentes populações continua a ser um obstáculo. Até ao momento, o gene APOE e os polimorfismos FOXO3A são os genes melhor estudados e com resultados congruentes em diferentes populações. Tendo em conta a influência da genética no envelhecimento, a terapia génica poderá, no futuro, ser também de grande utilidade na promoção da longevidade.

Relativamente ao papel do *stress* oxidativo no envelhecimento, o conceito de *mitohormesis* veio revolucionar por completo a compreensão deste mecanismo. Por um lado, as ROS podem ser prejudiciais se presentes em níveis demasiado elevados no organismo, mas por outro lado, vários estudos sugerem a importância destas no normal funcionamento da sinalização celular em resposta a estímulos fisiológicos e fisiopatológicos, nomeadamente, na resposta antioxidante. Assim, no futuro será importante descobrir o nível adequado de ROS, que permita conjugar o seu papel benéfico com a ausência de toxicidade para o organismo.

A atividade do eixo mTOR é um bom exemplo da complexidade do processo do envelhecimento e da necessidade de integração de vários processos celulares para que se possa efetivamente obter resultados significativos no atraso do envelhecimento. Além de ser regulado por inúmeros fatores, é também responsável pela regulação de vários processos fisiológicos, como a tradução da mRNA, da autofagia, da atividade mitocondrial, entre outros. Nesta área, é evidente a escassez de estudos em mamíferos, sobretudo em humanos. O uso da

rapamicina, um inibidor farmacológico do eixo mTOR, numa estirpe de ratos demonstrou limitar a incidência de patologias do envelhecimento, no entanto o estudo de apenas uma estirpe é limitante. Um ponto importante nesta área, será esclarecer se os efeitos benéficos da rapamicina são dependentes ou independentes da atividade do eixo mTOR.

No que diz respeito aos telómeros, a ampla variabilidade do seu comprimento em indivíduos da mesma espécie e da mesma idade e a diferente velocidade de “erosão” nas células e tecidos do organismo humano, constituem um obstáculo à compreensão da sua influência no envelhecimento. Apesar disso, os resultados de vários estudos evidenciam uma forte associação entre telómeros mais curtos e o aumento da incidência de várias patologias características do envelhecimento, nomeadamente Patologia cardíaca, Patologia neurodegenerativa, bem como a sua associação a fatores relacionados com um estilo de vida menos saudável. O uso da telomerase, como intervenção terapêutica no envelhecimento, está associado a uma elevada incidência das neoplasias. O uso de um vírus recombinante como vetor num estudo com ratinhos demonstrou que é possível evitar este efeito adverso. Os resultados deste estudo foram muito benéficos, nomeadamente o atraso do desenvolvimento de osteoporose, a melhoria da função metabólica, a melhoria da coordenação neuromuscular e da capacidade cognitiva. Há, no entanto, algumas dúvidas quanto à validade da extrapolação destes resultados para humanos. De referir ainda a descoberta de possíveis biomarcadores do envelhecimento, neste caso de proteínas indicadoras de disfunção telomérica, que poderão ser de enorme utilidade clínica em terapias aplicadas a idosos.

Todos os mecanismos fisiopatológicos abordados demonstram ter um papel importante no processo de envelhecimento, apesar da dificuldade em avaliar a sua verdadeira influência, bem como o principal processo através do qual estes mecanismos exercem o seu papel. Na minha opinião, esta dificuldade deve-se sobretudo à complexidade dos vários processos celulares, de que é exemplo a via de sinalização mTOR envolvida em vários

processos celulares, o que torna difícil o estudo destes processos individualmente. Assim, podemos concluir que um envelhecimento saudável, sem a incidência de patologias do envelhecimento e com uma longevidade acima da média, resulta da capacidade de integração de todos estes mecanismos, uma vez que estes se encontram estreitamente relacionados, e de outros que não foram abordados ou que ainda estão por descobrir.

