



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

FILIFE GONÇALVES DIAS MATEUS

Influência da restrição calórica no envelhecimento

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE FISIOPATOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:
PROFESSORA DOUTORA ANABELA MOTA PINTO

JANEIRO/2017

Índice

Abreviaturas e Acrónimos.....	1
Resumo.....	3
Abstract	4
Introdução.....	5
1. Método	7
2. Resultados	8
2.1 Inflexão nas investigações sobre dieta e longevidade	8
2.2 Regimes dietéticos e envelhecimento.....	9
2.3 O papel dos aminoácidos nos regimes alimentares e os diversos efeitos	17
2.4 Proporções dietéticas e/ou restrição calórica?.....	24
2.5 O “caso de Okinawa” e a tese da proporção dietética ideal	26
2.6 Estudos realizados em humanos.....	35
Discussão/Conclusão.....	40
Agradecimentos.....	41
Referências Bibliográficas	42

Abreviaturas e Acrónimos

Akt/Pkb – Proteína quinase B

AMPK – Adenosine monophosphate-activated protein kinase

BCAA – Aminoácido de cadeia ramificada

CALERIE – Comprehensive Assessment of the Long-term Effect of Reducing Intake of Energy

DAF-16 – Fator de transcrição da FOXO

Daf-2 – Gene ortólogo do *C. elegans* que codifica o recetor de insulina/IGF-1

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FGT-1 – Facilitated glucose transporter, isoform 1

FOXA – A subclass of the forkhead family of transcription factors

FOXO – O subclass of the forkhead family of transcription factors

GAAC – General amino acid control

GCN2 – General control nonderepressible 2

GF – Geometric Framework

GH – Hormona de crescimento

Gis1p – Fator de transcrição da Rim15

GLUT – Transportador de glicose

HDL – Lipoproteínas de alta densidade

Hog1p – Quinase que regula a resposta ao stress

HPLC – High protein, low carb

hsPCR – Proteína C reativa de alta sensibilidade

IGF-1 – Insulin growth factor – 1

IL – Interleucina

IMC – Índice de massa corporal

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade

LPHC – Low protein, high carb

MeSH – Medical subject headings

Msn2p/4p – Fator de transcrição da Rim15

mTOR – Mammalian/Mechanistic target of rapamycin

NHANES – National Health and Nutrition Examination Survey

NRF – Nuclear respiratory factor

Pep-2 – Transportador de péptidos em *C. elegans*, ortólogo do PEPT-1

PEPT1 – Transportador de péptidos em mamíferos

PHA-4 – Fator de transcrição da FOXA

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

PKA – Proteína quinase A

Ras – Proteína da família de proteínas de pequenas GTPases

RC – Restrição calórica

Rim15 – Quinase resistente ao stress

ROS – Espécies reativas de oxigénio

S6K – Ribosomal protein S6 kinase

SIRT – Sirtuína

Sch9 – Ortólogo da S6K nas leveduras

SKN – Ortólogo no *Caenorhabditis elegans* das proteínas NRF dos mamíferos

T3 – Triiodotironina

TNF α – Fator de necrose tumoral α

TOR – Ortólogo do mTOR nas leveduras

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

VLDL – Lipoproteínas de muito baixa densidade

Resumo

Neste trabalho fazemos uma revisão da literatura mais recente sobre o tema da restrição calórica na sua relação com o equilíbrio de nutrientes. Daqui resulta a ideia de que é no contexto da investigação do equilíbrio de nutrientes que a restrição calórica joga o seu papel central, e não como estratégia isolada. Estes estudos, cada vez mais pormenorizados, avançam no sentido de que o contributo das proporções ideais de nutrientes na longevidade é o mais importante. O entrecruzamento de vários mecanismos e vias de transdução de sinais de nutrientes e de energia está implicado na proporção dietética testada desde as leveduras, a moscas da fruta e a mamíferos. Daqui resulta uma explicação plausível dos resultados da “dieta tradicional de Okinawa”. A via de sinalização da glicose, nuclear nas dietas de restrição calórica, e as vias de sinalização de aminoácidos, mediante o entrecruzamento das vias GCN2 (*General Control Nonderepressible 2*) e mTOR (*Mammalian/Mechanistic Target Of Rapamycin*), estão implicadas na regulação da longevidade verificada nos regimes de restrição de proteínas com alto teor de hidratos de carbono LPHC (*Low Protein, High Carb*), numa proporção dietética semelhante à verificada na dieta tradicional de Okinawa.

Palavras-chave

Restrição calórica; longevidade; dieta com restrição proteica; transdução de sinais; quinases de serina-treonina TOR.

Abstract

In this paper we reviewed the most recent literature on the subject of caloric restriction in its relation to the macronutrients balance. From the review comes the suggestion that it is in the context of nutrient balance and ideal ratios that caloric restriction plays its central role, and not as an isolated strategy. This idea corresponds to a scientific shift towards the detailed investigation of the contribution of optimal nutrient ratios on longevity. The interweaving of various mechanisms and signal transduction pathways of nutrient and energy is involved in the dietary proportion tested in yeast, fruit flies and mammals. From the investigation of these mechanisms comes a plausible explanation of the results of "traditional Okinawa diet". The signaling pathways of glucose, nuclear in energy-restricted diets, and of amino acids detection, through the intersection of GCN2 (General Control Nonderepressible 2) and mTOR (Mammalian/Mechanistic Target Of Rapamycin) pathways, are implicated in the regulation of longevity recorded in the LPHC restriction systems (Low Protein, High Carb), a dietary proportion similar to that of the traditional Okinawa diet.

Keywords

Caloric restriction; longevity; diet, protein-restricted; signal transduction; TOR serine-threonine kinases.

Introdução

Nas condições e contextos das sociedades contemporâneas, com uma esperança média de vida nunca antes alcançada, a questão do envelhecimento ganhou novos contornos. O interesse pela manutenção de uma qualidade de vida do ponto de vista físico e cognitivo, no envelhecimento, tem orientado um conjunto de investigações que congrega a Biologia, a Medicina, a Genética (com crescente interesse pela Epigenética), as Neurociências, com destaque para a Neurobiologia. A Biologia do Envelhecimento é, no fundo, uma investigação sobre o próprio “funcionamento” da vida e, assim, o conhecimento científico do metabolismo celular liga-se com o estudo dos hábitos humanos, em particular a nutrição. No panorama atual, a nutrição é uma das chaves para a biologia do envelhecimento (1).

O envelhecimento e a longevidade são extremamente complexos. Para indivíduos da mesma espécie muito contribuem fatores genéticos, ambientais e comportamentais (2). O aprofundamento dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de envelhecimento contribuiu para esclarecer as formas através das quais a nutrição desempenha um papel fundamental. As atividades da célula, tais como a regulação do metabolismo, do crescimento e do envelhecimento, são harmonizadas por uma rede de vias de sinalização de nutrientes e de energia que os vários tipos de organismos preservam na sua “memória”. Isto manifesta-se desde as leveduras aos insetos e mamíferos (1).

De destacar os estudos sobre as quatro vias mais decisivas de sinalização envolvidos na dinâmica do envelhecimento e a sua importância nos estudos sobre dieta e longevidade: a regulação pelas sirtuínas (3), IGF-1 (*Insulin Growth Factor – 1*), o alvo de rapamicina (TOR-Sch9 - Ortólogo nas leveduras do mTOR/S6K) e o Ras/PKA (Proteína Quinase A) são vias de sinalização cujo papel na relação dieta/longevidade foi realçado no conjunto de investigações

revistas. A redução da atividade destas vias foi reconhecida como suscetível de produzir efeitos na saúde e na longevidade dos modelos (4).

O interesse em torno das propriedades e interações dos vários nutrientes e os seus efeitos no envelhecimento, tem vindo a articular-se com as experiências em restrição calórica (RC), no sentido de encontrar as proporções dietéticas mais adequadas para uma vida saudável e para uma maior longevidade.

Neste trabalho procuramos dar conta deste interesse crescente, destacando a problemática da restrição calórica e/ou equilíbrio de macronutrientes como a sua orientação central. Nesta linha de investigação, encontram-se os processos que poderão dar razão dos casos de longevidade na comunidade de Okinawa, no Japão, exemplo da importância de certas proporções dietéticas e do papel da RC. O que se pretende mostrar a partir desta revisão é que é no contexto de tais equilíbrios de nutrientes que a restrição calórica joga o seu papel e não como estratégia isolada. Nas experiências revistas podemos desde já realçar que, para além da sinalização da glicose, chave nas dietas de restrição calórica, a sinalização de aminoácidos mediante o entrecruzamento das vias GCN2 (proteína quinase responsável pela sinalização e deteção de níveis baixos de aminoácidos) e mTOR (proteína que intervém no metabolismo e controlo de aminoácidos, lípidos, insulina e fatores de crescimento) pode, também, estar implicado na regulação da longevidade verificada nos regimes de restrição de proteínas, como é o caso das dietas restritivas LPHC (*Low Protein, High Carb*). São estes mecanismos que explicam o sucesso das proporções dietéticas verificadas na dieta tradicional de Okinawa (5,6).

