



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

JOÃO RUI CORREIA DE CARVALHO E CRUZ

***Influência da Nutrição no Envelhecimento - Mecanismos
Fisiopatológicos***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE FISIOPATOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

PROFESSORA DOUTORA ANABELA MOTA PINTO

PROFESSORA DOUTORA CATARINA ALEXANDRA DOS REIS VALE GOMES

MARÇO/2018

Sumário

Resumo	3
<i>Abstract</i>	4
Palavras-chave	5
<i>Key-words</i>	5
Introdução.....	5
Materiais e Métodos	7
Restrição Calórica.....	8
Sirtuínas	8
Dinucleótido de nicotinamida e adenina.....	10
SIRT1	13
SIRT2.....	18
SIRT3.....	20
SIRT4.....	21
SIRT5.....	22
SIRT6.....	23
SIRT7	27
Restrição calórica - efeitos na saúde e envelhecimento	28
Dieta mediterrânea – efeitos na saúde e envelhecimento.....	31
Miméticos da restrição calórica e seus efeitos na saúde e envelhecimento.....	34
Discussão e Conclusão	37

Agradecimentos	40
Referências bibliográficas	41

Resumo

O envelhecimento é um processo fisiopatológico que resulta em alterações estruturais e funcionais que se associam a doenças crônicas e incapacitantes, impossibilitando a manutenção dos sinais vitais. Com a inversão demográfica existente nos países desenvolvidos, aumentou o estudo de intervenções comportamentais. A restrição calórica é o regime alimentar mais consistente no aumento da longevidade e tem efeitos benéficos em doenças cardiovasculares, na diabetes *mellitus* e doenças neurodegenerativas. Atua por uma variedade de mecanismos, destacando-se as sirtuínas e as suas vias metabólicas, que regulam o metabolismo lipídico e glicídico, aumenta a eficácia do metabolismo mitocondrial, tem efeitos anti-inflamatórios, de supressão tumoral e participa na regulação epigenética. Dada a dificuldade em conduzir estudos no ser humano e a existência de efeitos secundários, aumentou o estudo de outros regimes alimentares com efeitos benéficos na longevidade e saúde que mimetizassem a restrição calórica, como a dieta mediterrânica. Os seus mecanismos de ação ainda não estão esclarecidos, no entanto, alguns dos seus compostos como o resveratrol, encontrado na uva e vinho tinto, atuam como miméticos da restrição calórica pela ativação das sirtuínas. Este é o composto natural ativador das sirtuínas, mais potente, e apresenta resultados positivos no metabolismo glicídico, a nível cardiovascular e de neuroprotecção. No entanto, dadas a existência de limitações, o estudo e desenvolvimento de ativadores sintéticos é uma área promissora no objetivo de aumentar a longevidade com um envelhecimento saudável. Esta dissertação teve por objetivos: identificar o paralelismo fisiopatológico entre a restrição calórica e a dieta mediterrânica e os seus efeitos na saúde e no envelhecimento; identificar e compreender a relação das sirtuínas com as doenças associadas ao envelhecimento. Para isso realizou-se uma pesquisa bibliográfica na base de dados *Pubmed* onde se obtiveram os artigos para a realização deste trabalho.

Abstract

Aging is a pathophysiological process that results in structural and functional modifications that are associated with chronic and incapacitating diseases, making it impossible to maintain vital signs. With the demographic inversion existing in developed countries, the study of behavioural interventions increased. Caloric restriction is the most consistent diet therapy in increasing longevity and has beneficial effects on cardiovascular diseases, diabetes mellitus and neurodegenerative diseases. It acts by multiple mechanisms, highlighting the sirtuins and their metabolic pathways, which regulate lipid and glucose metabolism, has anti-inflammatory and tumor suppressor effects and participates in epigenetic regulation. Given the difficulty in conducting studies in humans and the existence of side effects, the study of other diet therapies with beneficial effects on life and healthspan that mimic caloric restriction, such as the mediterranean diet, was increased. Its mechanisms are still unclear, however, some of its compounds such as resveratrol, found in grape and red wine, act as mimetics of caloric restriction by the activation of sirtuins. This is the most potent natural sirtuin activating compound and has positive results in glucose metabolism, at cardiovascular and neuroprotection levels. Still, given the existence of limitations, the study and development of synthetic activators is a promising area to increase lifespan with a healthy aging. The objectives of this article were: to identify the pathophysiological parallel between caloric restriction and the mediterranean diet and their effects on health and aging; to identify and understand the relationship between sirtuins and aging-associated diseases. To accomplish that, a literature search was performed in the Pubmed database, where the articles were obtained for the accomplishment of this work.

Palavras-chave

Dietoterapia; restrição calórica; dieta mediterrânea; sirtuínas; polifenóis; envelhecimento.

Key-words

Diet therapy; caloric restriction; diet, mediterranean; sirtuins; polyphenols; aging.

Introdução

O envelhecimento é um processo fisiopatológico associado a uma acumulação progressiva de múltiplos danos moleculares e celulares, que afetam de forma heterogénea o organismo, quer a nível individual (os diferentes órgãos e tecidos apresentam ritmos diferentes) quer a nível de interindividual (ritmo de envelhecimento diferente em cada indivíduo). Com o tempo, estas modificações resultam em alterações estruturais e funcionais que impossibilitam a manutenção das funções vitais e terminam, invariavelmente, com a morte.^{1,2}

Com a evolução dos cuidados de saúde a esperança média de vida (EMV) aumentou³, sendo que nos países desenvolvidos resultou, substancialmente, da diminuição da mortalidade na população idosa (faixa etária acima dos 65 anos). Dado que a maioria dos problemas de saúde associados ao envelhecimento se devem a doenças crónicas e incapacitantes, foi necessário o estabelecimento de um objetivo que não apenas o de prolongar a EMV, mas sim o de envelhecer de forma ativa e saudável. Assim, o envelhecimento saudável é definido, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como o processo de desenvolvimento e manutenção de capacidade funcional que permita o bem-estar em idade avançada.²

Como foi referido anteriormente, estas modificações não são lineares, a variação da EMV depende de múltiplos fatores, sendo estimado que a contribuição genética seja responsável por apenas 25 a 30% da longevidade.^{3,4} Assim sendo, grande parte da interindividualidade é, fortemente, influenciada por fatores ambientais e comportamentais, nomeadamente a alimentação. De igual forma, também a maioria dos problemas de saúde na população idosa (resultado de doenças crónicas) pode ser prevenida ou ver atrasada a sua evolução adotando estilos de vida saudáveis.^{2,3}

A restrição calórica (RC) é um regime alimentar no qual há uma redução no aporte calórico evitando, no entanto, a desnutrição.⁵ Em estudo há mais de 80 anos, foi, inicialmente, analisado em roedores alimentados com menos 30% de aporte alimentar do que o grupo de controlo (roedores alimentados *ad libitum*).⁶ Desde então, é a intervenção mais estudada e mais robusta no aumento da longevidade, com benefícios para a saúde nas espécies estudadas (incluindo estudos de curta de duração na espécie humana e de longa duração noutros primatas)^{5,7}, nomeadamente na diminuição de doenças crónicas⁸, mas também na reversão de marcadores fisiológicos e moleculares de envelhecimento.⁶ No entanto, continua sem se conhecer o mecanismo biológico preciso pelo qual a RC exerce os seus efeitos benéficos, existindo vários candidatos em estudo nomeadamente as sirtuínas.⁷

A dieta mediterrânica (DM) é um regime alimentar equilibrado caracterizado pelo consumo frequente de vegetais, fruta, azeite extravirgem, legumes, cereais integrais, frutos secos e peixe, por um consumo moderado de vinho tinto às refeições, ovos, laticínios e carne branca, e uma redução na ingestão de carne vermelha, gordura saturada (como manteiga e outras gorduras animais), hidratos de carbono refinados e doces.⁹⁻¹¹ A DM tem origem nos países banhados pelo mar Mediterrâneo (Grécia, sul de Itália, França, Espanha e Portugal) e foi inicialmente descrita no final dos anos 50.^{10,12} Desde então, tem

sido, continuamente, estudada e de forma consistente mostrou resultados positivos, como o aumento da EMV, efeitos cardio e neuroprotetores, menores taxas de mortalidade associadas a doenças cardiovasculares e cancro.^{10,12,13}

O sinergismo dos múltiplos nutrientes envolvidos na DM, com os seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e prebióticos, por ativação de respostas metabólicas e de vias de *stress*, parece modular a saúde e longevidade de forma semelhante à RC, evitando, no entanto, a dificuldade de adotar e manter este regime a longo prazo.^{9,10,14}

Os objetivos deste trabalho são:

Identificar o paralelismo fisiopatológico entre a RC e DM, e seus efeitos na saúde e envelhecimento;

Identificar e compreender a relação das sirtuínas com as doenças associadas ao envelhecimento.

Materiais e Métodos

Na elaboração deste trabalho de revisão realizou-se a pesquisa bibliográfica, na base de dados *Pubmed*, sendo usados os seguintes filtros: data de publicação nos últimos 5 anos; línguas portuguesa, inglesa e espanhola. A pesquisa foi feita com os termos MeSH "*Diet therapy*" e "*Aging*". Equação de pesquisa: "*Diet Therapy*"[Mesh] AND "*Aging*"[Mesh] AND ("2012/07/22"[PDat]: "2017/07/18"[PDat] AND "*humans*"[MeSH Terms] AND (*English*[lang] OR *Portuguese*[lang] OR *Spanish*[lang])). Foram obtidos 617 artigos e destes, selecionaram-se os 54 artigos mais relevantes com base no seu título e resumo, tendo sido excluídos 563 artigos.

Adicionalmente, de forma pontual e dado o seu marcado interesse, recorreu-se a outras fontes bibliográficas.

Restrição Calórica

A restrição calórica sem desnutrição é o padrão alimentar *gold standard* no atraso do envelhecimento e das doenças associadas a este.¹⁵ Algumas das suas vias de sinalização molecular como a das sirtuínas, da proteína quinase ativada pelo monofosfato de adenosina (AMPK), do recetor γ ativado por proliferadores do peroxissoma (PPARG), da proteína alvo da rapamicina nos mamíferos (mTOR), da proteína *forkhead box* (FOXO) e da(o) insulina/fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IIS), são capazes de atuar como sensores de nutrientes e de energia, e regulam diversos processos celulares implicados nos efeitos na saúde associados à RC.^{5,6,15,16} As sirtuínas, dado que se correlacionam com a DM, serão exploradas de seguida.

