



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA A ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE
NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Paulo André Ferreira Soares Borges Lopes

**RESTRIÇÃO CALÓRICA E
ENVELHECIMENTO/LONGEVIDADE**

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE GERIATRIA

TRABALHO REALIZADO SOBRE A ORIENTAÇÃO DE:

Professor Doutor Manuel Teixeira Marques Veríssimo

Março de 2015

Índice

Resumo	4
<i>Abstract</i>	5
Lista de acrónimos	6
1 Introdução	7
2 Definição de restrição calórica.....	9
2.1 Restrição calórica ou alimentar?.....	10
2.2 Restrição calórica e jejum intermitente	11
3 Restrição calórica e envelhecimento/longevidade	13
3.1 Mecanismo biológico da restrição calórica	13
3.2 Efeitos no envelhecimento.....	16
3.2.1 Efeitos em doenças relacionadas com a idade	17
3.2.2 Efeitos na carcinogénese.....	19
3.2.3 Efeitos cardiovasculares.....	19
3.2.4 Efeitos a nível cerebral.....	21
3.2.5 Efeitos músculo-esqueléticos.....	22
3.2.6 Outros efeitos	23
3.3 Efeitos na longevidade.....	24
4 Outros métodos para prolongar a sobrevida	26
4.1 Miméticos da restrição calórica.....	26

4.2	Outras intervenções	28
5	Considerações finais	30
	Agradecimentos	31
	Referências bibliográficas.....	32

Resumo

A restrição calórica (RC) mostrou ser o método mais eficaz para aumentar a longevidade e retardar o envelhecimento em múltiplas espécies. Apesar de apresentar variados benefícios que se estendem a diversas espécies animais, os efeitos observados em mamíferos mereceram um lugar de destaque na bibliografia, já que têm o potencial de ajudar a prever os benefícios que resultarão da aplicação da RC em humanos. Este regime alimentar caracteriza-se por uma diminuição do aporte de calorias mantendo simultaneamente uma ingestão suficiente de micro e macronutrientes. Apesar de os seus efeitos na saúde se deverem principalmente à atenuação da desregulação da sensibilidade a nutrientes, processo que contribui para o envelhecimento, a RC também mostrou contrariar outros mecanismos causadores de envelhecimento. Em mamíferos, a RC demonstrou retardar a incidência de doenças relacionadas com a idade, melhorando a função metabólica e perfil lipídico e prevenindo a intolerância à glicose, a Diabetes *Mellitus* tipo II, as doenças autoimunes e as doenças do foro respiratório. Adicionalmente, mostrou gerar efeitos anticarcinogénicos, melhorar a função cardíaca diastólica, fornecer uma protecção extremamente forte contra a hipertensão arterial e a aterosclerose, prevenir o envelhecimento cerebral e diminuir a sarcopenia que ocorre com o envelhecimento. Ainda em mamíferos, a RC provou diminuir o risco de morte em 60% verificando-se uma maior influência deste regime alimentar em indivíduos do género feminino. Substâncias como a rapamicina, a metformina e o resveratrol, quando administrados como suplementos alimentares, mostraram ser miméticos da RC (MRC), despoletando alguns dos efeitos observados com este regime alimentar. Os MRC merecem um papel de destaque na literatura já que têm um verdadeiro potencial de causar um impacto na incidência de diversas patologias e na sobrevida do ser humano.

Abstract

Caloric restriction (RC) has proved to be most effective method to increase the longevity and to slow aging in multiple species. Despite showing many benefits that extend to several animal species, the effects observed in mammals deserve a prominent place in the literature, as they have the potential to help predict the benefits that would result from the application of RC in humans. This diet is characterized by a reduction in calorie intake while maintaining adequate intake of micronutrients and macronutrients. Despite their health effects being due primarily to the alleviation of the nutrient sensitivity deregulation, process known for its contribution to the aging phenomenon, RC has also showed to counter other mechanisms that lead to aging. In mammals, RC caused a delay in the incidence of age-related diseases, improving the lipid profile and metabolic function and preventing impaired glucose tolerance, type II Diabetes, autoimmune diseases and respiratory disorders. Additionally, it caused an anticarcinogenic effect, an improved diastolic cardiac function, a very strong protection against hypertension and atherosclerosis, a slower aging of the brain and a decrease in age-related sarcopenia. Moreover, in mammals, RC has proved to decrease the risk of death by 60% and to have a greater influence on the female gender individuals. Substances such as rapamycin, metformin and resveratrol, when administered as food supplements, proved to be mimetics of the RC regimen (MRC), triggering some of the effects observed with this diet. The MRC are worthy of a prominent role in literature since they have a real potential to make an impact on the incidence of various diseases and on the longevity of human beings.

Lista de acrónimos

AL – *Ad libitum*

AMP – *Adenosine monophosphate*

AMPK – *Adenosine monophosphate-activated protein kinase*

BDNF – Factor neurotrófico derivado do cérebro

GH – Hormona do crescimento

IGF-1 – *Insulin-like growth factor 1*

LDL – *Low-density lipoprotein*

MRC – Miméticos da restrição calórica

mTOR – *Mammalian target of rapamycin*

mTORC1 – Complexo 1 da mTOR

mTORC2 – Complexo 2 da mTOR

NAD⁺ – *Nicotinamide adenine dinucleotid* na forma oxidada

NO – Óxido nítrico

NT-3 – Neurotrofina-3

RC – Restrição calórica

TNF- α – Factor de necrose tumoral α

VLDL – *Very low-density lipoprotein*

1 Introdução

Foi em 1935 que McCay e seus colegas [1] descobriram que, em ratazanas, uma diminuição da ingestão alimentar em 40% conduzia a um aumento dramático da longevidade. Foi evidenciado que este efeito ocorria em ambos os sexos de diferentes estirpes de roedores e também em peixes, moscas e em pulgas-de-água [2]. Desde então, a restrição calórica (RC) tem-se tornado uma grande área de investigação em geriatria, tendo surgido posteriormente muitos outros estudos. Estas novas investigações foram conduzidas com o objectivo principal de entender melhor os benefícios que advêm da aplicação da RC em diferentes espécies, tentando ainda desvendar os mecanismos de acção que estão subjacentes a estes efeitos. Na verdade, tem existido, desde os anos 80, um aumento exponencial dos estudos publicados que se referem à RC [3]. Estes estudos vieram confirmar os resultados obtidos em 1935, realçando que este regime alimentar, sendo facilmente reprodutível, é o procedimento mais eficaz na extensão da sobrevida média e máxima na maioria das espécies testadas [2].