No capítulo “Resultados” será feita uma revisão das experiências mais recentes que permitiram estabelecer o papel de certas vias de sinalização de nutrientes no metabolismo, crescimento e longevidade.

1. Método

Na nossa pesquisa recorreremos ao portal PubMed, onde testámos as variações da ocorrência de palavras-chave, como os termos MeSH (*Medical Subject Headings*): “restrição calórica”; “longevidade”; “dieta com restrição proteica”; “transdução de sinais”; “quinases de serina-treonina TOR”, incluindo as possíveis relações negativas e de exclusão destas palavras-chave. Pesquisámos ainda por outros termos, que apesar de não serem MeSH, considerámos relevantes para aprofundar alguns aspetos do trabalho: “dieta de Okinawa”; “Ramadão”; “equilíbrio de macronutrientes”. Assim que seleccionámos o artigo de revisão mais recente do especialista David G. Le Couteur (4), encontramos a linha de desenvolvimento central do nosso trabalho, a qual passa por evidenciar uma inflexão nos estudos sobre dieta e longevidade, no sentido da especificação do valor e dos equilíbrios de macronutrientes. Voltámos ainda a pesquisar na PubMed a partir da palavra-chave “vias de sinalização de nutrientes”, encontrando mais um texto recente decisivo para esta linha de pesquisa, uma vez que permite uma explicação plausível da longevidade da população de Okinawa (5). Procurámos também a existência de teses que discutissem quer a restrição simples, quer o papel da dieta no prolongamento da vida naquele caso japonês (7).

Encontrados os artigos, também na língua portuguesa, fizemos um estudo das suas teses, uma aferição do peso científico dos seus autores e do tipo de investigação que têm dirigido, dos modelos testados (animais, moscas da fruta, leveduras, etc.) e ainda se acrescentavam ou propunham metodologias de investigação inovadoras. A data recente dos artigos foi também um critério, tendo inclusivamente encontrado várias revisões de literatura de 2016. Algumas das referências bibliográficas encontradas nestes artigos também foram consultadas, revelando-se esclarecedoras.

2. Resultados

2.1 Inflexão nas investigações sobre dieta e longevidade

O estudo dos mecanismos que regulam o processo do envelhecimento tem sido realizado quer por meio de manipulações genéticas das vias de sinalização de nutrientes, quer através da utilização de protocolos de restrição dietética, nos quais a ingestão de um ou mais macronutrientes é reduzida, sem implicar a perda de nutrientes essenciais. Como sabemos, o protocolo dietético mais antigo e mais bem documentado é o da redução da ingestão calórica sem falta de nutrientes essenciais, a chamada restrição calórica. Os benefícios da RC foram descritos pela primeira vez em 1935, no artigo clássico de Clive McCay e Mary Crowell, com dados sobre o aumento da esperança de vida de ratos, face à redução da ingestão de alimentos (4). Este artigo terá marcado desde então a linha de investigação dominante sobre os mecanismos envolvidos nos efeitos positivos da RC no aumento da esperança de vida, bem como sobre a melhoria da saúde em geral. As experiências no quadro desta tradição testaram as diversas hipóteses em organismos modelo, tais como: leveduras, moscas da fruta, nemátodes, ratos e macacos *rhesus*. Desde então, muitas investigações têm confirmado os efeitos benéficos da RC, mas atualmente a comunidade científica tem revelado uma crescente curiosidade sobre as interações RC/proporções de nutrientes (macronutrientes) (5,8–10).

A procura de conhecimento mais aprofundado sobre as várias vias de sinalização de diferentes nutrientes começa a ter um crescente impacto na investigação científica. As vias sinalizadoras, como a AMPK (*Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase*) e as sirtuínas, são conhecidas como portadoras da capacidade de intervir na longevidade de vários organismos modelo, em resposta aos regimes alimentares (4,8,10). Nesta linha, tem vindo a crescer um conjunto de investigações científicas que visa uma descrição detalhada destas vias de sinalização de nutrientes em diferentes modelos (6).

Atualmente, verifica-se uma inflexão no sentido de ligar as experiências de RC a experiências, mais detalhadas, sobre variações no equilíbrio de nutrientes, de forma a esclarecer o papel das proporções de proteínas e de calorias, e de ambas com as gorduras, no aumento da esperança de vida e no controlo de certas patologias. Nesta nossa revisão da literatura recente queremos mostrar alguns dos resultados desta tendência, crescente na comunidade científica, e diferenciar os tipos e equilíbrios de nutrientes que podem ligar-se a uma RC. Os estudos realizados em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e em nemátodes *Caenorhabditis elegans* (3), têm fornecido novas provas que realçam a importância do equilíbrio de nutrientes em regimes de dieta e que diferenciam os seus efeitos sobre a regulação da longevidade. Estes resultados desafiam a noção clássica segundo a qual a redução indiscriminada da ingestão de calorias, só por si, prolongaria a vida (5,8,10).

2.2 Regimes dietéticos e envelhecimento

As experiências que aqui referimos revelam que, em diferentes organismos modelo, a ativação das vias que regulam o metabolismo e o crescimento, também é capaz de modular o envelhecimento e o aumento de mortalidade.

A *S. cerevisiae* tem sido o modelo de levedura mais testado no estudo dos mecanismos envolvidos na regulação da longevidade, através da avaliação da sobrevivência das células em culturas em fase estacionária (9,11). Estas observações foram realizadas sob diferentes regimes alimentares e revelam que a redução da concentração de glicose no meio (geralmente de 2% para 0,5%) aumenta a esperança média de vida em cerca de 25% (12). Para além deste efeito, também foram investigados os resultados de vários outros nutrientes individuais na regulação da longevidade a partir de culturas no meio. Na *S. cerevisiae* a presença maior ou

menor de certos nutrientes pode ativar múltiplas vias de sinalização de nutrientes tais como a TOR1-Sch9, via ativada essencialmente por aminoácidos, e a Ras/PKA, que responde, principalmente, à presença da glicose, mas que é igualmente regulada por outros nutrientes importantes (10,11,13) (Fig.1). Estas vias sinalizadoras são suscetíveis de promover a divisão celular e o crescimento em resposta a nutrientes, ao mesmo tempo que reduzem a capacidade de resposta celular do organismo ao stress e o processo da autofagia, diminuindo, portanto, a longevidade. Verifica-se, de fato, que o mTOR é o principal regulador negativo da autofagia. Além do mais, apresenta uma forte associação ao processo de envelhecimento, tendo estreita relação com algumas doenças a ele normalmente associadas, nomeadamente neurodegenerativas (14). Numa experiência em que a manipulação genética induziu uma mutação de TOR e Sch9p, conferindo-lhes deficiência, a RC proporcionou resistência ao stress oxidativo e permitiu uma prorrogação da esperança média de vida, indicando a presença de outros mecanismos importantes para a extensão da vida útil mediada pela restrição calórica (11). De forma semelhante, a supressão de Ras2 aumenta a vida útil e induz uma maior resistência ao stress oxidativo (11,13).

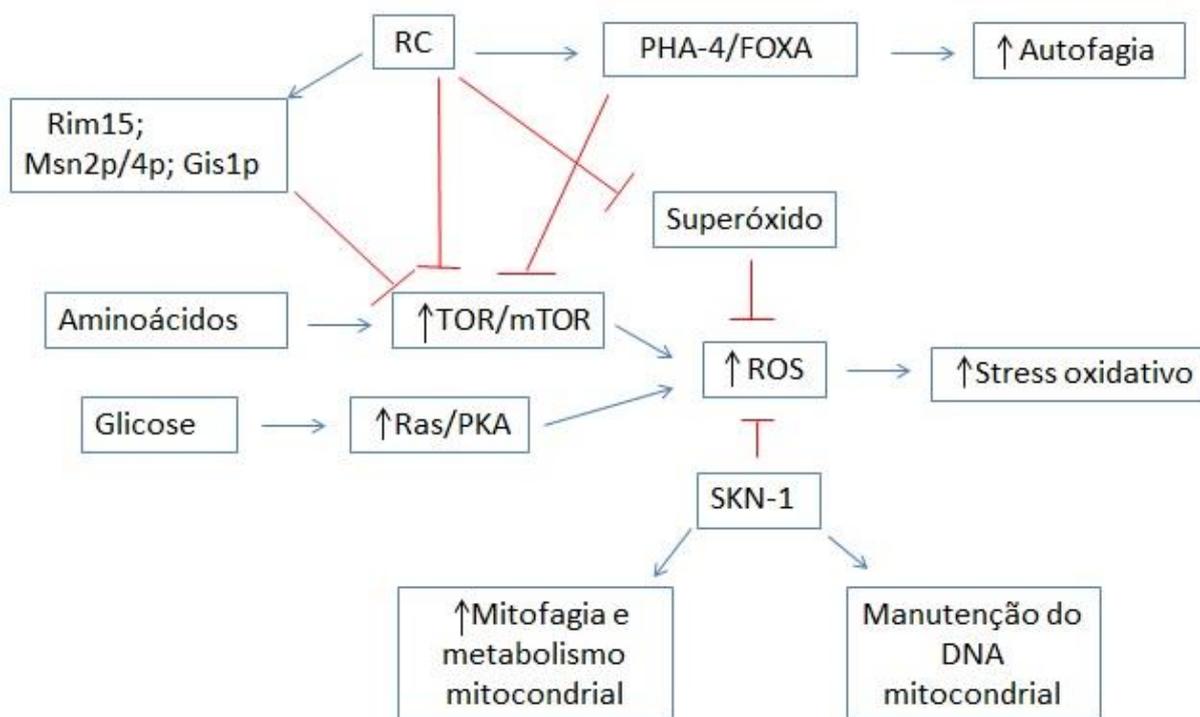


Figura 1 Algumas das principais vias envolvidas no processo de envelhecimento e na sua relação com a restrição calórica