Sirtuínas

As sirtuínas foram, inicialmente, designadas como uma família de desacetilases, no entanto, sabe-se agora que catalizam um maior número de reações. São reguladoras pós-traducionais do epigenoma e do acetiloma por desacetilação de proteínas histonas e não-histona, respetivamente, mas também são modificadoras do proteoma através de reações de desacilação como a desmalonilação, desuccinilação, despropionilação, descrotonilação, deslipoamidação, desacilação de ácidos gordos de cadeia longa e ribosilação (tabela 1).^{6,17-19}

São reguladas a vários níveis, nomeadamente, a nível da transcrição, tradução e estabilidade proteica, bem como a nível oxidativo. Outros fatores que modulam as suas ações incluem interações proteína-proteína, inibidores como a nicotinamida (NAM), microRNAs, a localização celular e subcelular, e a disponibilidade de substratos e de cofatores.^{15,19}

As sirtuínas são reguladores silenciadores de informação. Foram, primeiramente, identificadas em leveduras (proteína Sir2) e são os ortólogos na espécie humana. O complexo de sirtuínas Sir2-Sir3-Sir4, em leveduras, impede a senescência replicativa e duplica a longevidade. Ao mobilizar-se para o locus de DNA ribossómico (rDNA), silencia-o e reduz a formação e acumulação tóxica de rDNA extracromossómico.^{15,17,19}

Ao detetarem alterações dos níveis de energia, modelam respostas enzimáticas de forma a manter a homeostasia celular.⁶ A manipulação das suas ações tem impacto na regulação de processos como a expressão de genes, padrões de metabolismo e desenvolvimento celular, apoptose, resposta inflamatória e neuroprotecção. Estas previnem o dano do DNA (DD) pela inibição da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) na mitocôndria e ativação de enzimas neutralizadoras de ROS e promovem a reparação de dano no DNA (DDR) pela ativação de poli-ADP-ribose polimerases (PARP) e reparação de quebras cadeia dupla (DSBs – do inglês *double-strand DNA breaks*) por recombinação homóloga.^{19,20} Assim sendo, têm um papel de relevo no envelhecimento e em doenças associadas a este, como o cancro, inflamação, défice cognitivo e de função cardíaca, sendo responsáveis ou corresponsáveis por efeitos prolongadores da longevidade associados à RC, como o efeito anti-inflamatório, a melhoria da tolerância à glicose e da função endotelial, regressão de placas ateroscleróticas e inibição da esteatose hepática.^{6,19}

Estudos em organismos-modelo mostram que a Sir2 tem uma correlação direta com o aumento da longevidade. Apesar de alguns estudos posteriores com aumento da sua

expressão não terem produzido os mesmos resultados^{15,17,19}, estas discrepâncias têm sido associadas às diferentes metodologias usadas, nomeadamente, a escolha do regime de RC.²⁰

Estudos com regulação genética ou farmacológica positiva das sirtuínas apresentaram resultados promissores, contudo, pelo facto de estarem envolvidas em múltiplas vias associadas ao envelhecimento, como do AMPK, da IIS, do mTOR, da FOXO e da proteína quinase A (PKA), exibem consequências amplas e díspares que dificultam a sua interpretação.¹⁵ Além disso, a transposição dos resultados obtidos em organismos-modelo tem sido difícil dada a existência de sete sirtuínas com perfis de ação, afinidade a substratos e localizações diferentes, em humanos.^{6,15,18,19}

As SIRT1, SIRT6 e SIRT7 têm localização nuclear.^{15,19} A SIRT2 é ativa no citoplasma e as SIRT3, SIRT4 e SIRT5 a nível mitocondrial.^{15,20} No entanto, estas não são localizações exclusivas para as SIRT1, SIRT2 e SIRT3, que podem alterar a sua localização subcelular em situações específicas, como por exemplo de *stress* celular (tabela 1).¹⁹

Dinucleótido de nicotinamida e adenina

O dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD⁺), o principal cofator das sirtuínas, é essencial na homeostasia metabólica e aumenta com a RC.^{6,17,21}

Durante as reações de desacetilação, ocorre a quebra da ligação entre a NAM e a ribose na molécula do NAD⁺ e a transferência do grupo acetil do substrato para a ribose, dando origem a um substrato desacetilado, O-acetil-ADP-ribose e NAM.¹⁹ Assim, a atividade das sirtuínas depende da concentração de NAD⁺ (variando com o estado *redox* das células), mas também da concentração de NAM, que em níveis elevados se liga aos seus terminais carboxilo, inibindo-as.^{15,19}

Tabela 1 - Localização, atividade e funções das sirtuínas.

Sirtuína	Localização	Atividade	Funções
SIRT1	Núcleo Citoplasma	Desacetilase	DDR, regulação epigenética, metabolismo dos lípidos e da glicose, anti-inflamatório, supressor tumoral, autofagia, neuroproteção
SIRT2	Citoplasma Núcleo	Desacetilase	Regulação do ciclo celular, regulação epigenética, anti-inflamatório, metabolismo dos lípidos e da glicose
SIRT3	Mitocôndria Núcleo	Desacetilase	Regulação epigenética, função mitocondrial, <i>stress</i> oxidativo, DDR, supressor tumoral, metabolismo dos lípidos e corpos cetônicos
SIRT4	Mitocôndria	Ribosiltransferase Desacetilase	DDR, metabolismo dos lípidos, homeostasia energética
SIRT5	Mitocôndria	Desacetilase Desuccinilação Desmalonilação	Ciclo da ureia, metabolismo da glicose e corpos cetônicos, <i>stress</i> oxidativo, função mitocondrial
SIRT6	Núcleo	Desacetilase Desacetilase Ribosilase	Regulação epigenética, DDR, supressor tumoral, anti-inflamatório, metabolismo dos lípidos e da glicose
SIRT7	Nucléolo	Desacetilação Desuccinilação	Regulação epigenética, função mitocondrial

A concentração celular de NAD^+ depende do equilíbrio entre a sua produção e o seu consumo. A sua síntese *de novo* ocorre principalmente a partir do metabolismo do triptofano (Trp) pela via da quinurenina com múltiplas reações, mas também a partir de ácido aspártico e de ácido nicotínico (NA) (Figura 1).^{15,19,22} A SIRT1 modula a síntese de NAD^+ principalmente pela via de reciclagem a partir de NAM.¹⁹ Nesta, a NAM fosforibosiltransferase (NAMPT) converte a NAM em mononucleótido de nicotinamida (NMN), sendo este convertido em NAD^+ pela NMN adenililtransferase 1, 2 e 3 (NMNAT1, 2 e 3). As NMNAT são igualmente capazes de converter mononucleótido de ácido nicotínico (NaMN) em NAD^+ . Outros precursores, como o ribosídeo de

nicotinamida (NR) e ribosídeo de ácido nicotínico (NAR) são, respetivamente, convertidos a NMN e NaMN pela ribosídeo de nicotinamida quinase 1 e 2 (NRK1 e 2).^{15,22}

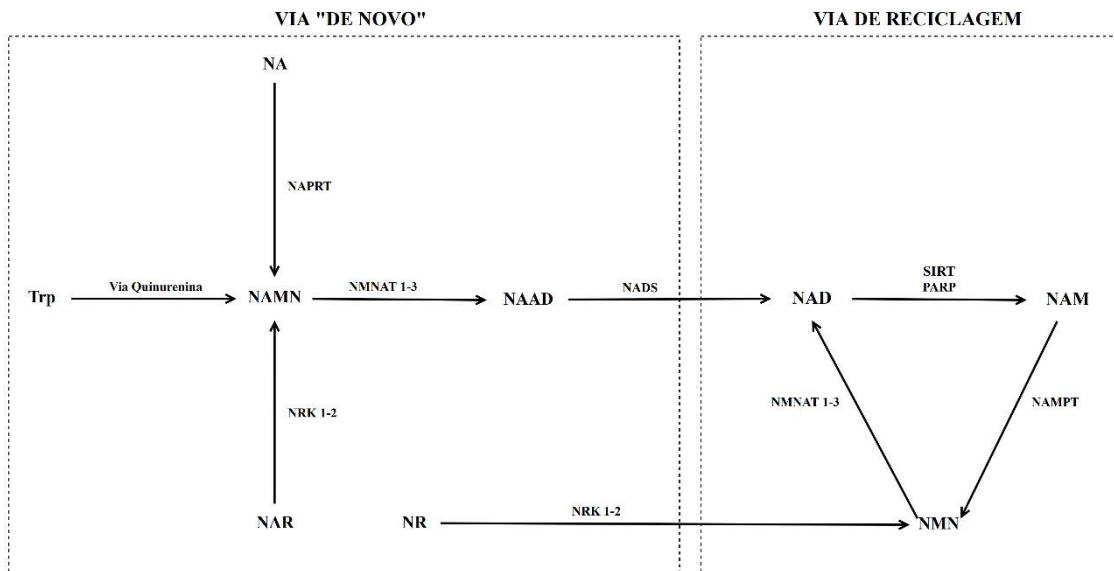


Figura 1 - Vias de síntese "de novo" e de reciclagem do cofator NAD⁺.

Legenda: NA, ácido nicotínico; NAAD, dinucleótido de ácido nicotínico e adenina; NAD, dinucleótido de nicotinamida e adenina; NADS, dinucleótido de nicotinamida e adenina sintetase; NAM, nicotinamida; NAMN, mononucleótido de ácido nicotínico; NAMPT, nicotinamida fosforibosiltransferase; NAPRT, ácido nicotínico fosforibosiltransferase; NAR, ribosídeo de ácido nicotínico; NMNAT, mononucleótido de nicotinamida adenililtransferase; NR, ribosídeo de nicotinamida; NRK, ribosídeo de nicotinamida quinase; PARP, poli-ADP-ribose polimerases; SIRT, sirtuínas; Trp, triptofano.

Os seus principais consumidores são as mono e poli-ADP ribosiltransferases. A DDR, especialmente a reparação de DSBs, aumenta a atividade das PARP, o que diminui as concentrações celulares do seu cofator NAD⁺. A via de reciclagem previne esta depleção e, ao diminuir os níveis de NAM, estimula a via das sirtuínas.¹⁹

SIRT1

A SIRT1 tem um papel importante no metabolismo celular, na resposta ao *stress* e no envelhecimento ao modular a atividade de fatores de transcrição, cofatores, proteínas histona e não histona.^{15,19,20} Atua como sensor de nutrientes e é ativada em situações de subnutrição moderada, como acontece na RC, mantendo o balanço energético e a homeostasia dos lípidos e da glicose (Figura 2).^{19,20}

Em RC, o AMPK é ativado, modifica o metabolismo intracelular, o que aumenta os níveis de NAD⁺ e a atividade da SIRT1. A SIRT1 inibe, por desacetilação, a proteína 1c de ligação ao elemento regulador de esteróides (SREBP1c), reduz a sua ação nos promotores de genes lipogénicos, suprimindo a síntese de lípidos.^{19,23}