Na atualidade, as intervenções terapêuticas cujo papel no envelhecimento saudável reúne um maior consenso são a qualidade da dieta e a atividade física diária. A RC é uma intervenção que tem vindo a demonstrar alguns resultados positivos experimentalmente em vários organismos, não só no envelhecimento saudável, mas também como possível promotora da longevidade. Apesar dos resultados positivos da RC em vários organismos animais, os dois estudos com macacos *rhesus*, apresentam alguns resultados contraditórios. Os parâmetros metabólicos de ambos os estudos estão alterados favoravelmente, no entanto, apenas o estudo WNPRC demonstra um aumento da longevidade. Existem algumas variáveis que podem explicar esta diferença, assim como existem algumas variáveis que levantam a hipótese de o aumento da longevidade associado à RC, ser um fenómeno de laboratório. Algumas das condições dos estudos, não mimetizam as condições de vida dos animais em meio selvagem, nomeadamente, a qualidade da dieta e o nível de ingestão calórica. Nos humanos, apesar da lacuna relativa a estudos de longo prazo, os estudos de curto prazo evidenciam uma melhoria de vários parâmetros metabólicos e a redução de fatores de risco associados a patologias características do envelhecimento. Os CRONies e a população de *Okinawa* (com uma longevidade acima da média e com uma percentagem de mortalidade cardíaca e neoplásica muito inferior à média dos países desenvolvidos) são, até ao momento, os melhores exemplos de RC a longo prazo, conjugada com uma dieta de qualidade, rica em alimentos com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, o que torna difícil avaliar a influência da RC isoladamente.

Assim, com os resultados existentes até ao momento, podemos dizer que ainda existem muitas dúvidas relativamente ao efeito da RC no aumento da longevidade, em primatas não-humanos e em humanos, tendo em conta os resultados contraditórios e a escassez de estudos a longo prazo. Há, no entanto, algum consenso quanto à sua influência na melhoria da qualidade de vida, com a redução da incidência de comorbilidades associadas a patologias do envelhecimento. A resposta à RC parece ser influenciada pela informação genética e muito provavelmente não é a mesma entre indivíduos da mesma espécie. Assim, é importante que no futuro se recorra à utilização de biomarcadores do envelhecimento que ajudem a estabelecer tanto a idade ideal para se iniciar, como o nível de RC adequado para cada indivíduo. Uma outra questão que surgiu recentemente e que necessita de mais investigação, é a possibilidade de a redução da ingestão de uma determinada fonte de calorias, nomeadamente a restrição do aporte de metionina, poder ser mais importante que a redução da ingestão calórica total. Relativamente às sirtuínas, estas poderão ter um papel muito importante na resposta do organismo ao *stress*, ao regularem o metabolismo, a resposta inflamatória e a resposta às ROS. Além disso, a sua atividade pode explicar alguns dos benefícios da RC em humanos, sobretudo a atividade da SIRT1 e SIRT3, ao promover a atenuação das alterações fisiológicas características do processo de envelhecimento.

A prática de exercício físico a longo prazo, tem uma importante atividade anti-inflamatória e antioxidante, além de permitir a melhoria de vários indicadores metabólicos de saúde. Segundo um estudo realizado com pessoas de idade avançada (superior a 65 anos), não há diferenças entre os resultados obtidos após a prática de um treino aeróbio ou de um treino de força. A intensidade aplicada deve variar conforme a capacidade física de cada um, mas a idade não deve ser um impedimento para a sua prática. A redução do risco cardiovascular, de diabetes tipo 2 e de outras patologias associadas ao envelhecimento, bem como a melhoria do metabolismo ósseo, da função cognitiva e da capacidade física são alguns dos benefícios da

prática regular de exercício. Apesar de não alterar a longevidade máxima, previne a mortalidade prematura e promove a independência funcional das pessoas que é um parâmetro essencial para um envelhecimento saudável, com qualidade de vida.

Em conclusão final, a complexidade do processo de envelhecimento implica uma abordagem terapêutica também complexa e por isso parece-nos necessário integrar várias intervenções terapêuticas para que seja possível um envelhecimento saudável e um aumento significativo da longevidade. Como foi possível concluir do estudo de populações com longevidade acima da média, níveis elevados de atividade física diária, atitude positiva, baixo consumo de carne, dieta rica em vegetais e frutas são alguns dos hábitos comuns. Apesar da influência das abordagens terapêuticas referidas no aumento da longevidade ainda ser pouco consistente, não há dúvidas que estas têm um papel muito importante na melhoria de vários parâmetros metabólicos, na prevenção do desenvolvimento de patologias características do envelhecimento e conseqüentemente no envelhecimento saudável.