FOXA (A Subclass of the Forkhead Family of Transcription Factors); Gis1p (Fator de Transcrição da Rim15); MSN2p/4p (Fator de Transcrição da Rim15); mTOR (Mammalian/Mechanistic Target of Rapamycin); PHA-4 (Fator de Transcrição da FOXA); PKA (Proteína Quinase A); Ras (Proteína da Família de Proteínas de Pequenas GTPases); RC (Restrição Calórica); RIM15 (Quinase Resistente ao Stress); ROS (Espécies Reativas de Oxigénio); SKN-1 (Ortólogo no *Caenorhabditis elegans* das Proteínas NRF dos Mamíferos); TOR (Ortólogo do mTOR nas Leveduras)

A quinase Rim15 e os seus fatores de transcrição resistentes ao stress, Msn2p/4p e Gis1p, desempenham papéis fundamentais na mediação de efeitos de RC na longevidade (Fig.1). Diminuem a sinalização da via TOR-Sch9, estendendo a esperança média de vida da *S. cerevisiae*, através da modulação de funções mitocondriais (11,13). Nestes testes de manipulação foi comprovado que, em fases ativas de crescimento, a inibição genética ou farmacológica do TOR resulta numa ampliação do acoplamento mitocondrial, com diminuição de espécies reativas de oxigénio (ROS). Daqui resulta um aumento de ativação de membrana mitocondrial, que fornece um sinal adaptativo suscetível de prorrogar a esperança média de vida da fase estacionária do ciclo de vida desta levedura (na qual as taxas de crescimento e morte celulares deveriam ser iguais) (15) (Fig.1).

Outras investigações têm relatado ainda que a RC amplia a esperança média de vida mediante a redução dos níveis de anião superóxido, independentemente da Rim15, havendo menor produção de ROS (15). Igualmente, tem sido confirmado que os limiares respiratórios das mitocôndrias de leveduras regulam a sua esperança média de vida e extensão mediante uma RC, uma vez que é necessária uma capacidade respiratória mínima para a extensão da esperança média de vida (16).

O papel do fator de crescimento da insulina (IGF-1) na modulação do envelhecimento foi descoberto pela primeira vez em experiências com o nemátode *Caenorhabditis elegans*, demonstrando que a via de sinalização iniciada pela PI3K (Fosfatidilinositol 3-Quinase), que ativa a akt (Proteína Quinase B) (e esta, por sua vez, o mTOR), é responsável pela regulação (diminuição) da longevidade (Fig.2). Desde então, a via de sinalização do IGF-1 tem sido encontrada ainda noutras funções biológicas do *C. elegans* (17). A inibição desta via, mediante mutações funcionais no Daf-2, um gene do *C. elegans* que codifica o recetor de insulina/IGF-1, reduz o processo de envelhecimento e conduz a alterações de transcrição de genes de resposta ao stress e ao metabolismo de energia. Essa inibição, causadora das mutações no Daf-2, pode ser feita através do DAF-16, fator de transcrição da FOXO (família de fatores de transcrição, codificada pelo gene homólogo, que está associada a maior longevidade, pela regulação que exerce sobre a auto-imunidade e protecção celular). Verifica-se que a ingestão de dietas com alto teor de glicose diminui a expressão de proteínas pró-longevidade, entre as quais a FOXO. Como tal, se se restringir o seu consumo, haverá um aumento da expressão dessas proteínas e, conseqüentemente, aumento da esperança de vida (10,17) (Fig. 2).

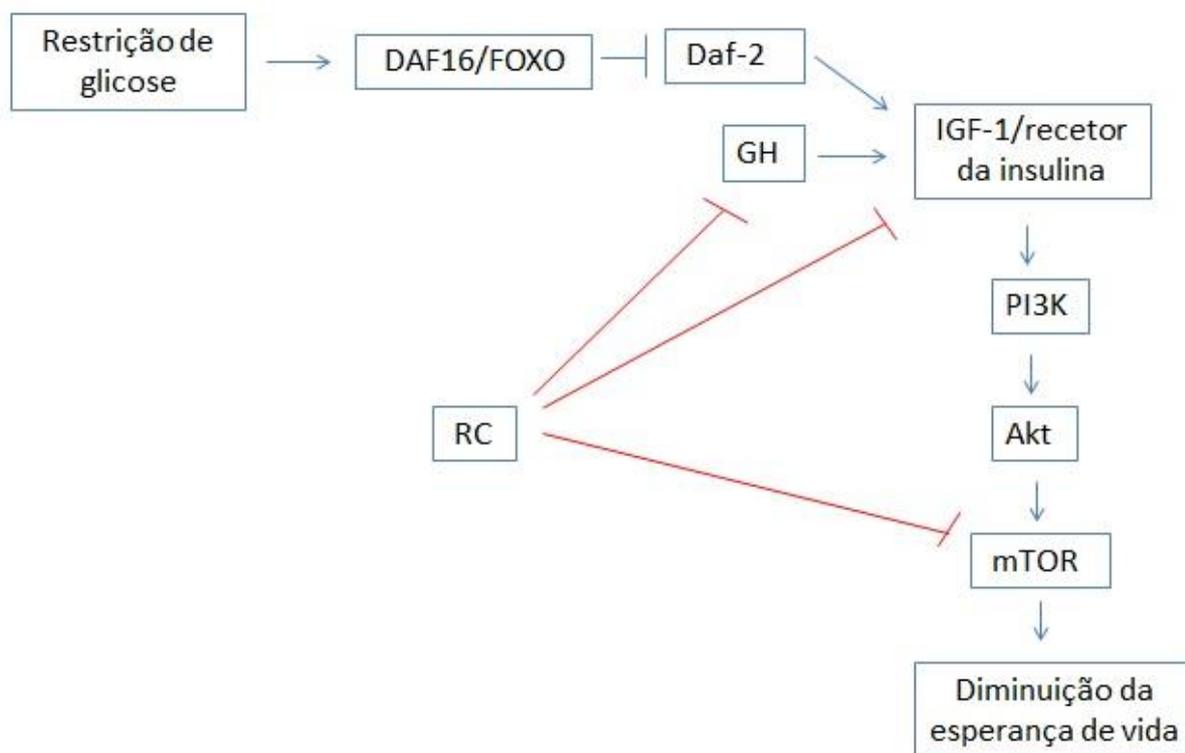


Figura 2 Algumas das ações da restrição calórica

Akt (Proteína Quinase B); Daf-2 (Gene Ortólogo do *C. elegans* que Codifica o Recetor de Insulina/IGF-1); DAF16 (Fator de Transcrição da FOXO); FOXO (O Subclass of the Forkhead Family of Transcription Factors); GH (Hormona de Crescimento); IGF-1 (Insulin Growth Factor – 1); mTOR (Mammalian/Mechanistic Target of Rapamycin); PI3K (Fosfatidilinositol 3-Quinase); RC (Restrição Calórica)

Um outro processo que aumenta a longevidade nos seres com mutação no Daf-2 é através da regulação negativa da via de sinalização mTOR-S6K e da autofagia parcialmente induzida pelo PHA-4/FOXA (fator de transcrição desta família) (13). Um terceiro fator de transcrição é o SKN-1, ortólogo no *C. elegans* das proteínas NRF (*Nuclear Respiratory Factor*) dos mamíferos, que regula a mitofagia e metabolismo mitocondrial, reduz as ROS e é essencial para a manutenção do DNA (Ácido Desoxirribonucleico) mitocondrial (15,16) (Fig.1). Todos estes processos controlam os genes envolvidos no processo da autofagia, contribuindo para uma maior longevidade.

Também neste modelo experimental as vias de sinalização TOR e IGF-1 parecem agir em sinergia, por intermédio de mecanismos que se sobrepõem parcialmente para controlar a longevidade. No caso do *C. elegans*, o protocolo de restrição dietética mais comum para

reduzir a ingestão de nutrientes, sem malnutrição, tem sido realizado, quer através da diminuição da sua fonte principal de alimentação bacteriana, a *Escherichia coli*, quer através da utilização de diluição bacteriana, o que pode aumentar a longevidade (18). Um outro método ainda é a redução da capacidade de alimentação: o aumento da esperança de vida foi observado nos casos de indução de mutações nas capacidades de alimentação, tal como a eliminação de EAT-2, um canal iónico que regula a taxa de bombeamento dos músculos faríngeos (13).