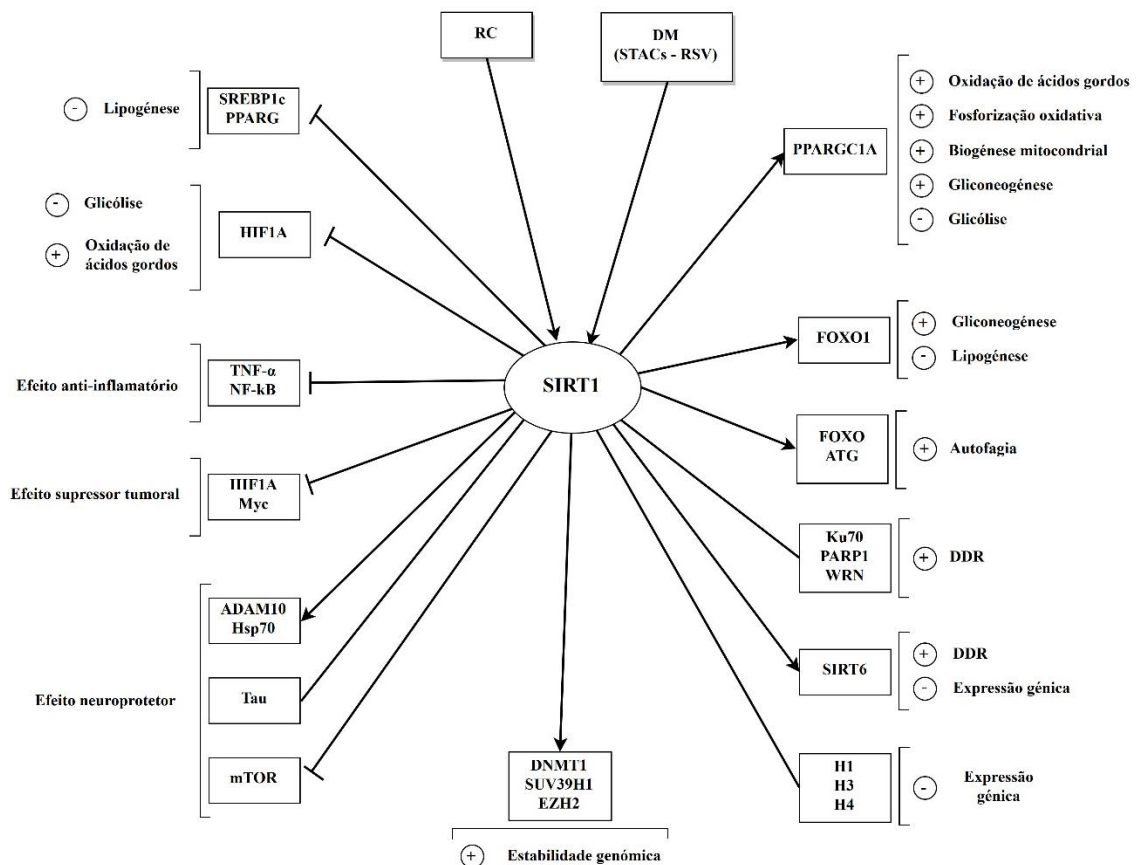


Figura 2 - Principais ações e ativadores da SIRT1. Adaptado de Wątroba M em *Adv Med Sci* (19).

A diferenciação dos adipócitos, no tecido adiposo branco, é regulada pelo PPARG. Este recetor nuclear é inibido pela SIRT1 quando esta forma um complexo repressor com o recetor nuclear co-repressor (NCoR) e o SMRT (do inglês *silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors*).^{23,24} A SIRT1 também estimula o fator de transcrição FOXO1 que inibe, igualmente, o PPARG²³ e reduz a lipogénese pela inibição da lipase de triglicéridos.^{18,19} Assim, em RC, é limitado o armazenamento de lípidos pela inibição da lipogénese e aumento da lipólise.^{21,23}

Relativamente ao balanço energético, a SIRT1 aumenta o consumo de energia pela oxidação de ácidos gordos e fosforilação oxidativa, na matriz mitocondrial, em resposta à RC.^{20,23} A nível hepático, ao estimular o coativador 1 α do PPARG (PPARGC1A), promove a oxidação de ácidos gordos.^{19,23} No tecido muscular esquelético, com o aumento do AMPK ocorre a estimulação da SIRT1 que, por sua vez, ativa o PPARGC1A.²³ Esta ativação promove o aumento da função e o número de mitocôndrias.^{19,21} Desta forma, o metabolismo oxidativo é estimulado com o aumento da oxidação de ácidos gordos, fosforilação oxidativa e biogénese mitocondrial.^{21,23}

A ação da SIRT1 na homeostasia da glicose ocorre pela modulação positiva da gliconeogénese e negativa da glicólise.¹⁹⁻²¹ No fígado, a SIRT1, através da desacetilação do PPARGC1A e do FOXO1, promove a transcrição de genes gliconeogénicos.^{19,23}

Relativamente à glicólise, esta é inibida pela desacetilação do PPARGC1A, que diminui a transcrição de genes glicolíticos^{21,23}, mas também pela desacetilação do fator 1 α induzido por hipóxia (HIF1A). Este, ao ser inibido, também aumenta a oxidação de ácidos gordos, contribuindo para o metabolismo oxidativo.²³

A SIRT1 é igualmente estimulada por neurónios hipotalâmicos que sintetizam pró-opiomelanocortina (POMC), sendo estes importantes na redução do *intake* energético que promove a manutenção da massa corporal e homeostasia da glicose.¹⁹

A autofagia, processo com múltiplas etapas de degradação e reciclagem de proteínas citoplasmáticas e organelos, é também regulada pela SIRT1.^{25,26} Com o envelhecimento, há acumulação de agregados proteicos e mitocôndrias disfuncionais.¹⁸ A RC aumenta os processos autofágicos, remove mitocôndrias envelhecidas e danificadas e diminui o *stress* oxidativo.²¹ Defeitos na autofagia têm sido associados a envelhecimento precoce e doenças relacionadas com o envelhecimento.²⁵

Em RC, a SIRT1 estimula a FOXO1 por desacetilação.^{18,21} A relação da SIRT1 com o AMPK é bidirecional, dado que a SIRT1, por intermédio da quinase hepática B1 (LKB1), ativa o AMPK e este, por fosforilação, ativa a FOXO3.¹⁸

Os fatores de transcrição FOXO estão envolvidos na regulação de genes responsáveis por dois mecanismos de depuração intracelular.²⁵ Induzem a transcrição de genes de autofagia e morte celular em diversas células do organismo, nomeadamente: neurónios; miócitos; cardiomiócitos; células tubulares renais e células estaminais hematopoiéticas.^{21,25} Através da regulação de genes do sistema ubiquitina-proteassoma, promovem a degradação de proteínas reguladoras citosólicas de vida curta e impedem a acumulação de proteínas danificadas no coração, fígado e músculo.²⁵

Além da regulação mediada pelos FOXO, a SIRT1 ativa, por desacetilação, genes essenciais da autofagia (ATG5, ATG7 e 8), induzindo-a.^{18,21} Em RC, há estimulação do homólogo mamífero do ATG8, o LC3.²¹ O aumento da expressão do ATG5 (gene crítico na formação de autofagossomas) aumentou a EMV e melhorou o perfil metabólico, em roedores.^{17,18} Roedores com deleção destes genes apresentaram início precoce de doenças relacionadas com o envelhecimento.¹⁷

A SIRT1 previne a carcinogénese ao estimular a DDR, ao silenciar a expressão génica, ao inibir a resposta inflamatória e o HIF1A.^{19,20}

Em células normais, a SIRT1 inibe, por desacetilação, o HIF1A, o que impede a reprogramação metabólica com aumento da glicólise, típica das células neoplásicas (efeito de Warburg) e a proteína do proto-oncogene Myc.^{19,27} No entanto, em células neoplásicas, a SIRT1 estimula a atividade da Myc, aumenta a expressão de recetor de estrogénio α (ERA) e inibe a atividade do supressor tumoral p53, contribuindo para a proliferação e crescimento celulares, e inibição da apoptose e da senescência celulares.^{19,27}

A ação anti-inflamatória da SIRT1 resulta da inibição das proteínas pro-inflamatórias TNF- α e NF- κ B.¹⁹

A SIRT1 promove a DDR, nomeadamente a reparação de DSBs, pela regulação da proteína Ku70, da PARP1 e da DNA helicase associada à síndrome de Werner (WRN).^{15,28}

Relativamente à regulação da expressão génica, a SIRT1 promove a desacetilação de histonas, nomeadamente em resíduos de lisina em locais específicos das H1, H3 e H4.^{15,24} Esta desacetilação faz parte de um grupo de modificações pós-traducionais de regulação epigenética que controla a longevidade, promove uma conformação fechada pela cromatina, o que culmina no silenciamento génico.²⁰ A SIRT1, ao formar um complexo com o FOXO3a e com o fator respiratório nuclear 1 (NRF1), estimula a SIRT6 que, por sua vez, desacetila a H3, o que promove a DDR e o silenciar da expressão génica.¹⁹ A inibição da SIRT1, em mamíferos, promove a hiperacetilação da H3 o que resulta em instabilidade genómica e promoção do envelhecimento.²⁰

A metilação de histonas, por metiltransferases, modula igualmente a longevidade. A SIRT1 ativa, por desacetilação, as metiltransferases SUV39H1 e EZH2, que por sua vez, procedem à metilação de resíduos diferentes da H3.^{20,24} Com o envelhecimento, os níveis

de EZH2 diminuem, o que resulta na perda da metilação da H3, pensando-se que seja um fator essencial na indução do envelhecimento e carcinogénese.²⁰

A SIRT1 estimula a metilação de DNA, ao promover a desacetilação de metiltransferases (DNMTs), como a DNMT1.^{20,28} Esta, atuando em genes promotores, diminui a transcrição do DNA.^{20,24} Maiores níveis de SIRT1 estão associados a maior atividade das DNMTs e desta forma a melhores padrões de metilação de DNA, que conferem estabilidade genómica.²⁰ Com o envelhecimento, há diminuição da expressão de SIRT1 e hipometilação do DNA que se associa a instabilidade genómica e à perda da integridade dos telómeros.²⁰

O *stress* celular genotóxico e o envelhecimento promovem a mobilização da SIRT1, do seu local de origem (onde diminui a sua atividade) para os locais de DD, de forma a promover a DDR. Estes rearranjos, são adaptativos a curto prazo, no entanto, ao promoverem alterações epigenéticas na modificação da cromatina e expressão génica, pela diminuição da atividade da SIRT1, são prejudiciais a longo prazo e culminam na senescência celular.²⁰

Um efeito de neuroprotecção geral foi demonstrado por ações centrais da SIRT1.^{19,20}

Na doença de Alzheimer (DA), esta sirtuína, por desacetilação, estimula o recetor β do ácido retinóico, um ativador do fator de transcrição ADAM10. Este, sendo um componente da α -secretase, vai promover o processamento da proteína precursora da β -amilóide (APP) por uma via não amiloidogénica, diminuindo a formação da proteína tóxica.²⁹ A SIRT1 desacetila a proteína Tau em múltiplos resíduos de lisina, ficando estes expostos à marcação e degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma.^{19,29} Nesta doença foi detetada uma hipermetilação do gene SIRT1 e hipometilação do gene APP, existindo uma relação inversa entre a expressão de SIRT1 e a produção da APP.²⁰

Na doença de Parkinson (DP), a SIRT1 desacetila o fator de choque térmico 1(HSF1), o que aumenta a transcrição da proteína chaperona hsp70 (proteína de choque térmico 70).^{19,29} Assim, diminui a formação de agregados proteicos disfuncionais.²⁹

Na doença de Huntington (DH), num dos mecanismos propostos, a SIRT1 desacetila o complexo TORC1, promove a sua interação com o fator de transcrição CREB (do inglês *cAMP response element-binding protein*) e a transcrição do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) que apresenta um efeito protetor.²⁹ Por outro lado, foi demonstrado o crescimento dos processos dos neurónios através da inibição da via do mTOR.¹⁹ Assim, permanece em dúvida o mecanismo responsável pela neuroprotecção na DH.