É importante destacar que muitas foram as espécies animais estudadas com vista a perceber as alterações que resultam da aplicação do regime alimentar referido. No entanto, e para o propósito da realização deste trabalho, recorrer-se-á principalmente a estudos em mamíferos, já que esta é a classe em que os animais têm o metabolismo que mais se assemelha ao do ser humano. O trabalho contemplará uma breve descrição do protocolo de RC e suas variantes, que se referem ao jejum intermitente e à restrição proteica, após da qual será realizada uma revisão sistemática do mecanismo de acção da RC e dos seus efeitos sobre o envelhecimento e sobre a longevidade, descrevendo-se de forma pormenorizada as suas consequências na homeostase de diferentes órgãos e sistemas. Por último, será realizada ainda

uma abordagem geral das substâncias que apresentam potencial de mimetizar os efeitos do regime alimentar em questão – os miméticos da restrição calórica (MRC).

2 Definição de restrição calórica

A RC refere-se a uma limitação do aporte de calorias ingeridas, independentemente do tipo de alimentos. Por outras palavras, define-se como uma diminuição da ingestão do número de calorias totais mantendo, ao mesmo tempo, um aporte de macro e micronutrientes suficiente para as necessidades energéticas do indivíduo. Não se deve portanto confundir RC com malnutrição [3, 4].

Quando se pretende restringir a alimentação de um mamífero, deve-se ter em conta que este é um processo com diversas complexidades e que, por essa razão, foram testados diferentes protocolos. O mais usado consiste na medição da alimentação *ad libitum*¹ (AL) ingerida pelo animal para posteriormente se poder reduzir até uma percentagem específica. Por exemplo, se a alimentação AL de uma cobaia é x gramas/dia e se se pretender diminuir este aporte em 40% deve-se administrar $0,6x$ gramas/dia. Este protocolo tem como desvantagem o facto de não se adaptar às variações das necessidades nutritivas ao longo da idade dos mamíferos, particularmente durante as fases de crescimento e maturidade, em que existe um aumento do normal aporte calórico, e de envelhecimento, que por sua vez corresponde a uma diminuição do mesmo. Trata-se assim de um método eficaz quando é aplicado após a maturidade do mamífero e por um período de tempo não muito longo [3].

Um outro processo testado consiste na medição de forma continuada do aporte AL de um grupo controlo com vista ao cálculo da restrição de calorias a aplicar a um outro grupo. Desta forma torna-se possível ajustar a alimentação do grupo em restrição nas diferentes fases de vida, usando o valor médio da ingestão AL do grupo controlo nas mesmas fases. Apesar de este protocolo resolver a questão do anterior, não tem em conta as variações metabólicas de

¹ Alimentação *ad libitum*: refere-se a um aporte alimentar não limitado.

cada indivíduo, o que pode adulterar alguns resultados. Por outro lado, se o grupo controlo tem acesso a alimentação AL poderá desenvolver obesidade, aumentando as suas necessidades calóricas e alterando de forma substancial os efeitos da restrição ao grupo em estudo. Por este motivo, muitos estudos optam por restringir ligeiramente (5-10%) a alimentação do grupo controlo, evitando assim a ocorrência de obesidade nos indivíduos [3, 4].

2.1 Restrição calórica ou alimentar?

A RC diminui o dano oxidativo ao organismo, o que contribui para o atraso do envelhecimento. No entanto, ainda não se sabe se esta diminuição é devido à restrição de calorias ou se é devido à restrição de um componente específico da dieta [5].

Num estudo realizado com camundongos procedeu-se à redução de 40% do aporte proteico da dieta de um grupo em estudo relativamente a um grupo controlo. Os resultados evidenciaram um atraso do envelhecimento devido a uma diminuição da produção mitocondrial de espécies reativas de oxigénio e também devido a uma redução do dano oxidativo ao DNA nuclear e mitocondrial. Estas alterações são também observadas quando se aplica 40% de RC. Este dado pode indicar que os efeitos benéficos deste procedimento possam ser consequência da restrição de um componente específico da dieta, nomeadamente proteico [5].

Foi também observado que os efeitos obtidos pela restrição proteica não são reprodutíveis através de dietas com restrição de 40% de lípidos [6] e de hidratos de carbono [7].

As proteínas são compostas de aminoácidos e, na verdade, foi identificado um aminoácido que, quando administrado em doses reduzidas, mimetiza alguns dos efeitos da restrição proteica. Este aminoácido corresponde à metionina. Uma restrição em 80% da metionina presente na dieta de camundongos causa uma diminuição significativa da produção mitocondrial de espécies reativas de oxigénio bem como do dano oxidativo ao DNA nuclear e mitocondrial, simulando a os efeitos já conhecidos da restrição proteica [8].

Por outro lado, quando se restringe os outros aminoácidos da dieta não se verificam alterações na geração de espécies reativas de oxigénio ou do dano oxidativo ao DNA nuclear ou mitocondrial [9]. Isto sugere que a metionina é o único responsável pelos efeitos da restrição proteica. Este trabalho terá como objectivo estudar os efeitos da RC, pelo que não irá incidir na restrição de proteínas.

2.2 Restrição calórica e jejum intermitente

Um outro protocolo surgiu com o intuito de simplificar os encargos experimentais acima descritos. Este consiste na administração de alimentação AL tanto para o grupo controlo como para o grupo experimental, sendo que este último grupo é submetido a períodos de jejum. Uma das variantes mais usadas deste protocolo é a alimentação em dias alternados, também denominado de jejum intermitente [10, 11].

Foi reportado que quando este protocolo é administrado em camundongos por tempo prolongado, o seu aporte alimentar total não é inferior quando comparado com o do grupo controlo. Isto acontece porque nos dias em que os ratos não têm acesso a comida, estes consomem o dobro do aporte diário do grupo controlo, compensando assim pelos dias que não têm esse acesso. No entanto, o grupo submetido a jejum intermitente obteve efeitos benéficos que igualaram ou superaram os obtidos pelo grupo em 40% de RC [10, 11].

Neste trabalho será apenas abordado o regime alimentar de RC (em que os animais têm acesso a alimentação todos os dias).