Em *C. elegans* sabe-se que as dietas ricas em glicose diminuem a esperança de vida, pela regulação negativa de proteínas pró-longevidade, como a AMPK, FOXO e glioxalase, com diminuição das mesmas (Tabela 1) (10). Nas investigações mais recentes, foi descoberto no *C. elegans* um transportador de glicose que permite articular restrição de nutrientes e sinalização do envelhecimento. O transportador de glicose FGT-1, um gene ortólogo da proteína transportadora GLUT dos mamíferos, parece ser responsável, não só pela atividade de transporte, mas também pela sinalização do metabolismo da glicose. Reduzindo a sua atividade, aumenta a esperança de vida para o mesmo nível obtido através da diminuição da sinalização Daf-2 (19).

Proteínas e vias a favor e contra a longevidade	
A favor	Contra
AMPK	Daf-2
DAF16/FOXO	FGT-1 (<i>C. elegans</i>)
GAAC	Insulina/IGF-1/GH
GCN2	mTOR/S6K
Gis1p	PI3K/Akt/mTOR
Glioxalase	Ras/PKA (leveduras)
Hog1p	TOR1-Sch9 (leveduras)
Msn2p/4p	
NRF	
Pep-2	
PEPT1	
PHA-4/FOXA	
Rim15	
Sirtuínas	
SKN-1 (<i>C. elegans</i>)	

Tabela 1 Proteínas e vias a favor e contra a longevidade

Akt (Proteína Quinase B); DAF16 (Fator de Transcrição da FOXO); FGT-1 (Facilitated Glucose Transporter, Isoform 1); FOXA (A Subclass of the Forkhead Family of Transcription Factors); FOXO (O Subclass of the Forkhead Family of Transcription Factors); GAAC (General Amino Acid Control); GCN2 (General Control Nonderepressible 2); GH (Hormona do Crescimento); Gis1p (Fator de Transcrição da Rim15); Hog1p (Quinase que Regula a Resposta ao Stress); IGF-1 (Insulin Growth Factor – 1); Msn2p/4p (Fator de Transcrição da Rim15); mTOR (Mammalian/Mechanistic Target of Rapamycin); NRF (Nuclear Respiratory Factor); Pep-2 (Transportador de Péptidos em *C. elegans*, Ortólogo do PEPT-1); PEPT1 (Transportador de Péptidos em Mamíferos); PHA-4 (Fator de Transcrição da FOXA); PI3K (Fosfatidilinositol 3-Quinase); Rim15 (Quinase Resistente ao Stress); S6K (Ribosomal Protein S6 Kinase); Sch9 (Ortólogo da S6K nas Leveduras); SKN-1 (Ortólogo no *Caenorhabditis elegans* das Proteínas NRF dos Mamíferos); TOR1 (Ortólogo do mTOR nas Leveduras)

Na mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, a redução da ativação da via de sinalização IGF-1, mediante restrição de consumo proteico, mostra uma extensão da vida útil, o que confirma a conservação do papel desta via do ponto de vista evolutivo (10). A inibição direta da via do TOR nesta espécie traduz-se num aumento de 30% de vida saudável. No entanto, as mutações do recetor da insulina ainda respondem à restrição dietética, tal como mutantes de FOXO que foram anulados, sugerindo que só uma sobreposição parcial de mecanismos de IGF-1 e de restrição dietética poderia mediar a extensão da vida saudável, indicando ainda a existência de outras vias de resposta aos nutrientes (17). O protocolo de restrição dietética habitual em moscas da fruta é uma dieta *ad libitum*, mas diluída, em que os

teores de açúcar e de proteínas são alterados para determinar a longevidade máxima. De fato, o emprego de concentrações fixas de açúcar, mas com a redução de calorias de leveduras, que são a fonte de proteínas, pode prolongar significativamente a longevidade, ao passo que a simples restrição de açúcar na dieta atinge apenas uma extensão modesta da vida útil. Isto parece indicar que a restrição de proteína é mais importante para a extensão da vida em moscas da fruta (20) (Gráfico 1). Sugere ainda, o que veremos adiante, a importância das proporções de nutrientes nas dietas restritivas, mais do que a simples redução calórica.

Quanto à experimentação em modelos mamíferos, a modulação quer por via genética, quer nutricional ou farmacológica, das vias IGF-1 e mTOR, revela impactos no envelhecimento e no retardar de doenças ligadas ao envelhecimento. A hormona do crescimento (GH) estimula a produção de IGF-1, o que pode ser limitado pela RC, sugerindo que esta restrição ativa vias de longevidade, devido à restrição de energia, a qual altera a regulação do ciclo celular e, conseqüentemente, inibe a proliferação de células e aumenta a apoptose. A RC, ao limitar a sinalização através da via IGF-1 e o recetor da GH em roedores, é capaz de melhorar significativamente o estado de saúde, reduzir a ocorrência de inúmeras doenças relacionadas com a idade e de estender a vida útil em até 60%, diminuindo os níveis de IGF-1 e insulina (3,21). Recentemente, os efeitos benéficos da RC e da redução dos níveis de IGF-1 foram confirmados, após a ação inibitória sobre a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, com vista à redução da atividade do mTOR, resultando num aumento significativo da vida útil (6) (Fig. 2). Quanto ao modelo dietético utilizado em mamíferos, recorreu-se à diminuição da ingestão de calorias (RC), a qual é a intervenção dietética mais estudada e com resultados mais confirmados no que diz respeito à extensão do tempo e da vida saudável em mamíferos. Entre os outros protocolos dietéticos que têm vindo a ser cada vez mais testados incluem-se a restrição de proteínas e o jejum intermitente, que não exigem uma redução na ingestão de calorias. Os mamíferos submetidos a RC têm a sua dieta calórica

reduzida, normalmente 20 a 40% da dieta *ad libitum* ministrada aos animais de controlo e apresentam um prolongamento da vida útil em cerca de 40% (13). Contudo, um estudo, que iremos explorar mais adiante, relatou um aumento de 75% relativamente ao grupo de controlo (4). Estes efeitos devem-se em parte à redução da ocorrência de doenças crónicas, como cancro, diabetes e doenças cardiovasculares (13,21).

2.3 O papel dos aminoácidos nos regimes alimentares e os diversos efeitos

Os resultados em leveduras (5,7,8,10,11), descritos anteriormente, favorecem claramente a perspetiva científica emergente segundo a qual o equilíbrio de nutrientes, mais do que a simples redução calórica, desempenha um papel predominante nos efeitos benéficos da restrição dietética, com grande impacto na regulação da longevidade.

Vamos referir agora as investigações, em número crescente, que têm procurado esclarecer quais os nutrientes, as suas proporções na dieta e as suas interações, mais importantes para a regulação da longevidade. Por exemplo, o caso das proteínas e aminoácidos que têm sido estudados como ativadores de vias de sinalização de nutrientes específicos envolvidos na regulação da longevidade em vários organismos modelo.

Nas leveduras, a composição de aminoácidos na dieta foi associada à regulação da esperança média de vida. Várias revisões assinalam efeitos diferentes dos aminoácidos, dependendo da ativação ou não da via TOR, sobre a extensão da vida. A este respeito sabe-se que a carência de aminoácidos não essenciais, utilizados como fontes preferenciais de azoto pode estender a esperança média de vida, ao passo que a supressão de certos aminoácidos essenciais reduz a esperança média de vida. Os aminoácidos, a título individual, têm sido reconhecidos por afetarem a longevidade. É o caso da leucina, que influencia a autofagia

celular e cuja suplementação durante a RC resulta em extensão da esperança média de vida (9). Pelo contrário, a restrição de metionina tem sido descrita como suscetível de estender a esperança média de vida de uma forma dependente da autofagia, conferindo resistência a agressões, mediante a sinalização celular de resposta ao stress (22). A isoleucina, a treonina e a valina têm a capacidade de estender a esperança média de vida através da via de sinalização e de controlo geral de aminoácidos (GAAC). A sinalização de certos aminoácidos, tais como leucina, ocorre através da sua regulação sobre o mTOR (9), enquanto a ausência de aminoácidos individuais é detetada através do GCN2 (*General Control Nonderepressible 2*) (23). A regulação destas duas quinases aparece, em muitas investigações revistas, como envolvida na modulação da longevidade mediante restrição dietética (8,10,13).

Para além dos aminoácidos, uma outra fonte de azoto vulgarmente utilizada pelas leveduras *S. cerevisiae*, o amónio, foi identificada como mais um fator chave na modulação da longevidade daquelas leveduras. O amónio atua como tóxico, como um fator extrínseco que afeta a esperança média de vida da levedura, em condições de restrição de aminoácidos. Em condições de RC, os efeitos da privação de aminoácidos no envelhecimento da levedura dependem do aminoácido essencial específico do qual as leveduras foram privadas e da respetiva sinalização. No caso da privação da leucina ou da histidina, a mediação diminuição da esperança de vida é exercida pela ativação do TOR1p; no caso da privação de lisina, é pela ativação do Ras2p. Já o Sch9p, no sentido contrário ao do TOR1p e do Ras2p, medeia a sobrevivência da célula, visto ser essencial para a fosforilação Sch9p-dependente do Hog1p (quinase que regula a resposta ao stress independentemente das vias TOR e PKA). Estes resultados científicos sugerem que a presença de amónio, enquanto fonte de azoto, pode ser parcialmente responsável pela diminuição da esperança média de vida em células privadas de certos aminoácidos essenciais, como a leucina, lisina ou histidina. Este trabalho científico tem

proporcionado novas perspectivas sobre a modulação da longevidade por parte de vários nutrientes, ligando toxicidade à limitação de aminoácidos específicos (9).