SIRT2

A SIRT2 tem como principal ativador a RC, através do aumento dos níveis celulares de NAD⁺, sendo inibida pelo fator de transcrição HIF1A.¹⁹ Esta sirtuína participa em múltiplos processos celulares, nomeadamente a mitose, ciclo celular, metabolismo dos lípidos e da glicose, resposta anti-inflamatória e atua a nível do sistema nervoso central (SNC) (Figura 3).

A regulação da estrutura da cromatina pela SIRT2, durante o ciclo celular e DD, previne a carcinogénese em células normais.^{19,24} Durante a mitose, os seus níveis aumentam e é mobilizada para o núcleo. A este nível, promove a desacetilação da histona H4, o que faz com que a cromatina adote uma estrutura fechada.^{19,20,24} Regula também a progressão mitótica, ao controlar a atividade do complexo promotor da anafase/ciclossoma (APC/C).¹⁹ Em células neoplásicas há uma baixa expressão da SIRT2 e roedores com deleção genética desta apresentaram uma hiperacetilação da H4, durante a mitose, com maior suscetibilidade a neoplasias.^{19,20}

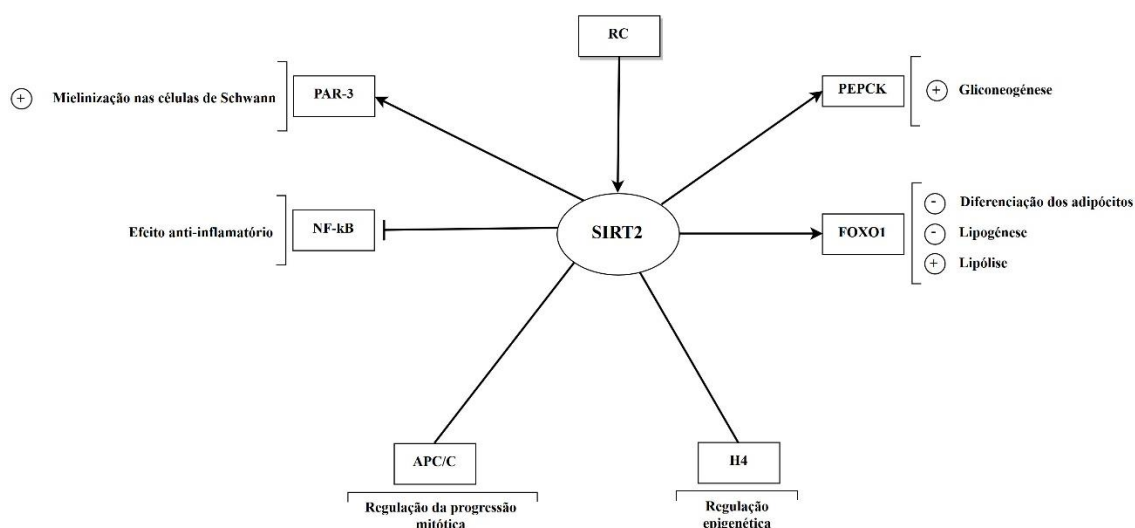


Figura 3 - Principais ações e ativador da SIRT2. Adaptado de Wątroba M em *Adv Med Sci* (19).

No metabolismo da glicose, a SIRT2, ao desacetilar a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), confere-lhe estabilidade, diminui a sua degradação e estimula a gliconeogénese.^{19,23,24} Relativamente aos lípidos, a SIRT2, ao desacetilar o FOXO1, inibe a diferenciação dos adipócitos e a lipogénese, e promove a lipólise.^{19,23}

Esta sirtuína tem efeito anti-inflamatório ao inibir o NF-κB, através da desacetilação da sua subunidade p65.^{19,24}

No SNC, a SIRT2, ao desacetilar a proteína Par-3, estimula a produção de mielina nas células de Schwann.^{19,24} No entanto, não é neuroprotetora como a SIRT1. Pelo contrário, na DP, ao desacetilar a α -tubulina (um dos seus principais substratos), promove a desestabilização dos microtúbulos, a agregação de α -sinucleína e a formação de corpos de Lewy.²⁰ A desacetilação do FOXO3a, mediada pela SIRT2, aumenta os níveis do fator pro-apoptótico BIM (proteína 11 semelhante ao Bcl2) e a morte dos neurónios.²⁹ Assim, ao contrário da SIRT1, tem sido a inibição da SIRT2 a ser associada a neuroproteção.^{6,19,20}

SIRT3

A SIRT3 tem como principais ativadores a RC e o aumento dos níveis celulares de NAD⁺.¹⁹ É a principal desacetilase mitocondrial²³, participa na regulação da síntese de ATP, atua como supressor tumoral e intervém no metabolismo dos lípidos (Figura 4).

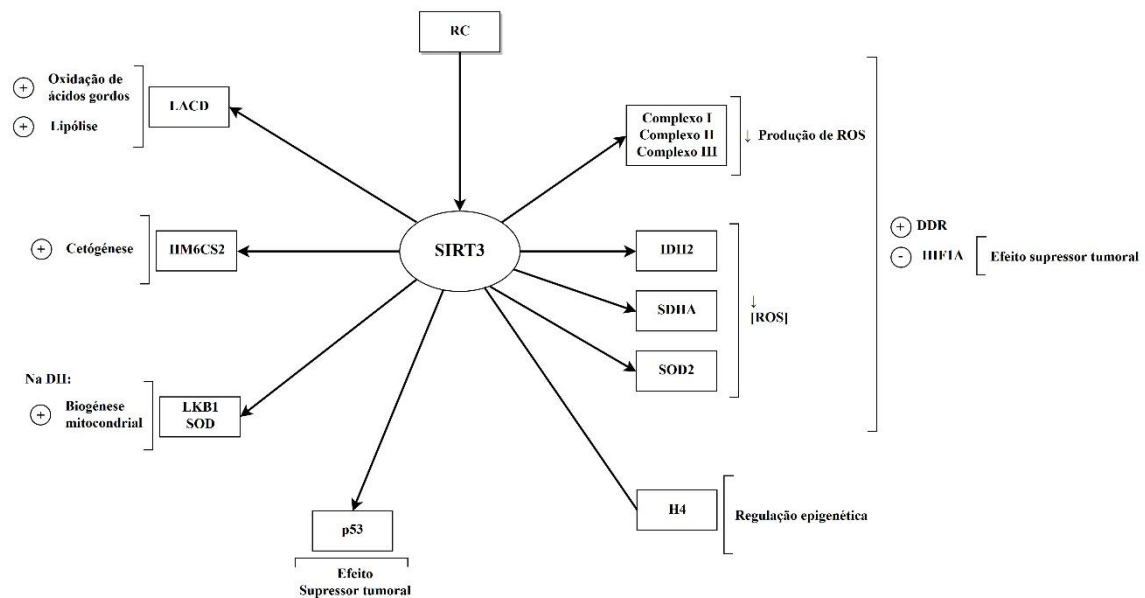


Figura 4 - Principais ações da SIRT3. Adaptado de Wątroba M em *Adv Med Sci* (19).

A nível mitocondrial, promove a desacetilação dos complexo I, II e III, complexos enzimáticos envolvidos na fosforilação oxidativa, pelo que aumenta a eficácia da cadeia respiratória e diminui a produção de ROS.^{19,20,23} Desacetila a isocitrato desidrogenase 2 (IDH2), responsável pela conversão do isocitrato a α -cetoglutarato, e a succinato desidrogenase (SDH), responsável pela oxidação do succinato a fumarato, envolvidas no ciclo de Krebs e cadeia respiratória.^{19,30} Atua ainda na SOD2, ativa-a e melhora a eficácia na remoção de ROS.¹⁹ Desta forma, através da desacetilação destes substratos, diminui a concentração celular de ROS, o que diminui a DDR e regula negativamente o HIF1A. Pela inibição deste fator, impede o efeito de Warburg das células neoplásicas (explicado

atrás).^{19,27,30} A sua ação como supressor tumoral conclui-se com a ativação, por desacetilação, do supressor tumoral p53.¹⁹

Relativamente ao metabolismo dos lípidos, a SIRT3 ativa, por desacetilação, a desidrogenase específica de acil-CoA de cadeia longa (LACD), o que promove a oxidação de ácidos gordos e o catabolismo dos lípidos.^{19,23,28} Em RC, promove ainda a cetogénese pela desacetilação da sintetase 2 de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMGCS2).²³

A SIRT3 apresenta efeitos neuroprotetores.¹⁹ Na DH, promove sobrevivência celular através da desacetilação da LKB1 e da SOD. A LKB1 ativa, por fosforilação, o AMPK, e este estimula a biogénese mitocondrial.²⁹

Apesar de a SIRT3 ser predominantemente mitocondrial, quando é transportada para o núcleo, tem um papel na regulação epigenética pela desacetilação da histona H4.^{20,24}

SIRT4

A SIRT4 é ativada pela quinase ataxia-telangiectasia mutada (ATM) e quinase ATM relacionada com a RAD-3 (ATR) como resposta a DD.^{19,20} No entanto, é a única sirtuína inibida pela RC.^{20,30} Tem atividade de ADP-ribosiltransferase¹⁹, de desacetilase³¹, e tem como principais funções a promoção da DDR, regulação do metabolismo dos lípidos e homeostasia do ATP (Figura 5).

Na resposta a DD, ao ser estimulada, inibe, por ribosilação, a glutamato desidrogenase (GDH)^{19,30}, o que inibe a entrada da glutamina no ciclo de Krebs e permite o uso dos seus átomos de azoto na síntese de purinas, necessárias à DDR.^{19,20} A depleção de SIRT4 promove a acumulação de DD; no entanto, apesar de a RC a inibir, é pouco provável que promova DD dado que, ao estimular as SIRT1, SIRT3 e SIRT6, promove a DDR.¹⁹

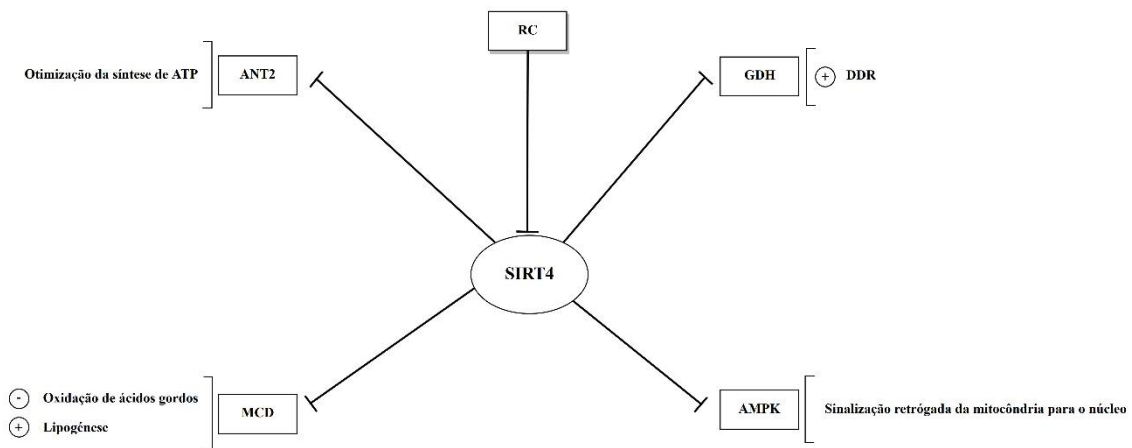


Figura 5 - Principais ações e inibidor da SIRT5. Adaptado de Wątroba M em *Adv Med Sci* (19).