3 Restrição calórica e envelhecimento/longevidade

3.1 Mecanismo biológico da restrição calórica

Actualmente, ainda não é completamente conhecido o mecanismo biológico que leva ao normal envelhecimento. Acredita-se, no entanto, que seja um processo multifactorial que, à medida que a idade avança, culmina num acumular de lesões celulares. Foram identificados nove factores que representam denominadores comuns do envelhecimento em diferentes organismos, incluindo os mamíferos. Estes factores são [12]:

1. A instabilidade genómica, resultado do acumular de danos ao DNA endógenos ou exógenos ao longo da vida;

2. O atrito telomérico, devido à particular susceptibilidade que esta porção do cromossoma apresenta face ao acúmulo de danos no DNA;

3. As alterações epigenéticas, que envolvem mudança dos padrões de metilação do DNA, modificação das histonas após a translação e remodelações na cromatina;

4. A perda de proteases, que diminui os mecanismos de controlo das proteínas e, conseqüentemente, aumenta a expressão crónica de proteínas aglutinadas, não dobradas ou até mal dobradas;

5. A desregulação da sensibilidade a nutrientes, que aumenta com o envelhecimento devido a uma aumento da função dos receptores do *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) e da insulina bem como das funções da hormona de crescimento (GH);

6. A disfunção mitocondrial, que resulta da diminuição da eficácia da cadeia respiratória devido à perda de electrões e à diminuição da geração de ATP;

7. A senescência celular, que consiste na paragem do ciclo celular com alterações fenotípicas estereotipadas;

8. A exaustão das células estaminais, que causa a diminuição da capacidade regenerativa dos tecidos;

9. E a alteração da comunicação intercelular, quer de células endócrinas, neuronais ou até neuroendócrinas, que tende a desregular a sinalização neurohormonal (nomeadamente do sistema renina-angiotensina-aldosterona, do sistema adrenérgico, da sinalização insulina/IGF-1, entre outros).

As características destes factores possibilitam o seu agrupamento, dependendo do seu efeito preventivo ou causador do envelhecimento. Desta forma, surgem três grupos: o dos mecanismos primários, factores 1, 2, 3 e 4, cujos efeitos são inequivocamente nefastos; o dos mecanismos antagónicos, factores 5, 6 e 7, que podem ter efeitos benéficos se presentes em baixa intensidade e nefastos se se apresentarem em alta intensidade; e o grupo dos mecanismos integrativos, factores 8 e 9, que se manifesta de forma oposta ao anterior e em que os factores afectam directamente a homeostase e função dos tecidos [12]. A RC actua no envelhecimento atenuando o efeito de uma grande parte destes factores.

O mecanismo que envolve a desregulação da sensibilidade a nutrientes é talvez o mais influenciado pela RC. Em ratos de laboratório foi demonstrado que a RC inibe a actividade da via insulina/IGF-1 que é responsável pela sensibilidade à glicose. Por sua vez, esta inibição leva à activação de outras vias que contribuem para o atraso do envelhecimento, para a melhoria da saúde em geral e para o aumento da longevidade. Também foi demonstrado que os ratos com deficiência da GH (hormona responsável pela estimulação da produção de IGF-1) ou do seu receptor apresentam os mesmos efeitos, colocando assim em evidência a importância da IGF-1 no mecanismo biológico da RC. Em contraste, e como já foi referido, os ratos submetidos a elevadas concentrações de IGF-1 apresentam uma menor longevidade e uma maior incidência de carcinomas bem como doenças renais e neurodegenerativas. Como

seria de esperar, alterações das concentrações de insulina também contribuem para os efeitos já referidos [12, 13].

Também foram identificados outros sistemas relacionados com a sensibilidade a nutrientes que se encontram alterados quando se procede à RC, incluindo a *mammalian target of rapamycin* (mTOR), uma cinase responsável pela detecção de altas concentrações de aminoácidos; a *adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK), que detecta baixos níveis de energia na presença de altas concentrações de *adenosine monophosphate* (AMP); e sirtuinas, também responsáveis pela detecção de baixos níveis de energia mas apenas na presença de altas concentrações de *nicotinamide adenine dinucleotide* na forma oxidada (NAD⁺) [12].

A cinase mTOR é composta por dois complexos multiproteicos, o complexo 1 da mTOR (mTORC1) e o complexo 2 da mTOR (mTORC2), que regulam vários metabolismos anabólicos. Foi demonstrado que a inibição da mTORC1 atenua a longevidade obtida da RC em leveduras, vermes e moscas, destacando a importância deste complexo no mecanismo da RC [12]. Apesar de este complexo mTORC1 ter um papel de relevo na extensão da longevidade, também apresenta efeitos indesejáveis como o aumento da resistência à insulina, a diminuição da capacidade de cicatrização de feridas, as cataratas e a degeneração testicular em camundongos [12, 14].

A AMPK e as sirtuinas são outros sensores de nutrientes que sinalizam a falta de nutrientes, ao contrário do mTOR. Desta forma, a sua estimulação contribui para um envelhecimento saudável. A AMPK tem múltiplos efeitos sobre o organismo e, adicionalmente, apresenta uma acção inibitória sobre o complexo mTORC1 [12]. Por outro lado, existem também várias evidências de que as sirtuinas apresentam um papel importante na RC. De facto verificou-se que os substratos-alvo de vários subtipos de sirtuinas definem

algumas vias centrais da RC. Adicionalmente, camundongos com mutações ablativas de alguns subtipos de sirtuínas não apresentam benefícios metabólicos quando submetidos a RC [15].

Relativamente a outros mecanismos causadores de envelhecimento, a RC demonstrou-se capaz de: atenuar o atrito telomérico [16, 17]; diminuir as alterações epigenéticas evitando a modificação de histonas [12]; aumentar a autofagia, contribuindo para a destruição de proteínas e organelos defeituosos [18]; diminuir a disfunção mitocondrial por intermédio de sirtuínas, que aumentam a biogénese destes organelos e a remoção das mitocôndrias disfuncionais por autofagia [12, 17]; aumentar as funções das células estaminais no intestino e no músculo [12]; e melhorar as propriedades da comunicação intercelular perdidas com o envelhecimento [12].

Por último é importante referir um outro mecanismo que pode justificar alguns dos efeitos da RC – a *hormesis*. Este refere-se ao fenómeno em que a exposição a um agente ambiental que habitualmente é prejudicial (radiação, substâncias químicas, etc.) fornece um efeito benéfico quando é administrado em doses pequenas ou baixas concentrações. A RC já foi considerada um agente causador de *stress* de baixa intensidade que, conseqüentemente, causa uma resposta benéfica. Esta resposta contribui para tolerar adversidades ao activar as vias que cursam com o aumento da longevidade [19].

3.2 Efeitos no envelhecimento

Ao longo das últimas décadas foram identificados múltiplos efeitos da RC sobre a saúde que se estendem para diversas áreas de estudo. Nas secções seguintes procurar-se-á explorar pormenorizadamente as descobertas mais importantes que relacionam o protocolo de RC com o envelhecimento.

3.2.1 Efeitos em doenças relacionadas com a idade

Estudos realizados em camundongos evidenciaram que a RC sem subnutrição aumenta a longevidade por retardar a incidência de doenças relacionadas com a idade. Algumas dessas alterações incluem a diminuição do tamanho e da progressão de lesões ateroscleróticas quando comparadas com os roedores alimentados num regime AL. Adicionalmente, também se constatou em camundongos que a RC previne a diabetes, doenças autoimunes e do foro respiratório [20].