Segundo esta nova linha de investigação, no *C. elegans* os aminoácidos e as proteínas em abundância diminuem a vida útil. Neste âmbito, foi atestado num estudo recente que a GCN2, a quinase evolutivamente conservada que responde diretamente à deficiência de aminoácidos, desempenha um papel central na extensão de vida útil em condições de restrição. Isto acontece devido à ativação, sob condições de stress, da via de sinalização PHA-4/FOXA e respetivos genes alvo, antagonizada pela mTOR/S6K (13).

O uso do antidiabético oral metformina altera o metabolismo de metionina e também parece prolongar a vida em *C. elegans*, apesar de ainda permanecerem incertos alguns dos mecanismos subjacentes. Uma das hipóteses colocadas refere que esta diminuirá a quantidade de metionina disponível, o que está de acordo com o fato de atuar como um mimético da restrição calórica (Fig.3). Resultados semelhantes foram observados também em experiências com moscas da fruta, ratos, ou mesmo macacos *rhesus*. Outra hipótese sugere que o fármaco atuará a nível do intestino, alterando a flora intestinal (18). A redução da absorção de peptídeos pela deleção de Pep-2 (um transportador de péptidos localizado da membrana apical das células intestinais de *C. elegans*, ortólogo do transportador PEPT1, presente em mamíferos) também aumenta a vida útil, através da redução da sinalização da insulina, e da alteração da flora intestinal. Consequentemente, ocorre uma diminuição da absorção intestinal de di e tripéptidos, havendo restrição calórica e resultando em expansão do tempo de vida. Contudo, esta deleção tem outros efeitos, tais como um desenvolvimento mais lento, redução da fertilidade e do tamanho e aumento da tolerância ao stress (24). A problemática relativa ao peso e papel dos componentes específicos de uma dieta na regulação da longevidade face aos da RC em *C. elegans* está ainda a ser investigada, aguardando-se mais estudos sobre dietas

purificadas, relativas à contribuição de cada nutriente, as suas interações, bem como sobre a articulação das várias vias envolvidas no envelhecimento.

Apesar de não se incluir no grupo dos miméticos da RC, o exercício físico moderado tem resultados e consequências positivas, de certa forma semelhantes à RC e seus miméticos (4,25) (Fig.3).

Um outro mimético da RC é a rapamicina, que foi originalmente desenvolvido como antifúngico e atua, como já mencionado, através da inibição do TOR (Fig.3). Contudo, hoje em dia é mais utilizado como agente imunossupressor, para evitar a rejeição de transplantes de órgãos. Devido às reações adversas inerentes à imunossupressão, como o aumento do número e gravidade de certas infecções, isso gera problemas quanto à utilização da Rapamicina como mimético da RC e retira-lhe essa aplicabilidade. Apresenta ainda outros problemas, como sejam intolerância à glicose, resistência à insulina, hiperlipidemia, aumento da incidência de cataratas e degenerescência testicular (25).

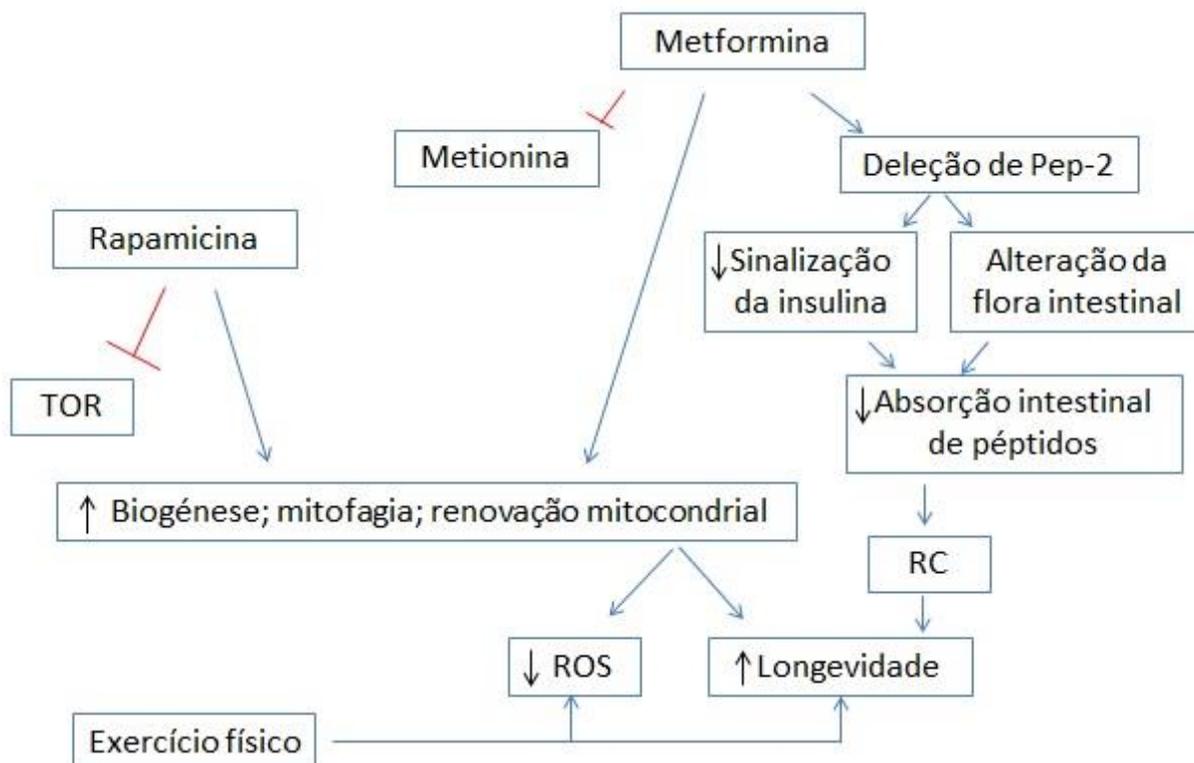


Figura 1 Efeitos metabólicos de dois miméticos da restrição calórica e do exercício físico
 Pep-2 (Transportador de Péptidos em *C. elegans*, Ortólogo do PEPT-1); RC (Restrição Calórica); ROS (Espécies Reativas de Oxigênio); TOR (Ortólogo do mTOR nas Leveduras)

Na *D. melanogaster*, uma observação recente comprovou que a adição de aminoácidos essenciais a uma dieta com alta percentagem de proteína e baixo teor de hidratos de carbono (HPLC) aumenta a fecundidade e reduz a vida útil das moscas (26) (Gráfico 1).

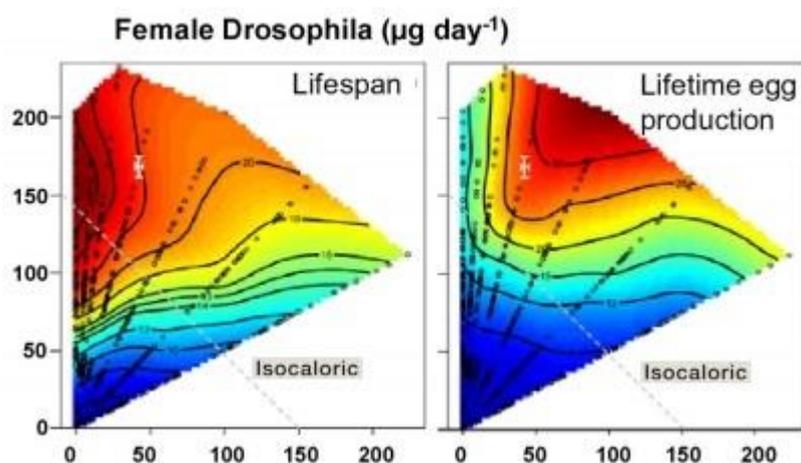


Gráfico 1 Adaptado com permissão de Raubenheimer *et al.* (26). Representação da variação da proporção proteína/hidratos de carbono e sua relação com o tempo de vida e fertilidade na *D. melanogaster*

No entanto, a suplementação apenas com metionina a uma alimentação com restrição proteica aumentou a fecundidade, sem reduzir a esperança de vida, demonstrando que a ligação estreita entre vida e fecundidade, tradicionalmente assumida como ganho evolutivo da espécie, poderia ser problematizada. Isto pelo fato da tradição darwinista defender uma ligação dos períodos de restrição calórica a uma diminuição da fecundidade. O que se verificou, na realidade, é que essa perda de fecundidade pode estar associada, não à restrição calórica em si, mas à ausência de nutrientes essenciais, como alguns dos aminoácidos (23). Estes resultados sugerem que a quantidade de calorias, por si só, não é o fator que tem mais influência na esperança de vida útil destas moscas, mas sim a origem das calorias.