Referências bibliográficas

1. Newgard CB, Sharpless NE. Coming of age: molecular drivers of aging and therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* 2013;123(3):946-50.
2. Mercken EM, Carboneau BA, Krzysik-Walker SM, de Cabo R. Of mice and men: the benefits of caloric restriction, exercise, and mimetics. *Ageing Res Rev.* 2012;11(3):390-8.
3. Ageing and Life Course Programme Ws. Active Ageing: A Policy Framework. Madrid, Spain: A contribution of the World Health Organization to the Second United Nations World Assembly on Ageing; 2002
4. Janssen I, Shepard DS, Katzmarzyk PT, Roubenoff R. The healthcare costs of sarcopenia in the United States. *J Am Geriatr Soc.* 2004;52(1):80-5.
5. Callahan CM, Foroud T, Saykin AJ, Shekhar A, Hendrie HC. Translational research on aging: clinical epidemiology as a bridge between the sciences. *Transl Res.* 2014;163(5):439-45.
6. Gudmundsson H, Gudbjartsson DF, Frigge M, Gulcher JR, Stefansson K. Inheritance of human longevity in Iceland. *Eur J Hum Genet.* 2000;8(10):743-9.
7. Skytthe A, Pedersen NL, Kaprio J, Stazi MA, Hjelmborg JV, Iachine I, et al. Longevity studies in GenomEUtwin. *Twin Res.* 2003;6(5):448-54.
8. v BHJ, Iachine I, Skytthe A, Vaupel JW, McGue M, Koskenvuo M, et al. Genetic influence on human lifespan and longevity. *Hum Genet.* 2006;119(3):312-21.

9. Terry DF, Wilcox MA, McCormick MA, Pennington JY, Schoenhofen EA, Andersen SL, et al. Lower all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in centenarians' offspring. *J Am Geriatr Soc.* 2004;52(12):2074-6.
10. An W, Zhang L, Gong B, Ren S, Liu H. Screening of longevity-associated genes based on a comparison between dead and surviving populations. *Gene.* 2014;534(2):379-82.
11. Christensen K, Johnson TE, Vaupel JW. The quest for genetic determinants of human longevity: challenges and insights. *Nat Rev Genet.* 2006;7(6):436-48.
12. Chun SG, Shaeffer DS, Bryant-Greenwood PK. The Werner's Syndrome RecQ helicase/exonuclease at the nexus of cancer and aging. *Hawaii Med J.* 2011;70(3):52-5.
13. Dreesen O, Stewart CL. Accelerated aging syndromes, are they relevant to normal human aging? *Aging (Albany NY).* 2011;3(9):889-95.
14. Conneely KN, Capell BC, Erdos MR, Sebastiani P, Solovieff N, Swift AJ, et al. Human longevity and common variations in the LMNA gene: a meta-analysis. *Aging Cell.* 2012;11(3):475-81.
15. Tindale LC, Leach S, Ushey K, Daley D, Brooks-Wilson AR. Rare and common variants in the Apolipoprotein E gene in healthy oldest old. *Neurobiol Aging.* 2014;35(3):727.e1-3.
16. Chung WH, Dao RL, Chen LK, Hung SI. The role of genetic variants in human longevity. *Ageing Res Rev.* 2010;9 Suppl 1:S67-78.
17. van Heemst D, Beekman M, Mooijaart SP, Heijmans BT, Brandt BW, Zwaan BJ, et al. Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity. *Aging Cell.* 2005;4(2):79-85.

18. Bonafe M, Barbieri M, Marchegiani F, Olivieri F, Ragno E, Giampieri C, et al. Polymorphic variants of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor and phosphoinositide 3-kinase genes affect IGF-I plasma levels and human longevity: cues for an evolutionarily conserved mechanism of life span control. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(7):3299-304.
19. Li Y, Wang WJ, Cao H, Lu J, Wu C, Hu FY, et al. Genetic association of FOXO1A and FOXO3A with longevity trait in Han Chinese populations. *Hum Mol Genet.* 2009;18(24):4897-904.
20. Rose G, Dato S, Altomare K, Bellizzi D, Garasto S, Greco V, et al. Variability of the SIRT3 gene, human silent information regulator Sir2 homologue, and survivorship in the elderly. *Exp Gerontol.* 2003;38(10):1065-70.
21. Albani D, Ateri E, Mazzuco S, Ghilardi A, Rodilossi S, Biella G, et al. Modulation of human longevity by SIRT3 single nucleotide polymorphisms in the prospective study "Treviso Longeva (TRELONG)". *Age (Dordr).* 2014;36(1):469-78.
22. Bellizzi D, Rose G, Cavalcante P, Covello G, Dato S, De Rango F, et al. A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages. *Genomics.* 2005;85(2):258-63.
23. Lenaz G. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv Exp Med Biol.* 2012;942:93-136.
24. Dato S, Crocco P, D'Aquila P, de Rango F, Bellizzi D, Rose G, et al. Exploring the role of genetic variability and lifestyle in oxidative stress response for healthy aging and longevity. *Int J Mol Sci.* 2013;14(8):16443-72.