Já em macacos Rhesus, um estudo realizado durante 20 anos aplicou uma RC de 30% a 38 indivíduos e uma alimentação AL a outros 38. O primeiro grupo beneficiou de uma melhoria da função metabólica nomeadamente por aumento da sensibilidade à insulina associada à prevenção de diabetes e melhoria do perfil lipídico. Foi também evidente neste grupo uma diminuição da adiposidade central e total, da temperatura corporal, da inflamação e da triiodotironina (T3) do plasma. Verificou-se que os macacos em RC estavam totalmente protegidos para o desenvolvimento de obesidade, de intolerância à glicose (Figura 1A) ou de diabetes tipo II. Curiosamente, até os indivíduos que apresentavam alteração do metabolismo da glicose antes do estudo beneficiaram de uma total regressão destas alterações após o regime de RC [21].

Para além das alterações referidas, o grupo em RC, quando comparado com o grupo controlo, obteve uma redução total de 50% da incidência de doenças cardiovasculares e carcinomatosas (Figura 1, A e B). Como se apresenta na Figura 2, foi demonstrado ainda que os primatas sujeitos a RC tinham um aspecto biológico compatível com uma idade inferior quando comparados com o grupo controlo [21].

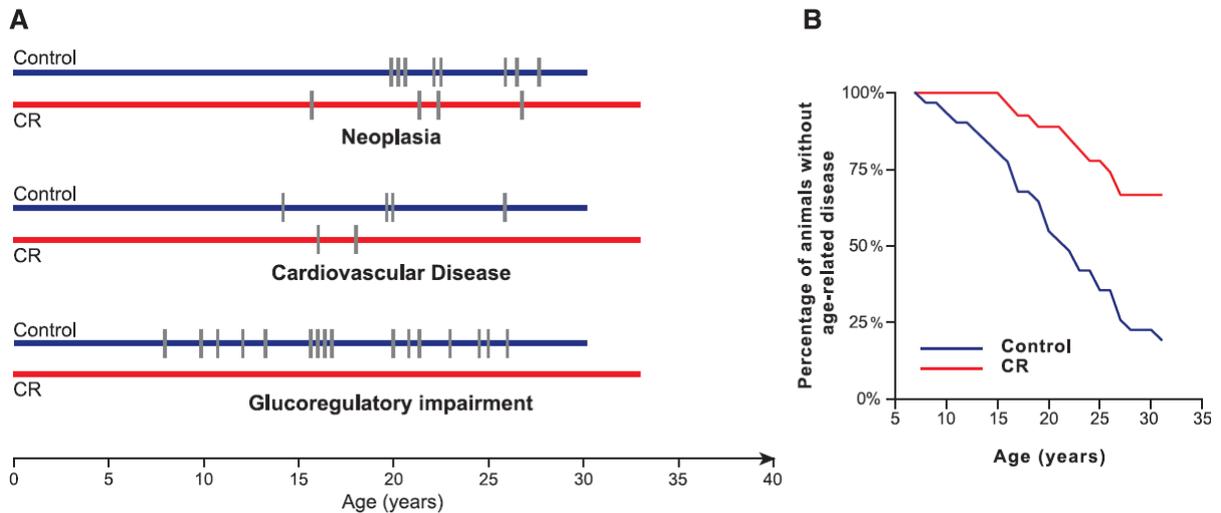


Figura 1 – Efeito da RC sobre as doenças relacionadas com a idade em macacos Rhesus. **(A)** Incidência de neoplasia, de doenças cardiovasculares e de intolerância à glicose. Traços a cinzento representam as idades em que surgiu a doença. **(B)** Representação da primeira ocorrência de qualquer doença relacionada com a idade em cada indivíduo [21].

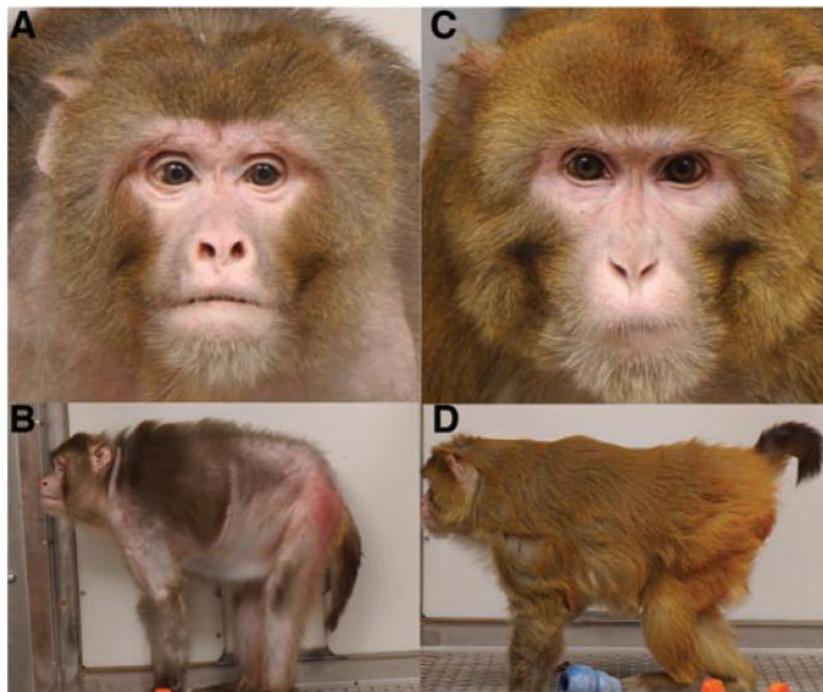


Figura 2 – Dois macacos Rhesus em idade avançada. As imagens **A** e **B** representam um animal do grupo controlo com 27,6 anos (idade da esperança média de vida da espécie). **C** e **D** representam um animal da mesma idade em 30% de restrição calórica [21].

3.2.2 Efeitos na carcinogénese

Os efeitos da RC na prevenção de neoplasias têm sido amplamente estudados nas últimas décadas. Uma meta-análise publicada em 2014 que englobava 44 estudos experimentais [22], em animais submetidos a regimes de RC, verificou que 40 destes ($\approx 91\%$) confirmaram os efeitos anticarcinogénicos deste protocolo. Nestes estudos as neoplasias mais estudadas foram as da mama, da próstata, do cérebro e do fígado.