As experiências realizadas em animais, desde as leveduras às moscas, nemátodes e roedores, em que houve restrição de metionina ou de caseína resultaram numa maior longevidade. A carência de cada um destes dois aminoácidos mimetizou os efeitos da RC. Contudo, a metionina revelou ser o aminoácido mais tóxico, quando usado em excesso, tendo efeitos negativos na alimentação, crescimento, metabolismo e taxa de fertilidade dos animais. Igualmente, um estudo recente relatou efeitos positivos da restrição de metionina sobre a longevidade numa dieta com uma presença relativamente baixa de aminoácidos, mediante a manipulação (por diminuição da regulação) da sinalização TOR (22). A fim de verificar estas respostas aos aminoácidos e, em particular, à metionina, foi testada na *D. melanogaster* a utilização de uma dieta completa quimicamente definida (dieta holística), desenvolvida pela equipa de investigação de Piper (20). A utilização desta dieta confirmou os efeitos positivos da restrição alimentar de aminoácidos na longevidade: verificou-se que a ausência total de aminoácidos essenciais diminui o de vida e a fecundidade, diminuindo a produção de ovos, efeitos que não ocorrem com a ausência total de aminoácidos não essenciais; a ausência total de hidratos de carbono também reduz a longevidade, sem contudo afetar a fertilidade. Deste modo, a dieta holística permite maximizar a fertilidade e longevidade das moscas, requerendo

todos os principais grupos de nutrientes, à exceção dos aminoácidos não essenciais, e poderá ser uma ferramenta promissora para estudar o papel dos nutrientes individualmente nestes seres.

Tal como referido acima, além da restrição calórica e das variedades de restrição dietética, outros protocolos têm sido usados com sucesso na longevidade de mamíferos. Os ratos em regimes de baixa proteína, a 5-15%, vivem mais do que aqueles aos quais são ministradas dietas com alta ingestão de proteína, a 50%. Num estudo da equipa de D. Raubenheimer (26), os valores mais altos de longevidade foram atingidos com percentagens de proteína a rondar os 7,7% para os machos e 9% para as fêmeas (relação proteínas/hidratos de carbono de 1:13 e 1:11, respetivamente). Contudo, a maior taxa de fertilidade verificou-se para os ratos com regimes de elevada ingestão proteica, com um rácio proteínas/calorias de 1:1. Esta longevidade prolongada deve-se ao fato de a restrição de proteína estar associada à redução da ativação do mTOR, com redução dos danos oxidativos ao DNA, redução da formação de tumores espontâneos e uma melhoria da função renal, cardíaca e cerebral (14).

A restrição de aminoácidos, como a metionina e o triptofano, também tem sido descrita como capaz de desempenhar um papel na regulação da longevidade em mamíferos. As experiências mais recentes mostram que os roedores aos quais foram ministradas dietas com uma redução de metionina a 70% revelaram um aumento na esperança média e máxima de vida em 30%, em comparação com os animais de controlo. Os roedores com restrição de metionina exibiram níveis reduzidos de insulina, IGF-1 e glicose no soro, e de ROS mitocondriais, de forma semelhante aos animais sujeitos a RC, ainda que por vias parcialmente independentes (23). Para além disto, a restrição do triptofano foi descrita como capaz de aumentar a esperança de vida dos roedores, acompanhada por um atraso na maturação sexual, diminuição de tumores e de uma melhoria da perfusão renal e hepática. A

restrição de leucina também parece estar implicada na extensão da longevidade, provavelmente através do aumento da sensibilidade à insulina, através das vias GCN2, mTOR e AMPK (13).

Destas experiências revistas, conclui-se que a sinalização de aminoácidos mediante o entrecruzamento das vias GCN2 e mTOR pode, muito provavelmente, estar implicada na regulação da longevidade verificada nos regimes de restrição de proteínas – como é o caso das dietas restritivas LPHC (4,7,8,10,13). Esta ideia conduz-nos novamente à problemática atual RC/proporções de nutrientes, ou seja, equilíbrio alimentar. Le Couteur *et al* sugerem, numa revisão de 2016 (4), que os casos bem conhecidos de longevidade em Okinawa coincidem com uma dieta com proporções de menor teor de proteína e maior teor de hidratos de carbono, levando ainda em linha de conta a fonte destes macronutrientes.

2.4 Proporções dietéticas e/ou restrição calórica?

Como referimos, a ideia segundo a qual as proporções de macronutrientes, nomeadamente entre proteínas e hidratos de carbono (com realce para a proporção menos proteína, mais hidratos de carbono), teriam mais influência num envelhecimento saudável e num prolongamento da vida, começa a ser bastante defendida. Le Couteur afirma em vários artigos e em várias revisões que esta é a proporção típica da dieta dos centenários de Okinawa (4). As novas experiências têm utilizado os mesmos organismos modelo, mas introduzem variações de protocolos dietéticos, de forma a saber quais são as melhorias, ou as perdas, que se devem a cada qual. Assim, não se experimenta só a RC, mas esta pode ser articulada com variações na composição de nutrientes, seja através da ingestão limitada de alimentos, seja pela utilização de uma dieta diluída. Merece especial referência por parte daquele autor uma

abordagem designada *Geometric Framework* (GF), que consiste numa representação multidimensional da nutrição, a fim de melhor compreender os efeitos dos nutrientes da dieta sobre o comportamento alimentar na saúde metabólica, nas doenças cardíacas, na reprodução e na longevidade, entre outros resultados (5,6,8,26). A partir destes estudos surgiu o conceito segundo o qual são as relações dos macronutrientes, com realce para a proporção de proteínas e hidratos de carbono, que desempenham um papel-chave na regulação da longevidade decorrente dos modelos dietéticos. Por exemplo, em moscas da fruta verificou-se o aumento da longevidade através da redução da ingestão de calorias a partir de extrato de levedura, como fonte de proteína. Este tipo de regime dietético revelou uma melhoria na longevidade em comparação com a redução calórica de sacarose. Da mesma forma, a adição de aminoácidos essenciais numa dieta à base de levedura, com restrição em sacarose, diminuiu a longevidade. A proporção proteínas/hidratos de carbono de 1:16 foi a que conseguiu maximizar a vida útil da *D. melanogaster*, ao passo que a simples redução da ingestão de calorias não teve o mesmo efeito (26).

Como vimos, o efeito positivo de dietas com redução de proteína na sinalização dos aminoácidos pelas vias mTOR e IGF-1 sugere que a investigação sobre a forma como o equilíbrio alimentar afeta o envelhecimento deve ser realizada com a preocupação de diferenciar, cada vez com mais pormenor, os efeitos e as interações dos vários nutrientes. A nível das experiências com primatas (*rhesus*) confirma-se a tendência da comunidade científica no sentido de um reforço da ideia segundo a qual o equilíbrio de nutrientes na composição da dieta e a origem dos mesmos podem ser mais importantes para a extensão da vida saudável do que a simples restrição alimentar (13). Num estudo realizado (27), a média de sobrevivência global para esta espécie em cativeiro foi, para o grupo de controlo, de 25,91 anos, sendo que cerca de 20% atingiu os 30 anos; para o grupo sujeito a 30% de restrição calórica, verificou-se que a média de sobrevivência global aumentou para 28,32, sendo que

cerca de 40% dos animais sobreviveram pelo menos até aos 30 anos. Ainda de referir que, enquanto no grupo de controlo 63% dos animais morreram de causas relacionadas com o envelhecimento, no grupo com restrição calórica, isso apenas ocorreu em 26% dos casos, tendo os restantes sido por situações agudas, não relacionadas com o envelhecimento (Gráfico 2).

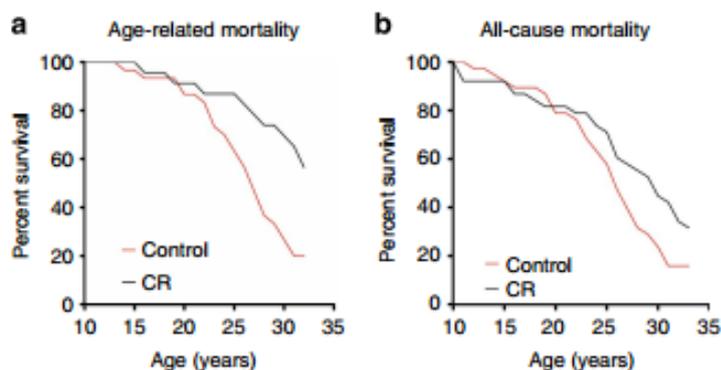


Gráfico 2 Reproduzido com permissão de Colman *et al.* (27). Curvas de mortalidade numa experiência com macacos *rhesus*. a) Mortes relacionadas com o envelhecimento. b) Mortes por qualquer causa. CR (Restrição Calórica)

2.5 O “caso de Okinawa” e a tese da proporção dietética ideal

As mais recentes investigações realizadas em animais, bem como as observações realizadas em comunidades humanas, têm evidenciado a tese segundo a qual a dieta com baixo teor de proteína e alto teor de hidratos de carbono (LPHC) contribui para diferir o envelhecimento e para o aumento da vida útil (5,6,8,26). Os efeitos destas dietas a nível do prolongamento da vida útil são coerentes com a compreensão atual da biologia do envelhecimento, no que diz respeito aos mecanismos celulares da nutrição – nomeadamente as vias de sinalização dos nutrientes.