25. Ivanova DG, Yankova TM. The free radical theory of aging in search of a strategy for increasing life span. *Folia Med (Plovdiv)*. 2013;55(1):33-41.
26. Nathan AT, Singer M. The oxygen trail: tissue oxygenation. *Br Med Bull*. 1999;55(1):96-108.
27. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med*. 2005;11(12):1306-13.
28. Wei YH, Ma YS, Lee HC, Lee CF, Lu CY. Mitochondrial theory of aging matures--roles of mtDNA mutation and oxidative stress in human aging. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*. 2001;64(5):259-70.
29. Cooper JM, Mann VM, Schapira AH. Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of ageing. *J Neurol Sci*. 1992;113(1):91-8.
30. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 2007;12(5):913-22.
31. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(6):755-67.
32. Quick KL, Ali SS, Arch R, Xiong C, Wozniak D, Dugan LL. A carboxyfullerene SOD mimetic improves cognition and extends the lifespan of mice. *Neurobiol Aging*. 2008;29(1):117-28.

33. Shibamura A, Ikeda T, Nishikawa Y. A method for oral administration of hydrophilic substances to *Caenorhabditis elegans*: Effects of oral supplementation with antioxidants on the nematode lifespan. *Mech Ageing Dev.* 2009;130(9):652-5.
34. Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab.* 2007;6(4):280-93.
35. Ali SS, Marcondes MC, Bajova H, Dugan LL, Conti B. Metabolic depression and increased reactive oxygen species production by isolated mitochondria at moderately lower temperatures. *J Biol Chem.* 2010;285(42):32522-8.
36. El-Khoury R, Sainsard-Chanet A. Deletion of the mitochondrial NADH kinase increases mitochondrial DNA stability and life span in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Exp Gerontol.* 2010;45(7-8):543-9.
37. Yoshihara D, Fujiwara N, Suzuki K. Antioxidants: benefits and risks for long-term health. *Maturitas.* 2010;67(2):103-7.
38. Hercberg S, Ezzedine K, Guinot C, Preziosi P, Galan P, Bertrais S, et al. Antioxidant supplementation increases the risk of skin cancers in women but not in men. *J Nutr.* 2007;137(9):2098-105.
39. Puca AA, Carrizzo A, Villa F, Ferrario A, Casaburo M, Maciag A, et al. Vascular ageing: the role of oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(3):556-9.
40. Ristow M, Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(2):327-36.

41. Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol*. 2006;91(5):807-19.
42. Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, et al. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab*. 2005;1(6):401-8.
43. Chandel NS, Budinger GR. The cellular basis for diverse responses to oxygen. *Free Radic Biol Med*. 2007;42(2):165-74.
44. Veal EA, Day AM, Morgan BA. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell*. 2007;26(1):1-14.
45. Kalani R, Judge S, Carter C, Pahor M, Leeuwenburgh C. Effects of caloric restriction and exercise on age-related, chronic inflammation assessed by C-reactive protein and interleukin-6. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006;61(3):211-7.
46. Mendelsohn AR, Larrick JW. Dissecting mammalian target of rapamycin to promote longevity. *Rejuvenation Res*. 2012;15(3):334-7.
47. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*. 2009;460(7253):392-5.
48. Cornu M, Albert V, Hall MN. mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2013;23(1):53-62.

49. Weichhart T. Mammalian target of rapamycin: a signaling kinase for every aspect of cellular life. *Methods Mol Biol.* 2012;821:1-14.
50. Hu F, Liu F. Targeting tissue-specific metabolic signaling pathways in aging: the promise and limitations. *Protein Cell.* 2014;5(1):21-35.
51. Mansure JJ, Nassim R, Chevalier S, Rocha J, Scarlata E, Kassouf W. Inhibition of mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy in the management of bladder cancer. *Cancer Biol Ther.* 2009;8(24):2339-47.
52. Yang Z, Ming XF. mTOR signalling: the molecular interface connecting metabolic stress, aging and cardiovascular diseases. *Obes Rev.* 2012;13 Suppl 2:58-68.
53. Selman C, Tullet JM, Wieser D, Irvine E, Lingard SJ, Choudhury AI, et al. Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science.* 2009;326(5949):140-4.
54. Zinzalla V, Stracka D, Oppliger W, Hall MN. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell.* 2011;144(5):757-68.
55. Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaeberlein M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature.* 2013;493(7432):338-45.
56. Steffen KK, MacKay VL, Kerr EO, Tsuchiya M, Hu D, Fox LA, et al. Yeast life span extension by depletion of 60s ribosomal subunits is mediated by Gcn4. *Cell.* 2008;133(2):292-302.
57. Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature.* 2012;485(7396):109-13.