No mesmo artigo [22] foi constatado que, em camundongos, a RC levou a uma diminuição da incidência de neoplasia da mama em cerca de 55%, ao comparar os grupos em restrição com os grupos controlo. Adicionalmente, também foram realçados alguns estudos em roedores com carcinoma mamário que evidenciaram um menor crescimento da massa tumoral e menor metastização nos grupos em RC relativamente aos grupos controlo. Este efeito protector da RC foi também associado a uma maior prevenção e menor progressão, quando presentes, das neoplasias prostática, cerebral, hepática e do cólon. É importante realçar que estes estudos foram realizados em animais e que ainda não são conhecidos os efeitos da RC em humanos, no que concerne à carcinogénese.

3.2.3 Efeitos cardiovasculares

O normal envelhecimento cursa com prejuízos potentes sobre o coração e sobre o sistema vascular. As alterações fisiológicas e anatómicas daí decorrentes podem não traduzir necessariamente um processo patológico mas sim um aumento da vulnerabilidade do organismo quando exposto a determinados estímulos. Estudos levados a cabo em roedores mostraram que uma RC sem subnutrição é capaz de abrandar os danos do envelhecimento

sobre a função ventricular e elasticidade vascular bem como melhorar a tolerância a variações da frequência cardíaca [23].

O envelhecimento vascular está associado a um aumento da produção mitocondrial de espécies reativas de oxigénio e a uma diminuição da activação do sistema antioxidante endógeno. Estes dois factores combinados culminam no aumento do stress oxidativo e das lesões vasculares. Como consequência destes efeitos surge um agravamento da inflamação vascular, que é considerada uma causa importante de aterogénese e que pode culminar no desenvolvimento de aterosclerose, à medida que o indivíduo envelhece. Por outro lado, as espécies reativas de oxigénio também se ligam ao óxido nítrico (NO) produzido pelas células endoteliais, diminuindo a sua biodisponibilidade no plasma. Tal como outros compostos produzidos pelas células endoteliais, o NO tem como função inibir a aderência de leucócitos e plaquetas à parede dos vasos, inibir a agregação plaquetar e suprimir a proliferação do músculo liso vascular. Esta substância é também o mais potente vasodilatador endógeno do organismo, diminuindo a pressão arterial [23, 24].

A RC tem-se demonstrado um potente atenuador tanto do dano oxidativo, como da inflamação vascular resultante. Ao diminuir as espécies reativas de oxigénio no plasma, este protocolo aumenta a biodisponibilidade do NO que, por sua vez, possibilita a ocorrência dos efeitos benéficos desta substância. A RC também influencia a diminuição da rigidez arterial que surge com o envelhecimento, por diminuir a acumulação de colagénio e aumentar a elastina vascular [23]. Em suma, a RC fornece uma protecção extremamente forte contra a hipertensão arterial e aterosclerose [24, 25].

A nível cardíaco, o envelhecimento cursa com hipertrofia ventricular esquerda e fibrose miocárdica. Por sua vez, estas alterações levam a uma diminuição da elasticidade cardíaca, a uma perda do enchimento inicial da diástole por pressão negativa e a uma maior dependência

auricular para o enchimento diastólico do coração. A RC mostrou prevenir a hipertrofia ventricular esquerda e melhorar a função diastólica. Adicionalmente, também foi evidenciado que a RC aumenta de forma dramática a tolerância a isquemia do miocárdio [17, 23, 24].

3.2.4 Efeitos a nível cerebral

O normal envelhecimento do cérebro é capaz de modificar certos domínios cognitivos como a capacidade de atenção e as capacidades sensitivas. Uma queixa muito comum e com grande potencial de afectar a qualidade de vida do idoso é o défice da memória e da habilidade de aprendizagem [4].

Num estudo de 2014 [26] foi observada a variação que certos parâmetros têm ao longo da idade em camundongos submetidos a 30% de RC, quando comparados com animais em alimentação AL. Os parâmetros avaliados incluem a memória e aprendizagem dependentes do hipocampo e os comportamentos de ansiedade. Como era esperado, observou-se que o grupo controlo piorou o seu desempenho à medida que a idade avançava. Por outro lado foi evidenciado que o grupo em RC obteve melhores desempenhos nos testes realizados, em todas as idades testadas, do que o grupo controlo. Desta forma, o estudo concluiu que, em roedores, a RC diminui os défices de memória e de aprendizagem dependentes do hipocampo, contribuindo ainda para a diminuição dos comportamentos de ansiedade relacionados com a idade.

O mesmo estudo [26] sugeriu que o declínio dos parâmetros supracitados com o normal envelhecimento se deveu à acumulação de proteínas defeituosas como consequência de uma menor autofagia das células nervosas. Propôs ainda que os efeitos observados com a RC resultam de uma maior preservação da capacidade de autofagia que tem a capacidade de diminuir a quantidade de proteínas defeituosas nas células.

Adicionalmente, a RC demonstrou ser capaz de prevenir o envelhecimento cerebral. Apesar de não se conhecer o mecanismo exacto que causa este efeito, uma possibilidade é de que existam alterações da neurogénese que diminuam o défice cognitivo relacionado com a idade. Um estudo em roedores mostrou que os animais submetidos a RC apresentavam uma maior quantidade de células nervosas no *gyrus dentatus* quando comparados com os do grupo submetido a alimentação AL. Para além disso, também se encontravam aumentados os níveis de factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e de neurotrofina-3 (NT-3), substâncias conhecidas pelo seu efeito positivo na sobrevivência neuronal e no aumento da neurogénese [4].

3.2.5 Efeitos músculo-esqueléticos

Com o envelhecimento, existe uma tendência natural para o desenvolvimento de debilidade musculoesquelética que pode influenciar fortemente a qualidade de vida. Dentro dos sintomas mais comuns desta debilidade encontram-se a deterioração da força, da agilidade e da coordenação [27].

A perda de massa muscular que se verifica com o avançar da idade está associada à perda de fibras musculares bem como à atrofia das fibras restantes. O mecanismo causal da perda de fibras ainda não está totalmente entendido mas crê-se que envolva um aumento da activação da apoptose. Este aumento poderá ser uma consequência da elevação do factor de necrose tumoral α (TNF- α), que se verifica com o normal envelhecimento [28].

Algumas evidências sugerem que a RC de longa duração tem múltiplos efeitos benéficos sobre a função músculo-esquelética. Estes efeitos incluem a atenuação da perda de massa muscular e da sua função à medida que a idade avança. A RC mostrou ainda diminuir a apoptose e o potencial apoptótico das células do músculo esquelético. Estas alterações

poderão ser consequência de uma diminuição do TNF- α plasmático que se verifica nos animais submetidos a RC. É importante referir que estas adaptações não são universais e podem manifestar-se de diversas maneiras em músculos diferentes [28].