Na linha da nossa problemática central, relativa ao valor a conferir à restrição calórica e/ou às proporções dietéticas, fazemos uma referência diferenciada à comunidade humana que

apresenta maior longevidade: os habitantes da ilha de Okinawa, no Japão. Esta comunidade ostenta até cinco vezes mais centenários do que as demais nações desenvolvidas (4). Sabemos das investigações científicas relativamente às *blue zones* (28), de que a população de Okinawa é exemplo paradigmático, nomeadamente da possibilidade de comparar diversos fatores – entre os quais a estatura média e hábitos de vida saudável. É claro que haverá, certamente, muitos fatores que contribuem para esta longevidade, incluindo a restrição calórica, a qualidade e o tipo de alimentos, a genética, os hábitos de atividade física, quem sabe, a própria valorização da família e os estímulos das relações comunitárias. No entanto, verifica-se que a energia resultante das dietas desta população de Okinawa provém de uma proporção de 9% de proteína e de 85% de hidratos de carbono, proporção semelhante a valores testados em estudos recentes sobre o envelhecimento em animais (4,7,13) (gráfico 3).

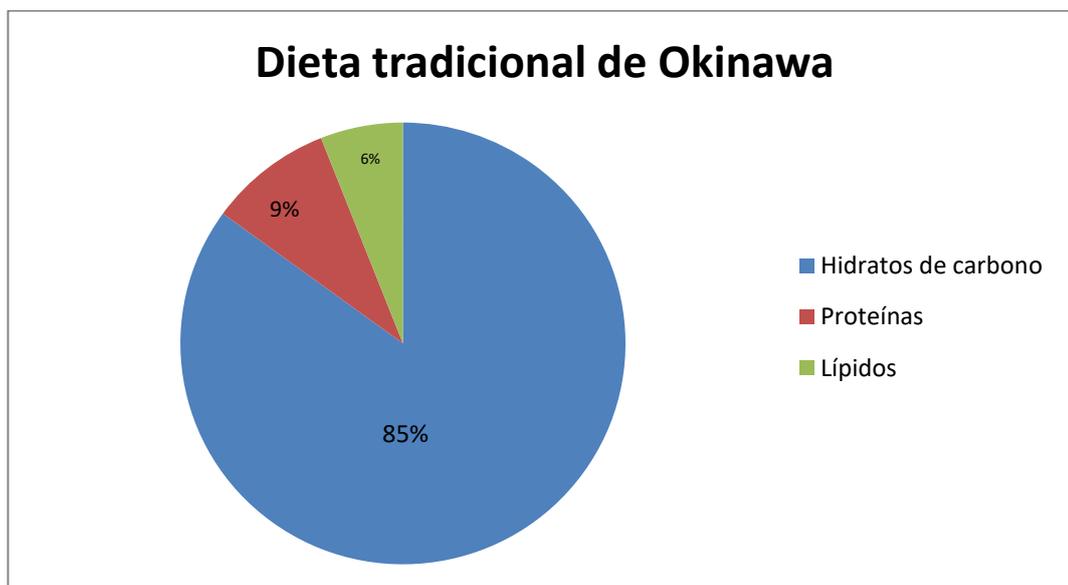


Gráfico 3 Proporção de macronutrientes na dieta tradicional de Okinawa

Hoje há um conhecimento muito mais pormenorizado das vias celulares de sinalização de nutrientes e uma perceção mais minuciosa do vínculo entre dieta e envelhecimento. As vias de sinalização de nutrientes que já referimos nos capítulos anteriores incluem a regulação

pelas sirtuínas, o mTOR, o AMPK, o IGF-1 e a GH. A diminuição da atividade da mTOR e da insulina/IGF-1/GH, ou o aumento da atividade da AMPK e das sirtuínas têm efeitos benéficos nos processos celulares envolvidos no envelhecimento, tais como a biogénese mitocondrial, a autofagia, o metabolismo celular, o stress oxidativo, a manutenção do genoma e a síntese de proteínas (3,4,6). A família das sirtuínas é composta por 7 enzimas (SIRT1-SIRT7), sendo que a que é melhor conhecida é a SIRT1. A restrição calórica ativa proteínas da família das sirtuínas, que promovem a correção de alguns dos efeitos deletérios causados por ROS. A SIRT1, em particular, protege da disfunção endotelial, aterosclerose, obesidade, diabetes *mellitus* tipo 2, esteatose hepática e enfarte agudo do miocárdio (29). A sir2 (sirtuína 2), cuja homóloga nos mamíferos é a SIRT1, foi identificada numa primeira fase em leveduras, mas também está presente noutros seres vivos, como a *Drosophila melanogaster*. Este grupo de proteínas contribui para a homeostasia, controlo metabólico e resposta ao stress, diminuindo a instabilidade genómica. Aumenta a biogénese, mitofagia e renovação mitocondrial, o que resulta num atraso do desgaste provocado pelas espécies reativas de oxigénio nas mitocôndrias. Efeitos semelhantes podem ter o exercício físico moderado e os miméticos da restrição calórica, como a metformina e a rapamicina (4,25).

Vimos também de que forma estes mecanismos fazem sentido no contexto da dinâmica evolutiva da espécie, reflectindo uma resposta para lidar com a escassez de nutrientes, e de que forma a manipulação genética, dietética ou farmacológica de vias de sinalização de nutrientes pode alterar a taxa de envelhecimento e a resposta à restrição calórica em modelos animais (3,4,21).

O papel das vias de sinalização de nutrientes descritas, bem como o benefício da restrição calórica no envelhecimento seria, assim, o efeito de uma resposta programada dos organismos para fazer face à escassez de alimentos. Não se trata simplesmente de uma

redução dos possíveis danos causados pela ingestão em excesso de nutrientes, embora tais excessos possam gerar, por si próprios, custos em termos de saúde.

A modulação destas vias fornece dados capazes de ligar os mecanismos envolvidos nos efeitos da restrição calórica à extensão vida útil. Contudo, há outros fatores e contextos que também poderiam ligar a restrição calórica a uma extensão de vida: o jejum periódico, uma alteração na flora intestinal, a fome ou a escassez, por exemplo em cativeiro, a alteração do ritmo circadiano e ainda a redução do consumo de certos macronutrientes (4).

A referida revisão apresentada por Le Couteur (4), faz referência a um conjunto de experiências realizadas à volta do problema da relação entre restrição calórica e equilíbrio (proporções e interações) de macronutrientes. Os primeiros estudos sobre esta problemática compararam os efeitos da simples restrição calórica, em ratos alimentados *ad libitum*, com os efeitos de uma limitação da ingestão de proteínas de 40%. Os ratos submetidos a uma simples restrição calórica viveram 75% mais do que os ratos de controlo, enquanto os ratos com restrição de proteína tiveram apenas um aumento na vida útil, de 15%. Noutras investigações, a restrição de proteínas, contribuiu para alguns dos benefícios da restrição calórica, mostrando que a restrição proteica aumentava a esperança máxima de vida em cerca de 20%. No entanto, Le Couteur realça a importância do equilíbrio de nutrientes como tendência geral no conjunto das investigações mais recentes, tendo realizado outros estudos que mostraram que a proporção de ingestão de proteínas era mais relevante para o prolongamento da vida do que a simples redução de calorias (4,5).

Para além destes equilíbrios, a proteína é um fator chave na ingestão de alimentos. As dietas pobres em proteína aumentam a ingestão de alimentos, enquanto as dietas com mais proteína reduzem a ingestão alimentar, provavelmente através do efeito de saciedade conferido por estas (30). A correta avaliação dos efeitos da dieta proteica no envelhecimento deve ter em conta as quantidades e as interações entre os três macronutrientes (proteínas,

hidratos de carbono, gordura) e ainda a medição da ingestão de alimentos, sobretudo nos animais alimentados *ad libitum* (5,8–10).

O *Geometric Framework* veio permitir uma avaliação da relação entre dieta e resultados, tais como a extensão do tempo de vida, através da comparação da ingestão de macronutrientes e de calorias (5,6,8,26). No contexto das comparações investigadas a partir do GF há a registar um conjunto de experiências que vai no sentido do estabelecimento de rácios de macronutrientes e de calorias (Gráfico 4). Estes rácios têm vindo a ser comparados com a “dieta de Okinawa” e talvez possam contribuir para uma explicação deste caso de extrema longevidade.

Numa destas experiências (31), 900 ratinhos são submetidos, ao longo da sua vida, a 1 de 30 tipos de dietas *ad libitum*, mas com variações nas proporções de proteínas, hidratos de carbono, gordura e no conteúdo energético. Concluiu-se existir o padrão que associa menor ingestão proteica a maior longevidade (Gráfico 4), mas a menor fertilidade. Além disso, os animais sujeitos a dietas com cerca de 5% de proteínas originaram perda de massa muscular, foram impeditivas para o crescimento dos animais e tiveram de ser descontinuadas, o que sugere que este valor está abaixo do limite dietético viável para manter uma boa saúde. Os métodos e análises são mais complexos do que a tradicional análise do efeito de um nutriente de cada vez, pois o que se visa é a distinção dos efeitos de cada macronutriente, do consumo de energia e também das suas interações, sobre o fenótipo, incluindo o aspeto do envelhecimento (4).