58. Cuervo AM, Dice JF. Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem.* 2000;275(40):31505-13.
59. Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet.* 2004;36(6):585-95.
60. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* 2005;39:359-407.
61. Pan Y, Schroeder EA, Ocampo A, Barrientos A, Shadel GS. Regulation of yeast chronological life span by TORC1 via adaptive mitochondrial ROS signaling. *Cell Metab.* 2011;13(6):668-78.
62. Polak P, Cybulski N, Feige JN, Auwerx J, Ruegg MA, Hall MN. Adipose-specific knockout of raptor results in lean mice with enhanced mitochondrial respiration. *Cell Metab.* 2008;8(5):399-410.
63. Liu Y. Rapamycin and chronic kidney disease: beyond the inhibition of inflammation. *Kidney Int.* 2006;69(11):1925-7.
64. Nuhrenberg TG, Voisard R, Fahlisch F, Rudelius M, Braun J, Gschwend J, et al. Rapamycin attenuates vascular wall inflammation and progenitor cell promoters after angioplasty. *Faseb j.* 2005;19(2):246-8.
65. Hidalgo M, Rowinsky EK. The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene.* 2000;19(56):6680-6.

66. Garber K. Rapamycin's resurrection: a new way to target the cancer cell cycle. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(20):1517-9.
67. Kopelovich L, Fay JR, Sigman CC, Crowell JA. The mammalian target of rapamycin pathway as a potential target for cancer chemoprevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(7):1330-40.
68. Neff F, Flores-Dominguez D, Ryan DP, Horsch M, Schroder S, Adler T, et al. Rapamycin extends murine lifespan but has limited effects on aging. *J Clin Invest.* 2013;123(8):3272-91.
69. Wilkinson JE, Burmeister L, Brooks SV, Chan CC, Friedline S, Harrison DE, et al. Rapamycin slows aging in mice. *Aging Cell.* 2012;11(4):675-82.
70. Miller RA, Harrison DE, Astle CM, Baur JA, Boyd AR, de Cabo R, et al. Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically heterogeneous mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2011;66(2):191-201.
71. Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. *Physiol Rev.* 2008;88(2):557-79.
72. Graakjaer J, Der-Sarkissian H, Schmitz A, Bayer J, Thomas G, Kolvraa S, et al. Allele-specific relative telomere lengths are inherited. *Hum Genet.* 2006;119(3):344-50.
73. Zijlmans JM, Martens UM, Poon SS, Raap AK, Tanke HJ, Ward RK, et al. Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(14):7423-8.
74. Surralles J, Hande MP, Marcos R, Lansdorp PM. Accelerated telomere shortening in the human inactive X chromosome. *Am J Hum Genet.* 1999;65(6):1617-22.

75. Martens UM, Zijlmans JM, Poon SS, Dragowska W, Yui J, Chavez EA, et al. Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat Genet.* 1998;18(1):76-80.
76. Calado RT, Young NS. Telomere diseases. *N Engl J Med.* 2009;361(24):2353-65.
77. Smogorzewska A, de Lange T. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *Embo j.* 2002;21(16):4338-48.
78. Calado RT, Dumitriu B. Telomere dynamics in mice and humans. *Semin Hematol.* 2013;50(2):165-74.
79. Gomes NM, Ryder OA, Houck ML, Charter SJ, Walker W, Forsyth NR, et al. Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination. *Aging Cell.* 2011;10(5):761-8.
80. Gomes NM, Shay JW, Wright WE. Telomere biology in Metazoa. *FEBS Lett.* 2010;584(17):3741-51.
81. Siegl-Cachedenier I, Munoz P, Flores JM, Klatt P, Blasco MA. Deficient mismatch repair improves organismal fitness and survival of mice with dysfunctional telomeres. *Genes Dev.* 2007;21(17):2234-47.
82. Gorbunova V, Seluanov A. Coevolution of telomerase activity and body mass in mammals: from mice to beavers. *Mech Ageing Dev.* 2009;130(1-2):3-9.
83. Garcia-Cao I, Garcia-Cao M, Tomas-Loba A, Martin-Caballero J, Flores JM, Klatt P, et al. Increased p53 activity does not accelerate telomere-driven ageing. *EMBO Rep.* 2006;7(5):546-52.