A SIRT4 é também a única sirtuína que inibe o AMPK¹⁹, no entanto, ao ser inibida pela RC, promove-o, indiretamente.²⁰ Desta forma, estabelece uma sinalização retrógrada da mitocôndria para o núcleo, que estimula a SIRT1 e SIRT6.²⁰

No metabolismo lipídico, a SIRT4 inibe a descarboxilase de malonil-CoA (MCD) por desacetilação, o que promove a lipogénese e inibe a oxidação de ácidos gordos.^{30,31}

Esta sirtuína inibe ainda o desacoplamento da fosforilação oxidativa através da inibição do translocador 2 de nucleótidos de adenina (ANT2), o que otimiza a síntese de ATP.^{19,20}

SIRT5

A SIRT5 é uma enzima mitocondrial que tem atividade de desacetilação, desuccinilação e desmalonilação.^{19,28,30} Desacetila a carbamoil-fosfato sintetase 1 (CPS1) o que estimula o ciclo da ureia (Figura 6).^{19,30} Roedores com deleção genética da SIRT5 apresentaram

níveis aumentados de urémia.¹⁹ Por desuccinilação, ativa a isoforma mitocondrial da superóxido dismutase 1 (SOD1), o que diminui os níveis de ROS.^{19,20} A SIRT5 é um regulador global da succinilação de resíduos de lisina a nível mitocondrial; ao promover a sua desuccinilação, inibe o complexo piruvato desidrogenase (PDK) e a succinato desidrogenase (SDH), o que diminui a respiração mitocondrial e a atividade bioquímica.³² Regula também, por desuccinilação de múltiplas proteínas mitocondriais, a cetogénese e a oxidação de ácidos gordos.³⁰

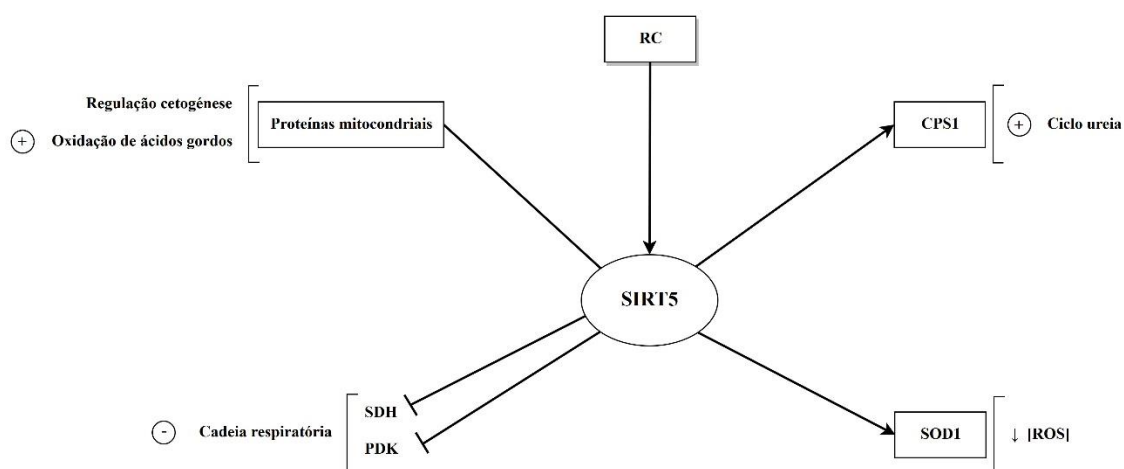


Figura 6 - Principais ações e ativador da SIRT5. Adaptado de Wątroba M em *Adv Med Sci* (19).

SIRT6

A SIRT6 é uma sirtuína nuclear, com ação de desacilase, desacetilase e ribosilase, dependente do nucleossoma.^{20,24,30} Tem um papel importante de regulação epigenética do fenótipo celular, estabilização do genoma, promoção da DDR, ação de supressor tumoral, anti-inflamatória e regulação metabólica (Figura 7).^{6,15,20}

Tem múltiplos ativadores, como a RC, o aumento dos níveis celulares de NAD⁺, o supressor tumoral p53 e o proto-oncogene c-Fos^{19,20,24}

A RC ativa a SIRT6, indiretamente, pela estimulação da SIRT1, que, ao formar um complexo com a FOXO3a e NFR1, atua no gene promotor da SIRT6. Foi igualmente descrita a regulação positiva da RC por estabilização das moléculas de SIRT6 pré-existentes. O c-Fos ativa-a, ao estimular a ligação da proteína ativadora 1 (AP1) no gene promotor da SIRT6.¹⁹

Outros reguladores têm sido identificados, como a fosforilação pela AKT1, ubiquitinação pela MDM2 e desubiquitinação pela UCP10.²⁴

A SIRT6 promove a desacilação e desacetilação em diferentes resíduos de lisina da histona H3 e é dependente do nucleossoma, dado que não atua em histonas livres.^{19,24} A desacilação de histonas promove o silenciamento génico, a conservação e estabilidade genómicas e a DDR.¹⁹

A sua ação na lisina 9 da H3 (H3K9) é a principal responsável pelo silenciamento génico, protegendo os telómeros e a célula da genotoxicidade e *stress* replicativo. A sua deficiência resulta em células com hiperacetilação da H3 e disfunção telomérica com fusão de cromossomas e envelhecimento celular prematuro.^{19,20,24} A SIRT6 é recrutada para os genes promotores do HIF1A, Myc, NF-κB, c-Jun e FOXO3a, onde inibe as suas transcrições.²⁴

A supressão da transcrição do HIF1A promove a diminuição da glicólise e aumento do metabolismo oxidativo^{23,30}, com inibição da reprogramação metabólica do efeito de Warburg.¹⁹

Pelo silenciamento dos genes promotores do NF-κB, a SIRT6 protege as células da apoptose e atrasa a senescência celular.^{20,33}

No que diz respeito à proteína c-Jun, a estimulação da SIRT6, pela RC, promove os efeitos de aumento da longevidade associados à inibição da via de sinalização da

insulina/IGF1 através da supressão da transcrição de c-Jun. Uma vez que a c-Jun inibe o p53, a SIRT6 recupera a sua função.¹⁹

Para além do silenciamento génico, conservação e estabilidade genómicas, a ação da SIRT6 na H3K9 também promove a DDR. Este efeito protetor resulta da desacetilação da cromatina a nível dos telómeros, que adota uma conformação especial e recruta a helicase dependente de ATP (WRN, enzima mutada na síndrome de Werner, que promove o envelhecimento precoce). Esta, por sua vez, previne anomalias teloméricas no processo de replicação de DNA.^{19,24} Também a desacetilação da H3K9 em locais de DD recruta a subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs), sendo esta importante na eficaz DDR de DSBs.²⁴

Atua ainda nos resíduos 18 e 56 da H3 (H3K18 e H3K56) e na histona H2B. A ação na H3K18, a nível da cromatina pericentromérica, é essencial para a fidelidade da mitose e na H3K56 aumenta a eficácia da DDR.^{19,20}

A SIRT6 promove ainda, de forma independente da sua atuação em histonas, a DDR, ação anti-inflamatória e regulação metabólica.

A estimulação, por desacetilação, da proteína de interação com a proteína de ligação 1 ao terminal-c (CTBP1IP), promove a excisão de fragmentos de DNA danificados, sendo assim importante na reparação de DSBs por recombinação homóloga.^{19,24}

Esta sirtuína possui ainda atividade de ADP-ribosilação. Assim, em situações de *stress* oxidativo, aumenta a atividade da PARP1, estimula a sua ligação a locais de DD onde, por auto-ribosilação, promove a DDR de DSBs.^{19,20,24} A SIRT6 estimula ainda a proteína 1 associada ao KRAB (do inglês *Kruppel-associated box*) (KAP1), um potente inibidor do retrotransposão L1, implicado em doenças associadas ao envelhecimento.^{19,20}

Tem ação anti-inflamatória pela inibição, por desacetilação, do TNF α , no retículo endoplasmático¹⁹, mas também pela inibição, por desacetilação, da subunidade p65 (RelA) do NF- κ B.^{19,33}

A SIRT6 modula ainda o metabolismo da glicose através da desacetilação do FOXO1 e da acetiltransferase GCN5. A sua atividade sobre o FOXO1 promove a sua exclusão nuclear, diminuindo a gliconeogénese hepática. Já a ação GCN5 aumenta a sua atividade, promove a acetilação do PPARGC1A, o oposto da SIRT1, inibindo também a gliconeogénese.^{19,24} É ainda desconhecida se a atividade sobre o FOXO1 e a GCN5 ocorre de forma direta ou se é mediada por outros fatores.²⁴

Assim, a SIRT6 promove a estabilidade genómica ao atuar na H3, estimula a DDR através da PARP1, KAP1, WRN, DNA-PKcs e CTBP1IP. Tem atividade de supressor tumoral pela ação no HIF1A, c-Jun, p53, Myc, NF- κ B e anti-inflamatória através do TNF α e NF-Kb.

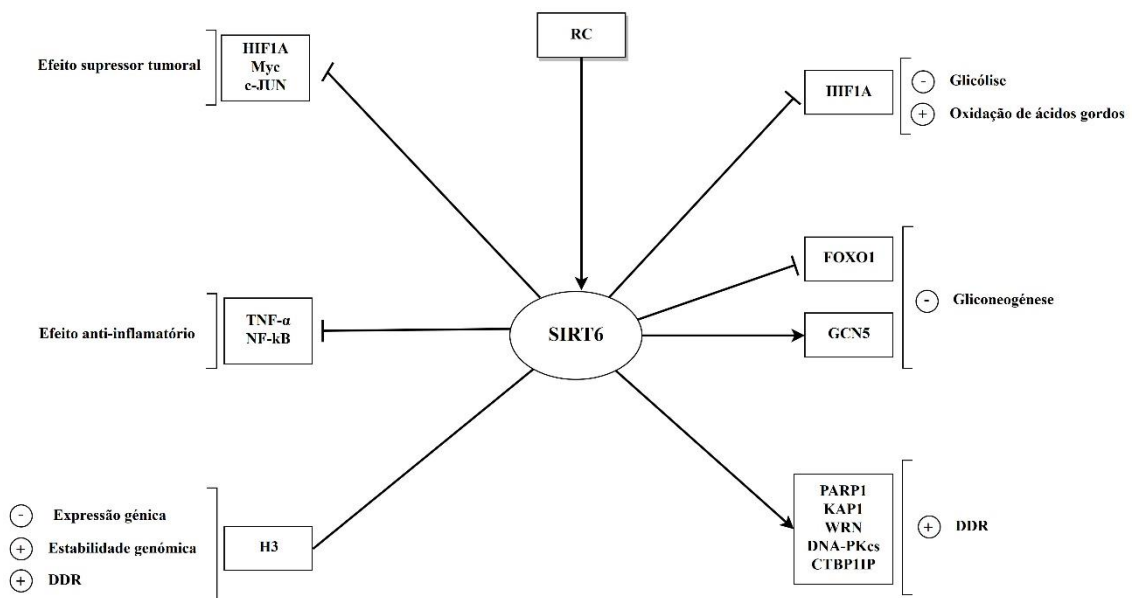


Figura 7 - Principais ações e ativador da SIRT6. Adaptado de Wątroba M em *Adv Med Sci* (19).