A RC também é capaz de alterar certas características do esqueleto ósseo. Um estudo com roedores [29] observou os efeitos nos ossos de uma RC de 40% ao longo da idade, quando em comparação com um grupo controlo com alimentação AL. Este estudo observou que, em todas as idades, houve um aumento significativo das características estruturais ósseas do grupo em RC comparativamente ao grupo controlo. Por outro lado, não se observaram alterações significativas nas propriedades materiais dos ossos entre os dois grupos em estudo. Constatou-se também que a idade de início do protocolo de RC correlaciona-se fortemente com o grau de adaptação futura dos ossos, sendo que um início precoce é mais benéfico do que um início tardio [29].

3.2.6 Outros efeitos

Está bem documentado que o envelhecimento normal predispõe a um aumento da síntese de ácidos gordos que, consequentemente, aceleram a lipogénese. Estas alterações aumentam a incidência de patologias como a síndrome metabólica e degradam a função hepática. Foi observado que uma RC de longa duração aumenta a lipólise e a formação de corpos cetónicos. Associadamente, este protocolo diminui fortemente a lipogénese que, por sua vez, se manifesta pela redução das concentrações plasmáticas de: leptina, triglicéridos, *low-density lipoprotein* (LDL), *very low-density lipoprotein* (VLDL) e colesterol hepático. Todas estas alterações atenuam de forma significativa a deterioração da função e estrutura hepática relacionadas com a idade e diminuem ou evitam a incidência de obesidade [30].

Outras alterações que foram constatadas durante a realização do protocolo de RC incluem: níveis reduzidos de hormonas reguladoras da termogénese e do metabolismo celular (hormonas tiroideias, catecolaminas, entre outras); níveis reduzidos de hormonas anabólicas nomeadamente testosterona, estradiol e leptina; e níveis elevados de hormonas que suprimem a inflamação incluindo glicocorticóides, adiponectina e grelina [31].

3.3 Efeitos na longevidade

A diminuição do aporte de calorias ingeridas sem malnutrição já demonstrou em múltiplas espécies animais melhorar a sobrevida. Este aumento da longevidade pelo estabelecimento de um protocolo de RC é um conceito que, actualmente, é universalmente aceite. Como já referido anteriormente, as principais espécies animais em que se evidenciaram os efeitos da RC foram: a levedura (*Sacchromyces cerevisiae*), a nemátoda (*Caenorhabditis elegans*), a mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*), o camundongo (*Mus musculus*) e a ratazana (*Rattus norvegicus*). Muitas outras espécies foram estudadas mas estas em particular foram as mais amplamente recorridas para este propósito. Desta forma, mereceram um destaque na literatura, passando a denominar-se neste contexto, as “espécies modelo” [32]. Como já referido anteriormente, o protocolo da RC também foi estudado em macacos Rhesus. Este estudo teve um papel de relevo no panorama geral, devido à sua importância na previsão dos efeitos da RC no ser humano [21, 32].

Em roedores, a extensão da RC mostrou correlacionar-se directamente com a extensão da sobrevida média e máxima. No entanto, a longevidade não aumenta indefinidamente à medida que se aumenta a RC. Pelo contrário, verificou-se que os efeitos máximos deste protocolo se observam com restrições na ordem dos 55 a 60% e que, acima destes valores, começam a existir nos indivíduos efeitos negativos sobre a esperança média de vida. A idade

de começo do protocolo também demonstrou correlacionar-se directamente com a longevidade. Ainda assim, os indivíduos que iniciam este regime alimentar numa idade avançada continuam a beneficiar de um incremento da longevidade, apesar de este não ser tão elevado como se o regime se iniciasse mais cedo. Paradoxalmente, um início do protocolo de RC numa idade excessivamente avançada pode despoletar efeitos nefastos na saúde [3].

O estudo realizado em macacos Rhesus evidenciou que, dos 76 animais presentes na investigação, 37% dos primatas do grupo controlo (14 dos 38) morreram de causas relacionadas com a idade. Em comparação, apenas 13% dos macacos sujeitos a RC (5 em 38) morreram por estas mesmas etiologias. O estudo chegou à conclusão que, em qualquer altura da vida, o grupo controlo, quando comparado com o grupo em RC, tinha três vezes mais risco de morte por causas relacionadas com a idade [21].

Uma meta-análise englobando 145 estudos analisou a relação entre a RC e a longevidade resultante em 36 espécies. Globalmente, a RC diminuiu o risco de morte em 60% relativamente ao grupo controlo, quando ambos os grupos se encontravam na mesma idade. O efeito da RC na extensão da sobrevivência foi duas vezes mais evidente nas “espécies modelo” do que nas “espécies não-modelo” e, curiosamente, foi 20% menor em organismos do género masculino em comparação com o sexo oposto [32].

4 Outros métodos para prolongar a sobrevida

4.1 Miméticos da restrição calórica

Os efeitos da RC na saúde são notórios e têm um verdadeiro potencial para aumentar a longevidade humana. No entanto, na sociedade actual, a aplicação do regime de RC em humanos é impraticável. Na verdade, é consensual que a maior parte das pessoas prefere não restringir a sua alimentação quando na presença de fontes abundantes de alimentos, especialmente se existirem alternativas ao protocolo de RC que forneçam benefícios similares ou, por outras palavras, se existirem miméticos da RC (MRC) [33].

O MRC ideal seria um agente que, sendo consumido em associação com uma alimentação normal, causaria um aumento da longevidade e um atraso da incidência de doenças relacionadas com a idade, simulando os efeitos do regime alimentar de RC. Várias substâncias estão a ser testadas com este propósito em roedores [33]. Neste trabalho, serão destacados três MRC que já foram amplamente estudados: a rapamicina, a metformina e o resveratrol.

A rapamicina foi descoberta nos anos 60 na Ilha da Páscoa em bactérias do solo. Esta substância é um macrólido que, classificando-se como uma cinase, inibe de forma selectiva o mTOR. Mais precisamente inibe dois complexos, a mTORC1 (via de acção principal) e a mTORC2 (apenas recentemente se comprovou que existe alguma inibição deste último complexo, observando-se apenas quando há uma exposição crónica a rapamicina). A ingestão da rapamicina em camundongos mostrou aumentar de forma significativa a longevidade tanto em machos como em fêmeas. Adicionalmente, um derivado farmacológico desta substância também tem mostrado efeitos antitumorais em estudos com carcinomas avançados de células renais, glioblastomas, carcinomas da mama, neoplasia do endométrio, linfomas não-Hodgkin

e mielomas múltiplos [14, 33]. No entanto, a rapamicina também demonstrou alguns efeitos secundários, que incluem o seu efeito imunossupressor em humanos bem como o aumento da incidência de degeneração testicular e de cataratas em camundongos. Adicionalmente, também foi reportado que a substância em questão aumenta a resistência à insulina em algumas estirpes de roedores. Na verdade, estudos recentes mostraram que os efeitos da RC na longevidade (por intermédio da inibição da mTORC1, principal via de acção da rapamicina) não estão interligados com os efeitos na resistência à insulina (por intermédio da inibição da mTORC2). Por outro lado, a duração da administração da rapamicina pode condicionar efeitos paradoxais. Foi constatado que, em roedores, uma exposição de duas semanas a esta substância causa efeitos nefastos que incluem o aumento da resistência à insulina, da intolerância à glicose e da insulina no plasma e que, por outro lado, se a duração for de vinte semanas os efeitos observados são opostos [14]. Ainda não se sabe se a rapamicina ou seus derivados são seguros para a administração humana como protocolos anti-envelhecimento [33].