84. Leri A, Franco S, Zacheo A, Barlucchi L, Chimenti S, Limana F, et al. Ablation of telomerase and telomere loss leads to cardiac dilatation and heart failure associated with p53 upregulation. *Embo j.* 2003;22(1):131-9.
85. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature.* 2003;426(6963):194-8.
86. Mason PJ, Perdigonés N. Telomere biology and translational research. *Transl Res.* 2013;162(6):333-42.
87. Canela A, Vera E, Klatt P, Blasco MA. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(13):5300-5.
88. Ogami M, Ikura Y, Ohsawa M, Matsuo T, Kayo S, Yoshimi N, et al. Telomere shortening in human coronary artery diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(3):546-50.
89. Farzaneh-Far R, Cawthon RM, Na B, Browner WS, Schiller NB, Whooley MA. Prognostic value of leukocyte telomere length in patients with stable coronary artery disease: data from the Heart and Soul Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(7):1379-84.
90. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet.* 2003;361(9355):393-5.

91. Bischoff C, Petersen HC, Graakjaer J, Andersen-Ranberg K, Vaupel JW, Bohr VA, et al. No association between telomere length and survival among the elderly and oldest old. *Epidemiology*. 2006;17(2):190-4.
92. Honig LS, Schupf N, Lee JH, Tang MX, Mayeux R. Shorter telomeres are associated with mortality in those with APOE epsilon4 and dementia. *Ann Neurol*. 2006;60(2):181-7.
93. Panossian LA, Porter VR, Valenzuela HF, Zhu X, Reback E, Masterman D, et al. Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status. *Neurobiol Aging*. 2003;24(1):77-84.
94. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(49):17312-5.
95. Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet*. 2005;366(9486):662-4.
96. Kim S, Parks CG, DeRoo LA, Chen H, Taylor JA, Cawthon RM, et al. Obesity and weight gain in adulthood and telomere length. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(3):816-20.
97. Zhang X, Lin S, Funk WE, Hou L. Environmental and occupational exposure to chemicals and telomere length in human studies. *Occup Environ Med*. 2013;70(10):743-9.
98. Sun Q, Shi L, Prescott J, Chiuve SE, Hu FB, De Vivo I, et al. Healthy lifestyle and leukocyte telomere length in U.S. women. *PLoS One*. 2012;7(5):e38374.

99. Kim JH, Ko JH, Lee DC, Lim I, Bang H. Habitual physical exercise has beneficial effects on telomere length in postmenopausal women. *Menopause*. 2012;19(10):1109-15.
100. von Zglinicki T, Martin-Ruiz CM. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr Mol Med*. 2005;5(2):197-203.
101. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005;6(8):611-22.
102. Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, Kajigaya S, Baerlocher GM, Chanock SJ, et al. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N Engl J Med*. 2005;352(14):1413-24.
103. Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(18):7552-7.
104. Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2007;356(13):1317-26.
105. Jiang H, Schiffer E, Song Z, Wang J, Züribig P, Thedieck K, et al. Proteins Induced by Telomere Dysfunction and DNA Damage Represent Biomarkers of Human Aging and Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(32):11299-304.
106. Atzmon G, Cho M, Cawthon RM, Budagov T, Katz M, Yang X, et al. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Genetic variation in human telomerase is associated

with telomere length in Ashkenazi centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107 Suppl 1:1710-7.

107. Bernardes de Jesus B, Vera E, Schneeberger K, Tejera AM, Ayuso E, Bosch F, et al. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med*. 2012;4(8):691-704.

108. Gonzalez-Suarez E, Samper E, Ramirez A, Flores JM, Martin-Caballero J, Jorcano JL, et al. Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes. *Embo j*. 2001;20(11):2619-30.

109. Tomas-Loba A, Flores I, Fernandez-Marcos PJ, Cayuela ML, Maraver A, Tejera A, et al. Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell*. 2008;135(4):609-22.

110. Sachsinger J, Gonzalez-Suarez E, Samper E, Heicappell R, Muller M, Blasco MA. Telomerase inhibition in RenCa, a murine tumor cell line with short telomeres, by overexpression of a dominant negative mTERT mutant, reveals fundamental differences in telomerase regulation between human and murine cells. *Cancer Res*. 2001;61(14):5580-6.

111. Henriques CM, Ferreira MG. Consequences of telomere shortening during lifespan. *Current Opinion in Cell Biology*. 2012;24(6):804-8.