SIRT7

A SIRT7 tem uma localização nuclear, mais especificamente no nucléolo^{19,24} e participa na regulação epigenética do fenótipo celular²⁰, através de reações de desacetilação e desuccinilação.^{20,29}

A atividade da SIRT7 na região nucleolar, onde promove a biogênese mitocondrial e a síntese proteica, é responsável pelo potencial de rejuvenescimento celular (Figura 8). A saída desta para a cromatina ou citosol correlaciona-se com a senescência replicativa.^{19,20}

Através da desacetilação da GABPβ1 (do inglês *GA repeat binding-protein beta 1*), a SIRT7 promove a sua heterodimerização e consequente ativação, o que estimula a expressão de genes mitocondriais.³⁰

O fator de transcrição ELK4 recruta a SIRT7 para a região promotora de vários genes, onde, pela desacetilação da H3, promove a inibição da expressão gênica.^{20,24}

Em resposta a *stress* no retículo endoplasmático, por acumulação de proteínas disfuncionais, é ativado o fator de transcrição XBP1 (do inglês *X-box binding protein 1*). Este ativa a SIRT7 que, ao ser recrutada pelo fator de transcrição Myc, bloqueia, por desacetilação da H3, a transcrição de genes ribossômicos mediada pelo próprio Myc. A SIRT7 suprime assim a biogênese ribossômica.^{20,24,27}

Em células neoplásicas, dado que muitas proteínas supressoras tumorais são codificadas em regiões alvo das acetilases de H3, ao inibir a sua expressão, a SIRT7 contribui para a manutenção do fenótipo tumoral. No entanto, como não contribui para a carcinogênese, não há maior suscetibilidade de transformação neoplásica em células normais com níveis aumentados de atividade da SIRT7.^{19,20}

A SIRT7, através da desuccinilação da H3, promove a compactação da cromatina e a estabilidade genómica, sendo essencial à DDR - pela reparação de DSBs por união de extremidades não-homóloga – e à sobrevivência celular.²⁰

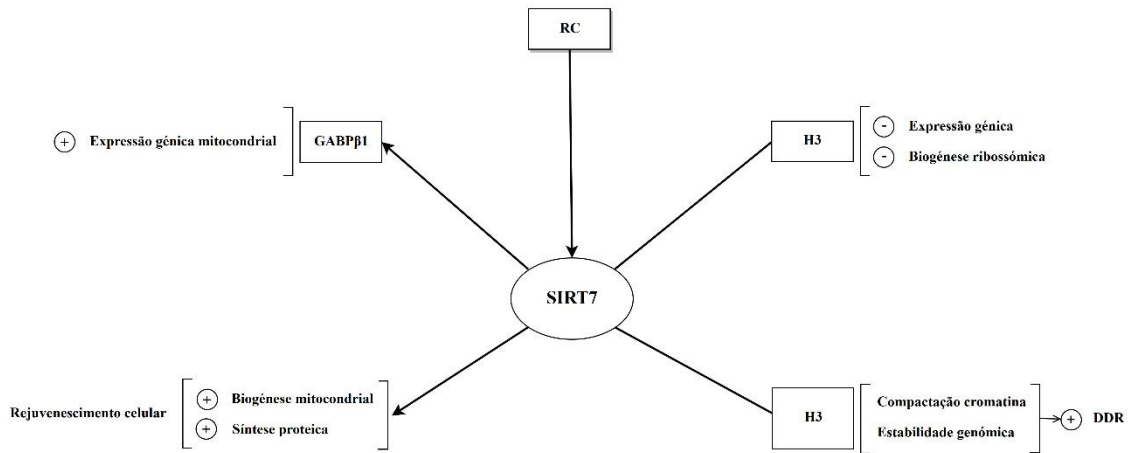


Figura 8 - Principais ações e ativador da SIRT7. Adaptado de Wątroba M em *Adv Med Sci* (19).

Restrição calórica - efeitos na saúde e envelhecimento

A RC é o regime alimentar que, de forma mais consistente, permite aumentar a longevidade nas diferentes espécies onde é estudado.⁶ Desde leveduras a roedores, uma restrição alimentar de 20 a 40% em relação a uma dieta normal demonstrou aumentar a longevidade em até 50%.^{6,16,34} No entanto, o grande interesse na RC reside na transposição destes resultados para a espécie humana. Dada a grande afinidade nos padrões de envelhecimento entre os primatas da espécie *Macaca mulatta* e a espécie humana^{16,35}, estes têm sido usados em estudos como os programas do *National Institute of Aging* e do *Wisconsin National Primate Research Center (WNPRC)*, onde foi aplicada uma RC de 30% em relação à ingestão calórica basal.⁶ Apesar de ambos os estudos terem demonstrado múltiplos benefícios funcionais e de saúde com atraso do início das doenças

associadas ao envelhecimento, apenas no WNPRC se observou impacto positivo significativo na longevidade.^{6,36} Em roedores, a composição da dieta e o genótipo foram identificados como fatores com impacto na longevidade, tendo-lhes sido atribuída a disparidade de resultados observada.³⁴ No entanto, surgiram dúvidas em relação aos resultados da RC quando o NIA afirmou que era improvável que fossem obtidos resultados diferentes com a continuação do estudo até ao fim de vida dos grupos estudados.³⁶ Ainda assim, múltiplos estudos têm demonstrado o benefício da RC em humanos.^{7,34,37} O programa CALERIE (do inglês *Comprehensive Assessment of the Long-term Effects of Reducing Intake of Energy*) do *National Institute of Health* é um estudo controlado e randomizado da RC em indivíduos não obesos realizado em três centros independentes e que consiste em 2 fases. A primeira divide-se em três estudos-piloto, com diferentes graus de RC (20, 25 e 30%), com uma duração de seis meses a um ano, em indivíduos com índice de massa corporal de excesso de peso (entre os 25 e os 29,9Kg/m²). A segunda é composta por três estudos, com uma RC de 25%, com duração de dois anos, em indivíduos jovens e de meia-idade saudáveis.³⁸ Este estudo concluiu que a RC é praticável em humanos e que produz efeitos favoráveis em preditores de longevidade como a redução de marcadores inflamatórios e fatores de risco cardiovasculares em grupos geneticamente heterogéneos.^{34,38}

Dada a dificuldade em realizar estudos de longa duração em humanos cujo o objetivo é a avaliação da sobrevivência, são escassos os resultados e as conclusões relativas à influência da RC na longevidade humana, sendo necessário estudar outros *endpoints*. Desta forma, estudos de curta duração em humanos e de longa duração em primatas não humanos demonstraram que a RC moderada tem efeitos benéficos a nível cardiovascular, no metabolismo dos glúcidos e neuroprotetores.⁷

As doenças cardiovasculares (DCV) e a diabetes *mellitus* tipo 2 são das principais doenças associadas ao envelhecimento. A RC tem impacto positivo na prevenção, no atraso da sintomatologia, no desenvolvimento e na reversão destas doenças.^{16,39} Fatores como a hiperlipidemia, a hiperglicemia e a disfunção endotelial, que provocam distúrbios na função cardíaca, estão associados às DCV.¹⁶ A aplicação da RC, durante pelo menos seis anos, na espécie humana, demonstrou uma diminuição dos níveis plasmáticos de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), de triglicéridos e da pressão arterial diastólica.³⁹ Outro estudo com introdução de RC em humanos, durante um período de dois a seis anos, demonstrou a diminuição de marcadores de DCV e de diabetes *mellitus* tipo 2 como a glicemia, lipidemia, pressão arterial e peso corporal.¹⁶ A RC ao diminuir a oxidação lipídica a nível plasmático, inibe a formação das placas ateroscleróticas¹⁶, o que diminui o risco de aterosclerose e melhora a função cardíaca.^{35,40} Relativamente à função cardíaca, os mecanismos responsáveis pela sua manutenção, como a autofagia, renovação celular mediada pelo proteassoma, apoptose e controlo de qualidade mitocondrial, são afetados pelo envelhecimento e recuperados pela RC.¹⁶ A resistência à insulina, na qual as células deixam de responder a normais níveis de insulina, é uma condição patológica que promove a hiperinsulinemia, a hiperglicemia e a evolução para diabetes *mellitus* tipo 2, e é considerada um dos principais marcadores do envelhecimento. Um dos seus principais responsáveis é a anomalia da oxidação dos ácidos gordos derivada da disfunção mitocondrial.¹⁶ A RC, por intermédio da SIRT1, promove a expressão e a biogénese mitocondrial. Assim, recupera a oxidação dos ácidos gordos, aumenta a sensibilidade à insulina e reduz a glicemia.^{16,35} A perda peso, além dos benefícios mecânicos como o alívio articular, ao estar associada à diminuição do tecido adiposo branco (potente órgão endócrino onde se produzem fatores pro-inflamatórios e de *stress* oxidativo que aceleram

o envelhecimento celular) tem um efeito anti-inflamatório e reduz a resistência à insulina.^{5,41}

A nível cognitivo, um estudo de RC em idosos saudáveis demonstrou uma maior plasticidade a nível sináptico, maior estimulação de vias neuroprotetoras e elevação significativa dos resultados obtidos em testes de memória como o teste de aprendizagem auditivo-verbal de Rey, um teste utilizado na avaliação dos processos de aprendizagem, de evocação e reconhecimento da memória episódica.³⁹

Por fim, dada a existência de efeitos secundários associados à RC, como a amenorreia, infertilidade, sarcopenia, osteoporose e deficiências no sistema imunitário⁴⁰, é de grande interesse o estudo de miméticos da RC (MRC) que promovam os seus efeitos benéficos evitando os efeitos secundários.

Dieta mediterrânica – efeitos na saúde e envelhecimento

A DM é composta não só pela componente alimentar, mas também a interação social e partilha de conhecimento, rituais e tradições. A nível alimentar baseia-se num consumo importante de cereais integrais, vegetais, frutos, legumes, ácidos gordos monoinsaturados como o azeite virgem, ácidos gordos polinsaturados como peixe e frutos secos, no consumo moderado de leite, laticínios e álcool, como vinho tinto às refeições e no baixo consumo de ácidos gordos saturados, gordura hidrogenada e de carne.