A metformina é um fármaco amplamente prescrito da categoria das biguanidas usado para o tratamento da Diabetes *Mellitus* tipo II. Actua principalmente ao reduzir a gluconeogénese hepática e ao aumentar a sensibilidade à insulina [14, 33]. É um potente activador da AMPK e inibe a mTOR. Em humanos, a suplementação com este fármaco mostrou diminuir a adiposidade e a mortalidade em diabéticos, sendo mais eficaz em indivíduos obesos e com resistência à insulina. Na verdade, um estudo com *microarrays* constatou que a metformina é capaz de induzir padrões de expressão genéticos que se assemelham aos observados com a aplicação do regime de RC [33]. Este fármaco também demonstrou melhorar a neurogénese e a memória espacial em camundongos adultos, reverter a esteatose em roedores obesos, atrasar a sarcopenia em homens idosos e diminuir o risco de neoplasia em diabéticos tipo 2 [14]. Apesar de estas informações serem promissoras, são

necessários mais estudos para mostrar se a metformina é capaz de aumentar a esperança média de vida de roedores, primatas e humanos saudáveis [33].

O resveratrol, por sua vez, trata-se de um polifenol pluripotente que se encontra no vinho tinto. Este é o MRC que mais gera debate acerca do seu efeito na longevidade e na saúde. Esta é uma substância activadora de sirtuinas que mostrou aumentar a longevidade em múltiplos organismos de curta vida que incluem leveduras, vermes, moscas e o peixe invertebrado *Nothobranchius furzeri*. O resveratrol mostrou mimetizar a RC em alguns aspectos essenciais, nomeadamente nos perfis de transcrição de genes, na sensibilidade à glicose e na *endurance* física. Mostrou ainda prevenir o aparecimento de esteatose em camundongos e diminuir a neurodegeneração em roedores com Alzheimer [14, 33]. Em ratos com idade avançada, também foi observado que a suplementação com resveratrol reduz de forma significativa os sinais de envelhecimento, demonstrando diminuição da albuminúria, da formação de cataratas e da inflamação/apoptose do endotélio vascular bem como um aumento da elasticidade da artéria aorta e preservação da densidade mineral óssea [34]. Apesar de causar os efeitos benéficos supracitados, a suplementação com resveratrol em roedores com uma alimentação AL não demonstrou aumento da longevidade [14, 33, 34].

4.2 Outras intervenções

Durante as últimas décadas houve imensos esforços de gerontologistas para identificar terapias ou métodos que sejam eficazes a aumentar a longevidade em humanos. Foi observado que várias intervenções no estilo de vida e na alimentação podem contribuir para um envelhecimento saudável e aumento da longevidade. Na verdade, um estudo realizado com a colaboração de múltiplos países Europeus concluiu que uma alimentação saudável (caracterizando-se por uma dieta Mediterrânea com predomínio de gorduras monoinsaturadas,

legumes, sementes, nozes, cereais, vegetais e frutas associada a ingestão moderada de álcool e carne) uma actividade física regular de grande ou média intensidade e o não-tabagismo se relacionavam directamente com a sobrevida em indivíduos idosos com 70 a 75 anos. Adicionalmente, os indivíduos do sexo masculino não-fumadores beneficiaram de um atraso da deterioração da saúde. Em mulheres não foi possível extrair conclusões no que toca aos efeitos do tabagismo já que a quantidade de fumadores do sexo feminino em indivíduos idosos era muito baixa. Já a actividade física mostrou atrasar a deterioração da saúde em homens e mulheres [35].

Para além destas intervenções no estilo de vida outros métodos foram testados, incluindo a suplementação com certas substâncias. A classe de substâncias mais amplamente estudadas foi, sem dúvida, a dos antioxidantes. Esta classe foi testada com base no pressuposto que as espécies reactivas de oxigénio são a causa do envelhecimento e que, se se contrariasse o efeito destes compostos poderia existir uma melhoria da longevidade. Na verdade, apesar de esta teoria continuar a ser invocada por muitos investigadores e pelo público em geral, estudos clínicos não demonstraram qualquer efeito dos antioxidantes sobre a extensão da sobrevida ou sobre a prevenção de doenças relacionadas com a idade. De facto, uma metanálise envolvendo mais de 230.000 participantes que consumiram suplementos de beta-caroteno, vitamina A, vitamina C, vitamina E ou selénio concluiu que não existia qualquer benefício para a longevidade, mostrando que estas suplementações podem, paradoxalmente, aumentar a mortalidade [33].

5 Considerações finais

A RC tem sido intensamente estudada nos últimos 30 anos e, de facto, tem mostrado melhorar de forma significativa tanto a sobrevivência como a prevenção de doenças em múltiplas espécies animais. Graças aos estudos realizados com este regime alimentar foi possível constatar ainda os seus efeitos benéficos na prevenção de patologias neurodegenerativas e cardiovasculares bem como sobre a carcinogénese e a diabetes, doenças conhecidas pela sua elevada prevalência na população mundial.

Na verdade os estudos em primatas não-humanos têm fornecido resultados promissores que indicam que a RC poderá ter os efeitos referidos em seres humanos. No entanto, é muito importante ter em conta que a sua aplicação em larga escala na nossa espécie é impraticável. Consequentemente, nos últimos anos a atenção foi desviada para as substâncias que, quando administradas como forma de suplementos alimentares, são capazes de mimetizar os efeitos obtidos com o regime de RC. Foram encontrados alguns potenciais MRC nomeadamente a rapamicina, a metformina e o resveratrol. Apesar dos efeitos destas substâncias ainda não estarem completamente esclarecidos, uma das substâncias, o resveratrol, já é amplamente distribuído como forma de suplemento dietético.

O exponencial progresso dos últimos anos no estudo dos efeitos da RC e dos seus miméticos aponta para a possibilidade de, num futuro recente, existirem fármacos verdadeiramente eficazes para aumentar a esperança média de vida e diminuir a incidência de diversas patologias potencialmente fatais. Se estes fármacos alguma vez serão aprovados para o consumo humano na ausência de qualquer patologia passível de ser “tratada”, isso ainda continuará uma questão em aberto.