112. Rizza W, Veronese N, Fontana L. What are the roles of calorie restriction and diet quality in promoting healthy longevity? *Ageing Res Rev*. 2014;13:38-45.

113. Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science*. 2010;328(5976):321-6.

114. Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R, Smith-Wheelock M. 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*. 2005;4(3):119-25.
115. Mattson MP. Energy intake, meal frequency, and health: a neurobiological perspective. *Annu Rev Nutr*. 2005;25:237-60.
116. Chrysohoou C, Stefanadis C. Longevity and diet. Myth or pragmatism? *Maturitas*. 2013;76(4):303-7.
117. Rizza W, Veronese N, Fontana L. What are the roles of calorie restriction and diet quality in promoting healthy longevity? *Ageing Research Reviews*. 2014;13(0):38-45.
118. Robert L. Calorie-restriction and longevity. End of a dream, at least for primates? *European Geriatric Medicine*. 2013;4(2):129-32.
119. Fontana L, Klein S, Holloszy JO. Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production. *Age (Dordr)*. 2010;32(1):97-108.
120. Willcox BJ, Willcox DC. Caloric restriction, caloric restriction mimetics, and healthy aging in Okinawa: controversies and clinical implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2014;17(1):51-8.
121. Lam YY, Peterson CM, Ravussin E. Resveratrol vs. calorie restriction: data from rodents to humans. *Exp Gerontol*. 2013;48(10):1018-24.

122. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition*. 1989;5(3):155-71; discussion 72.
123. Masoro EJ. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev*. 2005;126(9):913-22.
124. Shimokawa I, Higami Y, Hubbard GB, McMahan CA, Masoro EJ, Yu BP. Diet and the suitability of the male Fischer 344 rat as a model for aging research. *J Gerontol*. 1993;48(1):B27-32.
125. Harper JM, Leathers CW, Austad SN. Does caloric restriction extend life in wild mice? *Aging Cell*. 2006;5(6):441-9.
126. Varady KA, Hellerstein MK. Alternate-day fasting and chronic disease prevention: a review of human and animal trials. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(1):7-13.
127. Gallinetti J, Harputlugil E, Mitchell JR. Amino acid sensing in dietary-restriction-mediated longevity: roles of signal-transducing kinases GCN2 and TOR. *Biochem J*. 2013;449(1):1-10.
128. Colman RJ, Beasley TM, Kemnitz JW, Johnson SC, Weindruch R, Anderson RM. Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nat Commun*. 2014;5:3557.
129. Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, et al. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature*. 2012;489(7415):318-21.

130. Messaoudi I, Fischer M, Warner J, Park B, Mattison J, Ingram DK, et al. Optimal window of caloric restriction onset limits its beneficial impact on T-cell senescence in primates. *Aging Cell*. 2008;7(6):908-19.
131. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*. 2009;325(5937):201-4.
132. Liao CY, Rikke BA, Johnson TE, Diaz V, Nelson JF. Genetic variation in the murine lifespan response to dietary restriction: from life extension to life shortening. *Aging Cell*. 2010;9(1):92-5.
133. Redman LM, Ravussin E. Caloric restriction in humans: impact on physiological, psychological, and behavioral outcomes. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(2):275-87.
134. Tang WHW, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, et al. Intestinal Microbial Metabolism of Phosphatidylcholine and Cardiovascular Risk. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(17):1575-84.
135. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature medicine*. 2013;19(5):576-85.
136. Longo VD, Fontana L. Calorie restriction and cancer prevention: metabolic and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci*. 2010;31(2):89-98.
137. Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, O'Dwyer ST, Shalet SM, Egger M. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet*. 2004;363(9418):1346-53.