É um dos regimes alimentares e estilos de vida mais estudados e com maior evidência dos seus efeitos benéficos na saúde global do ser humano.^{13,42} As populações do Mediterrâneo com adesão à dieta mediterrânica apresentam menor mortalidade e maior longevidade quando comparadas com as do norte da Europa e dos Estados Unidos da América (EUA).^{9,13} Deste modo, de forma a estudar os seus efeitos, foram desenvolvidos

scores que permitissem avaliar a adesão de uma população à DM.^{12,42} Estes englobam os principais alimentos constituintes da dieta e a adesão é considerada maior quanto maior o valor do *score*.^{13,42} Assim, foram realizados múltiplos estudos que correlacionam a adesão à DM com a longevidade, mortalidade, doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus*, cancro e doenças neurodegenerativas, e avaliam o seu papel preventivo e terapêutico nestes contextos.^{12,42}

A síndrome metabólica é um conjunto de fatores de risco que tem origem na resistência à insulina e na anómala deposição e função de tecido adiposo. É diagnosticada quando três dos seguintes cinco critérios estão presentes: elevação da glicémia em jejum; pressão arterial alta; elevação da trigliceridémia; diminuição das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e/ou elevação do perímetro abdominal. Desta forma, é uma combinação de fatores de risco para várias doenças, nomeadamente cardiovasculares e diabetes *mellitus*. Duas meta-análises concluíram que um maior *score* de adesão à DM se associa a um menor risco de síndrome metabólico e a benefícios em todos os seus componentes.⁴² Esta adesão, ao diminuir as LDL e triglicéridos, e ao manter ou aumentar as HDL, melhora o perfil lipídico. Diminui também a homocisteinémia, a pressão arterial, a oxidação de ácidos gordos e a aterogénese.¹³ A nível cardiovascular, múltiplos estudos retrospectivos e prospetivos mostraram que uma maior adesão à DM está associada a menor risco e menos eventos coronários agudos em doentes previamente saudáveis, a uma redução da mortalidade em doentes com mais de 60 anos com antecedentes de enfarte agudo do miocárdio, a uma redução significativa da incidência ou mortalidade por doença de etiologia cardiovascular e que é possível reproduzir o efeito protetor (menor mortalidade por doença cardiovascular) da DM se esta for aplicada em populações não mediterrânicas (homens e mulheres dos EUA seguidos durante 10 anos com *score* de adesão alto).⁴² A nível do metabolismo dos glúcidos, a DM permite diminuir a glicémia e desta forma ajuda

no controlo da diabetes *mellitus*.¹³ Estudos retrospectivos e prospetivos mostraram que uma maior adesão à DM diminui o risco de desenvolver diabetes, a sua incidência e mortalidade. Em doentes com diabetes *mellitus* tipo 2 melhora o controlo metabólico ao diminuir a hemoglobina glicosilada e a glicémia pós-prandial, e diminui a taxa de mortalidade.⁴²

A ação preventiva deste regime alimentar em várias formas de cancro é atribuída a mecanismos que diminuem a produção de radicais livres e inflamação.¹² A DM está associada a uma redução dos leucócitos e plaquetas¹², sugerindo que seja um padrão alimentar anti-inflamatório com efeito protetor em doenças de patogénese inflamatória.^{12,13} Estudos retrospectivos e prospetivos demonstraram que uma maior adesão à DM se associa a uma redução significativa do risco de incidência de cancro em geral, excluindo cancro da pele não melanocítico⁴², bem como da mortalidade.^{12,42} Assim, a DM parece contribuir na prevenção de cancro colorretal, da mama, da próstata e do endométrio – respetivamente do maior para o menor impacto da DM.⁴² Relativamente ao cancro colorretal, os benefícios foram observados em doentes com fatores de risco específicos deste tipo de cancro, nomeadamente obesidade e diabetes *mellitus*.¹² No entanto, há resultados controversos. Em relação ao cancro da próstata, um estudo prospetivo, com seguimento durante 24 anos, não revelou menor incidência da neoplasia, ainda assim, a adesão à DM associou-se a uma menor mortalidade após o diagnóstico deste cancro não metastizado.¹² No que concerne ao cancro da mama, uma meta-análise não confirmou o efeito da DM no risco, denotando que a diminuição deste, observada nos outros estudos derivava de características individuais e fatores de risco das participantes, sendo observado em mulheres sem excesso de peso, não fumadoras e que não tinham uma menarca precoce.¹²

As doenças neurodegenerativas caracterizam-se por uma disfunção neuronal progressiva e a sua prevalência aumenta significativamente com o envelhecimento. Dada a sua elevada prevalência e aos seus efeitos incapacitantes, o estudo de estratégias preventivas tem um papel cada vez mais relevante.⁴² A adesão à DM está associada a um menor risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como o défice cognitivo ligeiro, a DA e outras demências, sendo o risco menor quanto maior o *score* de adesão.^{10,42} O *timing* ideal dos efeitos benéficos parece, no entanto, ser na fase prodrómica da disfunção cognitiva, antes de a demência estar em completa manifestação sintomatológica. Estudos controlados e randomizados em idosos com elevado risco cardiovascular, demonstrou que a introdução deste padrão alimentar suplementado com azeite virgem extra ou misturas de frutos secos aumentou significativamente o rendimento cognitivo global nos múltiplos testes realizados.¹⁰

Por conseguinte, a adesão a longo prazo da DM atua como um estilo de vida e regime alimentar anti-inflamatório que participa na prevenção e redução da mortalidade de doenças associadas a inflamação crónica como doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* tipo 2 e cancro, e desta forma na promoção da longevidade.

Miméticos da restrição calórica e seus efeitos na saúde e envelhecimento

A RC, ao ser um regime alimentar difícil de manter a longo prazo com efeitos adversos associados como a imunossupressão e diminuição da densidade mineral óssea²¹, conduziu ao estudo de MRC. Um candidato a MRC não deve alterar, a longo prazo, o padrão dietético, deve modular o metabolismo energético e deve ter impacto positivo na saúde e longevidade.^{5,21} Várias moléculas ativam as vias da sobrevivência associadas à RC.¹⁵ Uma das principais categorias de MRC é a das substâncias ativadoras de sirtuínas (STACs

– do inglês *sirtuin activating-compounds*). Atualmente, são conhecidos múltiplos STACs naturais, pertencentes a diferentes classes como a de estilbenos, chalconas e flavonóides, mas também sintéticos como imidazotiazóis, tiazolopiridinas e benzimidazóis. Os primeiros STACs da SIRT1, identificados em 2003, são polifenóis naturais, compostos por anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilo.^{15,43,44} Destes, vários são encontrados em alimentos recorrentes na DM, como o resveratrol, na uva e vinho tinto, o hidroxitirosol no azeite virgem, a quercetina em cebolas e alcaparras, a fisetina em maçãs, uvas, morangos e dióspiros, e o quempferol em repolhos, couves, outros vegetais crucíferos e salsa.¹⁴

O resveratrol (RSV) foi o primeiro e mais potente STAC natural a ser identificado^{43,45}, aumentando a atividade da SIRT1 até dez vezes.⁴⁴ Está presente na casca de uvas *Vitis vinifera* e tem elevada concentração no vinho tinto. O RSV pertence à classe dos estilbenos (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), é composto por dois anéis fenólicos ligados por uma ponte de metileno e existe, naturalmente, na forma *cis* e *trans*. Após a sua ingestão oral, este é, rapidamente, absorvido no trato gastrointestinal e metabolizado aos seus derivados sulfato e glicuronídeo, nos enterócitos. Dado que apenas 2% se mantém na forma agliconada, os efeitos do RSV são imputados às suas formas conjugadas.^{9,43} A ativação da SIRT1 apresenta como requisitos estruturais e estereoquímicos a presença de aminoácidos hidrofóbicos adjacentes ao resíduo de lisina alvo, o que permite o reconhecimento do substrato.¹⁵ O RSV, na forma de isómero *trans*, liga-se ao terminal N, não catalítico, da SIRT1, também denominado de domínio de ligação a STACs (SBD – do inglês *STAC binding domain*).^{15,43} Através de um mecanismo de “dobradiça” (composta pelos aminoácidos de arginina e ácido glutâmico), a ligação do RSV ao SBD promove a modificação da conformação. Este domínio volta-se para o local de interação entre o substrato e o domínio catalítico da SIRT1, e interage com o último pela criação

de uma ponte iónica e pontes de hidrogénio.¹⁵ Assim, a afinidade da ligação ao substrato aumenta, diminui a constante de Michaelis-Menten e define o RSV como um ativador alostérico tipo K da SIRT1.^{9,43,44} A identificação de uma mutação com substituição do ácido glutâmico pela lisina, na dobradiça, que impediu a ativação da SIRT1 pelo RSV e outros STACs sintéticos, demonstrou que os STACs atuam pelo mesmo mecanismo de ação direto.¹⁵

Estudos de suplementação do regime alimentar com RSV, em diferentes espécies, apresentaram resultados positivos a nível cardiovascular, metabólico, cognitivo e motor. Em ratinhos obesos, a suplementação produziu efeitos semelhantes à RC, como o aumento da sensibilidade à insulina, o aumento da resistência e função motora, e estimulou a génese mitocondrial. No entanto, em ratinhos não obesos não foram observados os mesmo resultados.⁶ Em primatas não humanos, a suplementação com RSV, durante uma dieta hiperlipídica e hiperglicídica, aumentou a sensibilidade à insulina, promoveu a preservação das células β pancreáticas e a expressão dos seus fatores de transcrição, preveniu o aumento da velocidade da onda de pulso e a inflamação da parede arterial.¹⁵ Estudos em humanos demonstraram melhoria no metabolismo da glicose e diminuição do risco cardiovascular. Em obesos sem outras comorbilidades, o RSV diminuiu a pressão arterial sistólica, a taxa metabólica em repouso e a resistência à insulina, no entanto, em não obesos não ocorreram alterações fisiológicas. O atraso do declínio cognitivo foi observado em doentes com DA. Em doentes diabéticos foi observada a redução da glicémia em jejum, da hemoglobina glicosilada e da resistência à insulina. No entanto, não diabéticos ou doentes com diabetes tipo 2 bem controlada não apresentaram alteração no perfil glicémico com a suplementação.^{9,15} Assim, estes resultados sugerem que o RSV tem melhores resultados no restauro da homeostasia em contexto de disfunção fisiológica.

Dado que o RSV e restantes STACs naturais são hidrofóbicos, apresentam baixa biodisponibilidade e interações múltiplas com outras moléculas, e que os STACs sintéticos de quinta geração apresentam, *in vitro*, uma ativação da SIRT1 mil vezes superior com resultados positivos na saúde, o estudo e desenvolvimento de STACs sintéticos é uma área promissora no prolongar da longevidade.^{15,43,46}

Discussão e Conclusão

A EMV praticamente duplicou no último século com a evolução dos cuidados de saúde, no entanto, o grande objetivo para o futuro da espécie humana passa por obter os mesmos resultados na “saúde do envelhecimento”.

A RC é considerada a estratégia mais robusta no atraso do envelhecimento, das doenças associadas ao mesmo e no aumento da longevidade. O mecanismo subjacente a este efeito ainda não se encontra plenamente esclarecido, dado que o estudo das suas verdadeiras consequências no ser humano, tendo este como objeto de estudo, é difícil de conduzir. No entanto, após um escrutínio rigoroso conclui-se que as sirtuínas constituem uma das principais vias de sinalização envolvidas. A sua maioritária ativação por agentes estressores, como a RC, envolve-as num grande espectro de processos, incluindo a recentemente descoberta, e ainda parca em informação, atuação em múltiplas reações de desacetilação e desacilação que ativam vias protetoras. Assim, são reguladores major do envelhecimento e de doenças associadas a este, conferindo um papel cardioprotetor, neuroprotetor, oncoprotetor e de controlo metabólico à RC. Adicionalmente, o silenciamento génico, a promoção da DDR e a manutenção da estabilidade genómica, obtidos pela desacetilação, desacilação e modulação da metilação de DNA, faz com que tenham, igualmente, um papel de relevo de regulação epigenética que promove o aumento

da longevidade. Desta forma, a expressão das sirtuínas é inversamente proporcional ao envelhecimento e a sua ativação é uma das principais vias de interesse no caminho do envelhecimento saudável.