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração e contributo, de forma directa ou indirecta, de determinadas pessoas a quem gostaria de deixar uma palavra de apreço.

Ao meu orientador, Professor Doutor Manuel Teixeira Marques Veríssimo, pela disponibilidade sempre presente para resolver todas as minhas dúvidas, pelas preciosas indicações acerca do rumo a seguir com este trabalho e pela constante simpatia e cordialidade demonstradas.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e incentivo que demonstraram durante a realização deste trabalho bem como durante todos os seis anos de curso e pelos vários sacrifícios que suportaram por mim.

Aos meus irmãos e irmãs, pelo tempo dispensado para a leitura deste trabalho e pelas pertinentes indicações que me facultaram.

Por último, aos meus amigos e colegas, pela colaboração, amizade e espírito de entajuda sempre presentes.

A todos reitero o meu profundo agradecimento.

Referências bibliográficas

1. McCay, C.M., M.F. Crowell, and L.A. Maynard, The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition*, 1935. 5(3): p. 155-71; discussion 172.
2. Masoro, E.J., Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol*, 2000. 35(3): p. 299-305.
3. Speakman, J.R. and S.E. Mitchell, Caloric restriction. *Mol Aspects Med*, 2011. 32(3): p. 159-221.
4. Arslan-Ergul, A., A.T. Ozdemir, and M.M. Adams, Aging, neurogenesis, and caloric restriction in different model organisms. *Aging Dis*, 2013. 4(4): p. 221-32.
5. Ayala, V., et al., Dietary protein restriction decreases oxidative protein damage, peroxidizability index, and mitochondrial complex I content in rat liver. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2007. 62(4): p. 352-60.
6. Sanz, A., et al., Effect of lipid restriction on mitochondrial free radical production and oxidative DNA damage. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. 1067: p. 200-9.
7. Sanz, A., et al., Carbohydrate restriction does not change mitochondrial free radical generation and oxidative DNA damage. *J Bioenerg Biomembr*, 2006. 38(5-6): p. 327-33.

-
8. Sanz, A., et al., Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. *Faseb j*, 2006. 20(8): p. 1064-73.
 9. Caro, P., et al., Effect of 40% restriction of dietary amino acids (except methionine) on mitochondrial oxidative stress and biogenesis, AIF and SIRT1 in rat liver. *Biogerontology*, 2009. 10(5): p. 579-92.
 10. Anson, R.M., B. Jones, and R. de Cabod, The diet restriction paradigm: a brief review of the effects of every-other-day feeding. *Age (Dordr)*, 2005. 27(1): p. 17-25.
 11. Anson, R.M., et al., Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(10): p. 6216-20.
 12. Lopez-Otin, C., et al., The hallmarks of aging. *Cell*, 2013. 153(6): p. 1194-217.
 13. Bartke, A., Minireview: role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. *Endocrinology*, 2005. 146(9): p. 3718-23.
 14. Selman, C., Dietary restriction and the pursuit of effective mimetics. *Proc Nutr Soc*, 2014. 73(2): p. 260-70.
 15. Guarente, L., Calorie restriction and sirtuins revisited. *Genes Dev*, 2013. 27(19): p. 2072-85.
 16. Vera, E., et al., Telomerase reverse transcriptase synergizes with calorie restriction to increase health span and extend mouse longevity. *PLoS One*, 2013. 8(1): p. e53760.
 17. Makino, N., et al., Calorie restriction increases telomerase activity, enhances autophagy, and improves diastolic dysfunction in diabetic rat hearts. *Mol Cell Biochem*, 2015.

-
18. Salminen, A. and K. Kaarniranta, Regulation of the aging process by autophagy. *Trends Mol Med*, 2009. 15(5): p. 217-24.
 19. Masoro, E.J., The role of hormesis in life extension by dietary restriction. *Interdiscip Top Gerontol*, 2007. 35: p. 1-17.
 20. Omodei, D. and L. Fontana, Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS Lett*, 2011. 585(11): p. 1537-42.
 21. Colman, R.J., et al., Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 2009. 325(5937): p. 201-4.
 22. Lv, M., et al., Roles of Caloric Restriction, Ketogenic Diet and Intermittent Fasting during Initiation, Progression and Metastasis of Cancer in Animal Models: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 2014. 9(12): p. e115147.
 23. Weiss, E.P. and L. Fontana, Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. 301(4): p. H1205-19.
 24. Sung, M.M. and J.R. Dyck, Age-related cardiovascular disease and the beneficial effects of calorie restriction. *Heart Fail Rev*, 2012. 17(4-5): p. 707-19.
 25. Bales, C.W. and W.E. Kraus, Caloric restriction: implications for human cardiometabolic health. *J Cardiopulm Rehabil Prev*, 2013. 33(4): p. 201-8.
 26. Yang, F., et al., mTOR and autophagy in normal brain aging and caloric restriction ameliorating age-related cognition deficits. *Behav Brain Res*, 2014. 264: p. 82-90.
 27. Arum, O., et al., Prevention of Neuromusculoskeletal Frailty in Slow-Aging Ames Dwarf Mice: Longitudinal Investigation of Interaction of Longevity Genes and Caloric Restriction. *PLoS One*, 2013. 8(10).

-
28. Dirks, A.J. and C. Leeuwenburgh, Tumor necrosis factor alpha signaling in skeletal muscle: effects of age and caloric restriction. *J Nutr Biochem*, 2006. 17(8): p. 501-8.
 29. Westerbeek, Z.W., R.T. Hepple, and R.F. Zernicke, Effects of aging and caloric restriction on bone structure and mechanical properties. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2008. 63(11): p. 1131-6.
 30. Kuhla, A., et al., Lifelong caloric restriction reprograms hepatic fat metabolism in mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2014. 69(8): p. 915-22.
 31. Fontana, L. and S. Klein, Aging, adiposity, and calorie restriction. *Jama*, 2007. 297(9): p. 986-94.
 32. Nakagawa, S., et al., Comparative and meta-analytic insights into life extension via dietary restriction. *Aging Cell*, 2012. 11(3): p. 401-9.
 33. Minor, R.K., et al., Dietary interventions to extend life span and health span based on calorie restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2010. 65(7): p. 695-703.
 34. Pearson, K.J., et al., Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab*, 2008. 8(2): p. 157-68.
 35. Haveman-Nies, A., L.C. de Groot, and W.A. van Staveren, Dietary quality, lifestyle factors and healthy ageing in Europe: the SENECA study. *Age Ageing*, 2003. 32(4): p. 427-34.