138. Chrysohoou C, Pitsavos C, Metallinos G, Antoniou C, Oikonomou E, Kotroyiannis I, et al. Cross-sectional relationship of a Mediterranean type diet to diastolic heart function in chronic heart failure patients. *Heart Vessels*. 2012;27(6):576-84.
139. Guarente L. Calorie restriction and sirtuins revisited. *Genes Dev*. 2013;27(19):2072-85.
140. Robert L. Longevity and aging, genetic and post-genetic mechanisms. Which target to choose for postponing and treating age-related diseases. *European Geriatric Medicine*. 2012;3(1):61-6.
141. Pedersen SB, Olholm J, Paulsen SK, Bennetzen MF, Richelsen B. Low Sirt1 expression, which is upregulated by fasting, in human adipose tissue from obese women. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(8):1250-5.
142. Park S, Mori R, Shimokawa I. Do sirtuins promote mammalian longevity? A critical review on its relevance to the longevity effect induced by calorie restriction. *Mol Cells*. 2013;35(6):474-80.
143. Hall JA, Dominy JE, Lee Y, Puigserver P. The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies. *J Clin Invest*. 2013;123(3):973-9.
144. Qin W, Yang T, Ho L, Zhao Z, Wang J, Chen L, et al. Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *J Biol Chem*. 2006;281(31):21745-54.
145. Radak Z, Koltai E, Taylor AW, Higuchi M, Kumagai S, Ohno H, et al. Redox-regulating sirtuins in aging, caloric restriction, and exercise. *Free Radic Biol Med*. 2013;58:87-97.

146. Mikkelsen UR, Coupe C, Karlsen A, Grosset JF, Schjerling P, Mackey AL, et al. Life-long endurance exercise in humans: circulating levels of inflammatory markers and leg muscle size. *Mech Ageing Dev.* 2013;134(11-12):531-40.
147. Olesen J, Ringholm S, Nielsen MM, Brandt CT, Pedersen JT, Halling JF, et al. Role of PGC-1alpha in exercise training- and resveratrol-induced prevention of age-associated inflammation. *Exp Gerontol.* 2013;48(11):1274-84.
148. Ji LL, Leeuwenburgh C, Leichtweis S, Gore M, Fiebig R, Hollander J, et al. Oxidative stress and aging. Role of exercise and its influences on antioxidant systems. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;854:102-17.
149. Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2005;98(4):1154-62.
150. Nicklas BJ, Hsu FC, Brinkley TJ, Church T, Goodpaster BH, Kritchevsky SB, et al. Exercise training and plasma C-reactive protein and interleukin-6 in elderly people. *J Am Geriatr Soc.* 2008;56(11):2045-52.
151. Nocon M, Hiemann T, Muller-Riemenschneider F, Thalau F, Roll S, Willich SN. Association of physical activity with all-cause and cardiovascular mortality: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2008;15(3):239-46.
152. Gremeaux V, Gayda M, Lepers R, Sosner P, Juneau M, Nigam A. Exercise and longevity. *Maturitas.* 2012;73(4):312-7.
153. Vina J, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello V, Gomez-Cabrera MC. Exercise acts as a drug; the pharmacological benefits of exercise. *Br J Pharmacol.* 2012;167(1):1-12.

154. Hu FB, Willett WC, Li T, Stampfer MJ, Colditz GA, Manson JE. Adiposity as Compared with Physical Activity in Predicting Mortality among Women. *New England Journal of Medicine*. 2004;351(26):2694-703.
155. Nelson ME, Rejeski WJ, Blair SN, Duncan PW, Judge JO, King AC, et al. Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc*. 2007;39(8):1435-45.
156. Schnohr P, Marott JL, Lange P, Jensen GB. Longevity in male and female joggers: the Copenhagen City Heart Study. *Am J Epidemiol*. 2013;177(7):683-9.
157. Martins R, Verissimo M, Coelho e Silva M, Cumming S, Teixeira A. Effects of aerobic and strength-based training on metabolic health indicators in older adults. *Lipids in Health and Disease*. 2010;9(1):76.
158. Lee IM, Hsieh CC, Paffenbarger RS, Jr. Exercise intensity and longevity in men. The Harvard Alumni Health Study. *Jama*. 1995;273(15):1179-84.
159. Lee IM, Skerrett PJ. Physical activity and all-cause mortality: what is the dose-response relation? *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33(6 Suppl):S459-71; discussion S93-4.
160. Lee IM. Dose-response relation between physical activity and fitness: even a little is good; more is better. *Jama*. 297. United States 2007. p. 2137-9.
161. Verissimo MT, Aragao A, Sousa A, Barbosa B, Ribeiro H, Costa D, et al. Effect of physical exercise on lipid metabolism in the elderly. *Rev Port Cardiol*. 2002;21(10):1099-112.

162. Wen CP, Wai JP, Tsai MK, Yang YC, Cheng TY, Lee MC, et al. Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study. *Lancet*. 2011;378(9798):1244-53.

163. Boreham C, Kennedy R, Murphy M, Tully M, Wallace W, Young I. Training effects of short bouts of stair climbing on cardiorespiratory fitness, blood lipids, and homocysteine in sedentary young women. *British Journal of Sports Medicine*. 2005;39(9):590-3.