A DM, património cultural imaterial da Humanidade pela UNESCO, é um dos melhores exemplos de uma dieta saudável com evidência clínica na prevenção e tratamento de doenças associadas a inflamação crónica. Dado que foi demonstrada a reprodutibilidade dos seus efeitos benéficos quando aplicada fora da região mediterrânica, tornou-se um dos principais pilares das políticas de saúde pública de múltiplos países. Apesar dos resultados contundentes na saúde, como a prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* tipo 2, cancro e a redução da mortalidade, os mecanismos responsáveis ainda não estão completamente esclarecidos, permanecendo a dúvida se resultam da ação de alimentos/nutrientes específicos ou da ação sinérgica entre estes.

O resveratrol, um dos polifenóis naturais constituintes da DM, é o ativador natural das sirtuínas mais potente já identificado, sendo um dos mecanismos de ação potencialmente envolvidos nos regimes alimentares em estudo. Desta forma, através do uso de ativadores alostéricos exógenos das sirtuínas é possível mimetizar os efeitos benéficos da RC evitando os efeitos secundários indesejados que lhe estão associados. Em diferentes espécies a suplementação com RSV teve um impacto positivo a nível cardiovascular, metabólico, cognitivo e motor. No entanto, em indivíduos saudáveis ou com patologia bem controlada não se obtiveram os mesmos efeitos, o que sugere que o RSV é mais eficaz no restauro da homeostasia em contexto de disfunção fisiológica. Por conseguinte, dado que os STACs contribuem para a prevenção e tratamento de várias patologias através da ligação à SIRT1, é importante estudar a existência de outros compostos da DM que possam ser MRC, perceber se as outras sirtuínas também poderão ser ativadas de

forma alostérica e investir no desenvolvimento e estudo de STACs sintéticos, uma vez que são mais potentes e com maior biodisponibilidade que os naturais.

Por último, tendo a prática clínica e o doente como principais prioridades e, tendo em conta o envelhecimento da população é recomendada a adesão a um regime alimentar com ligeira redução da ingestão calórica, baseado nos alimentos e nutrientes constituintes da DM, acompanhado de exercício físico e com partilha das refeições com familiares e amigos de forma a atrasar o envelhecimento, prevenir as doenças associadas a este e prolongar da longevidade.

Agradecimentos

À Professora Doutora Anabela Mota Pinto pela oportunidade concedida, pela disponibilidade e pelo rigor ao longo de todo o trabalho. À Professora Doutora Catarina Gomes pela orientação, disponibilidade e motivação.

Aos meus pais e à Filipa por tudo o que me dão de si, por me permitirem alcançar mais e por serem a minha principal fonte de motivação.

À Jessica por todo o apoio e paciência imprescindíveis.

Aos meus amigos, com um carinho especial aos que me são mais próximos, pela amizade demonstrada ao longo de todo este percurso.

Referências bibliográficas

1. Pinto AM, Botelho MA. Fisiopatologia do Envelhecimento. *Fisiopatologia - Fundamentos e Aplicações* 2ª Edição. 2013. p. 495–515.
2. WHO. WORLD REPORT ON AGEING AND HEALTH - 2015.
3. Mathers JC. Nutrition and ageing: knowledge, gaps and research priorities. *Proc Nutr Soc* 2013;72:246–250.
4. Taormina G, Mirisola MG. Longevity: Epigenetic and biomolecular aspects. *Biomol Concepts* 2015;6:105–117.
5. López-Otín C, Galluzzi L, Freije JMP, Madeo F, Kroemer G. Metabolic Control of Longevity. *Cell* 2016;166:802–821.
6. Carmona JJ, Michan S. Biology of Healthy Aging and Longevity. *Rev Invest Clin* 2016;68:7–16.
7. Roth GS, Ingram DK. Manipulation of health span and function by dietary caloric restriction mimetics. *Ann N Y Acad Sci* 2016;1363:5–10.
8. Santos J, Leitão-correia F, Sousa MJ, Leão C. Dietary Restriction and Nutrient Balance in Aging. *Oxid Med Cell Longev* 2016;
9. Martucci M, Ostan R, Biondi F, Bellavista E, Fabbri C, Bertarelli C, Salvioli S, Capri M, Franceschi C, Santoro A. Mediterranean diet and inflammaging within the hormesis paradigm. *Nutr Rev* 2017;75:442–455.
10. Knight A, Bryan J, Murphy K. Is the Mediterranean diet a feasible approach to preserving cognitive function and reducing risk of dementia for older adults in Western countries? New insights and future directions. *Ageing Res Rev Elsevier B.V.*; 2016;25:85–101.

11. Vasto S, Buscemi S, Barera A, Carlo M Di, Accardi G, Caruso C. Mediterranean diet and healthy ageing: A sicilian perspective. *Gerontology* 2014;60:508–518.
12. Ostan R, Lanzarini C, Pini E, Scurti M, Vianello D, Bertarelli C, Fabbri C, Izzi M, Palmas G, Biondi F, Martucci M, Bellavista E, Salvioli S, Capri M, Franceschi C, Santoro A. Inflammaging and Cancer: A challenge for the mediterranean diet. *Nutrients* 2015;7:2589–2621.
13. Vasto S, Barera A, Rizzo C, Carlo M Di, Caruso C, Panotopoulos G. Mediterranean diet and longevity: an example of nutraceuticals?. *Curr Vasc Pharmacol* 2014;12:735–738.
14. Pallauf K, Giller K, Huebbe P, Rimbach G. Nutrition and healthy ageing: calorie restriction or polyphenol-rich "MediterrAsian" diet? *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:707421.
15. Bonkowski MS, Sinclair DA. Slowing ageing by design: the rise of NAD⁺ and sirtuin-activating compounds. *Nat Rev Mol Cell Biol* Nature Publishing Group; 2016;230:2–3.
16. López-Lluch G, Navas P. Calorie restriction as an intervention in ageing. *J Physiol* 2015;594:2043–2060.
17. Riera CE, Merkwirth C, Magalhaes Filho CD De, Dillin A. Signaling Networks Determining Life Span. *Annu Rev Biochem* 2016;85:35–64.
18. Pan H, Finkel T. Key proteins and pathways that regulate lifespan. *J Biol Chem* 2017;292:6452–6460.
19. Watroba M, Szukiewicz D. The role of sirtuins in aging and age-related diseases. *Adv Med Sci* 2016;61:52–62.

20. Wątroba M, Dudek I, Skoda M, Stangret A, Rzodkiewicz P, Szukiewicz D. Sirtuins, epigenetics and longevity. *Ageing Res Rev Elsevier B.V.*; 2017;40:11–19.
21. Nikolai S, Pallauf K, Huebbe P, Rimbach G. Energy restriction and potential energy restriction mimetics. *Nutr Res Rev* 2015;1–21.
22. Cantó C, Menzies KJ, Auwerx J. NAD⁺Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metab* 2015;22:31–53.
23. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol Nature Publishing Group*; 2012;13:225–238.
24. Jing H, Lin H. Sirtuins in epigenetic regulation. *Chem Rev* 2015;115:2350–2375.
25. Martins R, Lithgow GJ, Link W. Long live FOXO: Unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell* 2016;15:196–207.
26. Shimobayashi M, Hall MN. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol Nature Publishing Group*; 2014;15:155–162.
27. Zwaans BMM, Lombard DB. Interplay between sirtuins, MYC and hypoxia-inducible factor in cancer-associated metabolic reprogramming. *Dis Model Mech* 2014;7:1023–1032.
28. Michan S. Calorie restriction and NAD⁺/sirtuin counteract the hallmarks of aging. *Front Biosci* 2014;19:1300–1319.
29. Herskovits AZ, Guarente L. Sirtuin deacetylases in neurodegenerative diseases of aging. *Cell Res Nature Publishing Group*; 2013;23:746–758.

30. Correia M, Perestrelo T, Rodrigues AS, Ribeiro MF, Pereira SL, Sousa MI, Ramalho-Santos J. Sirtuins in metabolism, stemness and differentiation. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* Elsevier B.V.; 2017;1861:3444–3455.
31. Laurent G, German NJ, Saha AK, Boer VCJ de, Davies M, Koves TR, Dephoure N, Fischer F, Boanca G, Vaitheesvaran B, Lovitch SB, Sharpe AH, Kurland IJ, Steegborn C, Gygi SP, Muoio DM, Ruderman NB, Haigis MC. SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase. *Mol Cell* 2013;50:686–698.
32. Polleta L, Vernucci E, Carnavale I, Tafani M. SIRT5 regulation of ammonia-induced autophagy and mitophagy 2. 2015;1–34.
33. Zhang N, Li Z, Mu W, Li L, Liang Y, Lu M, Wang Z, Qiu Y, Wang Z. Calorie restriction-induced SIRT6 activation delays aging by suppressing NF- κ B signaling. *Cell Cycle* 2016;15:1009–1018.
34. Lee C, Longo V. Dietary restriction with and without caloric restriction for healthy aging. *F1000Research* 2016;5:1–7.
35. Baur JA. Metabolic Effects of Caloric Restriction. *Life Sci* 2014;1–11.
36. Ingram DK, Roth GS. Calorie restriction mimetics: Can you have your cake and eat it, too? *Ageing Res Rev* Elsevier B.V.; 2015;20:46–62.
37. Golbidi S, Daiber A, Korac B, Li H, Essop MF, Laher I. Health Benefits of Fasting and Caloric Restriction. *Curr Diab Rep* Current Diabetes Reports; 2017;17.
38. National Institute of Health. CALERIE. <https://calerie.duke.edu/> (5 January 2018)
39. Martin SL, Hardy TM, Tollefsbol TO. Medicinal Chemistry of the Epigenetic Diet and Caloric Restriction. *Curr Med Chem* 2013;4050–4059.

40. Dabhade P, Kotwal S. Tackling the aging process with bio-molecules: a possible role for caloric restriction, food-derived nutrients, vitamins, amino acids, peptides, and minerals. *J Nutr Gerontol Geriatr* 2013;32:24–40.
41. Chedraui P, Pérez-López FR. Nutrition and health during mid-life: searching for solutions and meeting challenges for the aging population. *Climateric* 2013;16:85–95.
42. Dussaillant C, Echeverría G, Urquiaga I, Velasco N, Rigotti A. Evidencia actual sobre los beneficios de la dieta mediterránea en salud. *Rev Med Chile* 2016;144:1044–1052.
43. Testa G, Biasi F, Poli G, Chiarpotto E. Calorie restriction and dietary restriction mimetics: a strategy for improving healthy aging and longevity. *Curr Pharm Des* 2014;20:2950–2977.
44. Dai H, Ellis JL, Sinclair DA, Hubbard BP. Synthesis and Assay of SIRT1-Activating Compounds. 1st ed. *Methods Enzymol*. Elsevier Inc.; 2016.
45. Carafa V, Rotili D, Forgione M, Cuomo F, Serretello E, Hailu GS, Jarho E, Lahtela-Kakkonen M, Mai A, Altucci L. Sirtuin functions and modulation: from chemistry to the clinic. *Clin Epigenetics Clinical Epigenetics*; 2016;8:61.
46. Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, Faliva MA, Gerbi V, Vecchia C La, Negri E, Opizzi A, Perna S, Pezzotti M, Rondanelli M. Mediterranean Way of Drinking and Longevity. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014;8398:37–41.