A aplicação inicial do método às moscas da fruta mostrou que as dietas do tipo LPHC resultavam numa maior longevidade, ao passo que a mera variação da ingestão total de calorias sob condições de alimentação *ad libitum* (sem restrição da disponibilidade de alimentos, mas com recurso à manipulação da densidade calórica dos alimentos através de diluição) teve pouco impacto no tempo de vida (10) (Gráfico 4).

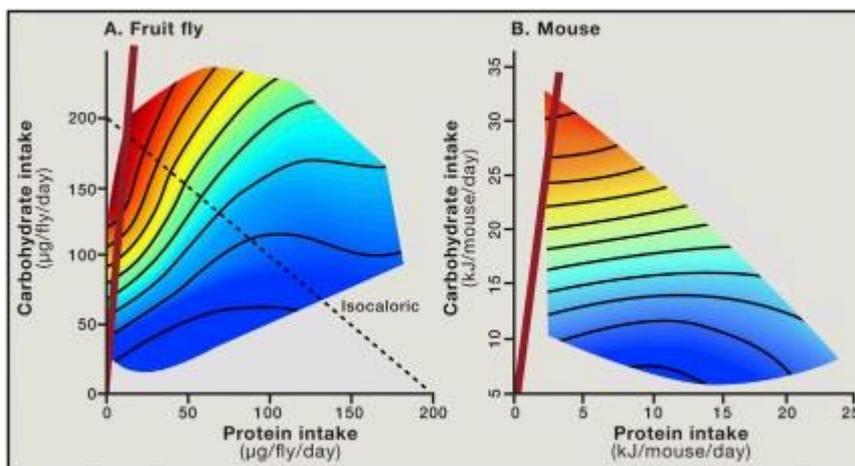


Gráfico 4 Reproduzido, com permissão, de Simpson *et al.* (31). Análise segundo a abordagem do *Geometric Framework* que relaciona a relação proteína/hidratos de carbono com a longevidade de *D. melanogaster* e ratos. A linha a vermelho representa a proporção que a maximiza

A dieta assente em baixo teor de proteína e alto teor de gordura (por exemplo, óleo de soja) foi associada ainda a resultados positivos, mas menos pronunciados, enfatizando a importância das interações dos macronutrientes. Assim, a dieta de redução proteica pode ter resultados diferentes, dependendo do macronutriente que substitui a proteína e também do tipo e da qualidade das fontes dos macronutrientes. Defende-se então a tese, complementar, de que a percentagem de proteína retirada da dieta deve ser substituída por hidratos de carbono saudáveis e não por gorduras(4).

Uma revisão recente relata nove estudos diferentes no contexto da GF, a maioria realizada em insetos, com a finalidade de apurar os efeitos da dieta LPHC em termos de extensão da vida. Estes estudos confirmaram que as dietas LPHC, em modelos alimentados *ad libitum*, estão associadas a uma extensão do tempo de vida. Esta conclusão foi apoiada por muitos outros estudos indiretos em animais e alguns em seres humanos (5,6,8,26).

Entre os seres humanos, contudo, a observação das comunidades designadas como *blue zones* aponta o caso paradigmático dos habitantes de Okinawa. Estes japoneses apresentam alguns dos valores mais baixos em termos de percentagem de proteína no

conjunto das populações humanas que não têm problemas de acesso a alimentos (28). A proporção ideal de proteínas/hidratos de carbono para o aumento do tempo de vida em muitas espécies parece então rondar 1:10 ou menos, sendo também o que se verifica na dieta tradicional de Okinawa, em que o teor proteico é de 9% (4).

Os valores habituais de proteína presentes nas dietas das populações humanas não excedem os 25% e, em geral, encontram-se perto dos 15%, sendo que as proporções de energia não proteica, provenientes de gorduras e hidratos de carbono, variam consideravelmente entre as populações (4). Os dados relativos às dietas de animais são semelhantes aos poucos estudos realizados em humanos relativamente à proporção de proteínas e de hidratos de carbono. No entanto, há que não esquecer que, apesar das transposições de estudos que se fazem nesse sentido, o organismo humano apresenta diferenças substanciais comparativamente com os restantes seres vivos estudados. Exemplo disso é o fato de se realizarem experiências com ratos com consumos proteicos de 50%, o que é impossível de praticar em seres humanos, visto que o limite de teor proteico diário máximo para humanos é de 35%, a partir do qual surgiria toxicidade que poderia mesmo ser letal (26).

A equipa de Pedersen *et al.* (30) realizou uma revisão dos efeitos da dieta com alta percentagem de proteína e baixo teor de hidratos de carbono (HPLC), dieta que se esperava ser prejudicial para o ser humano, tendo como base os resultados dos estudos com animais. A partir de cinco estudos observacionais, eles encontraram uma relação sugestiva entre o aumento da mortalidade por qualquer causa e dietas de HPLC de longo prazo. Dois estudos mostraram um aumento da incidência de diabetes *mellitus* tipo 2, e um aumento de doença cardiovascular neste tipo de dietas. Nos casos em que a proteína tinha uma origem animal, as dietas mostraram os piores efeitos, enquanto no caso de proteínas de origem vegetal, as dietas apresentavam efeitos menos prejudiciais ou mesmo nulos.

Os mecanismos fisiológicos em que assentam os benefícios das dietas LPHC para o envelhecimento saudável têm vindo a ser revelados. Os dados mais recentes mostram que estas dietas podem atuar através de algumas das mesmas vias envolvidas na restrição calórica. No estudo desenvolvido por Levine *et al.* (21), com base nos dados da NHANES, chegaram à conclusão de que o IGF-1 interferia na relação entre a dieta, mortalidade e cancro. Em ratos verificou-se que nas dietas LPHC, a ativação da via mTOR foi atenuada, em associação com a redução dos níveis da circulação de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), grupo constituído pelos aminoácidos essenciais leucina, isoleucina e valina. Estes últimos são essenciais para um bom metabolismo, incluindo regulação do peso corporal, síntese de proteínas musculares e homeostasia da glicose. Contudo, níveis elevados tornam-se potentes ativadores de mTOR, o que resulta na fosforilação do recetor de insulina, conduzindo a uma progressiva resistência à insulina. Deste modo, a elevada quantidade de BCAAs torna-se um fator predisponente para diabetes *mellitus* tipo 2 nos seres humanos (32). Como tal, um baixo teor de proteína e baixa circulação de BCAAs conduz à inativação do mTOR. Curiosamente, a regulação do mTOR foi influenciada não só pela circulação mais baixa de BCAAs, mas também pela sua interação com a glicose. Esta interação fornece um indício sobre as causas da influência da dieta LPHC no envelhecimento (4).

Havendo muito ainda para investigar sobre as interações dos macronutrientes, sabemos que a melhoria da nutrição é uma das principais causas do aumento da esperança de vida nos últimos dois séculos. Simultaneamente, sabe-se que a má alimentação constitui o principal fator de risco de mortalidade e de doença nos países desenvolvidos. Há uma convergência de resultados no que diz respeito à influência da redução de ingestão de calorias (mesmo por via do reduzido acesso a alimentos ricos em calorias) e de proteínas no envelhecimento saudável. Esta convergência deve-se, provavelmente, ao conhecimento mais apurado da forma como tais reduções e proporções ativam as vias de sinalização de nutrientes,

programadas evolutivamente para resistirmos à fome e à escassez de alimentos. O acesso *ad libitum* a uma alimentação LPHC também tem mostrado bons efeitos no prolongamento da esperança média de vida. No entanto, o dado mais interessante prende-se com o fato de a proporção ideal de proteína dietética, em relação aos hidratos de carbono, testada em animais coincidir com a proporção proteína/hidratos de carbono na dieta tradicional de Okinawa. Contudo, há que ter em conta que se os efeitos do conteúdo total de macronutrientes e calorias na dieta já se revelam importantes para um bom envelhecimento, há muitas investigações que procuram os efeitos mais específicos da qualidade e da origem dos macronutrientes, como por exemplo, os efeitos do tipo de hidratos de carbono (simples ou complexos) ou do tipo de proteínas (origem vegetal ou origem animal) presentes nas dietas estão bem reconhecidos. A constituição dos hidratos de carbono presentes na dieta tem de ser bem escolhida e não pode assentar em açúcares simples, ou em alimentos altamente processados, que são os principais fatores da ingestão de energia em excesso nos padrões alimentares modernos (4).

Um aspeto muito curioso sobre o caso de Okinawa é que há uma clara diferença entre as gerações nascidas antes e após a segunda guerra mundial. A elevada esperança de vida mencionada ao longo deste trabalho e em muitos dos artigos mencionados apenas se aplica às pessoas nascidas antes deste marco histórico. Há autores que defendem que as gerações mais novas apresentam uma menor esperança de vida e mais problemas de saúde devido ao que apelidam de “erros alimentares”, quando se referem à baixa quantidade de proteína ingerida pelos seus antecessores, defendendo ser essa a causa da aproximação da esperança média de vida dos habitantes da ilha face à dos restantes japoneses, tendo já sido mesmo ultrapassada por esta. Afirmam que a restrição calórica e proteica não passa, na verdade, de desnutrição. Contudo, o que também se alterou na ilha foi a ocorrência de uma súbita ocidentalização do modo de vida, com aparecimento de cadeias de *fast food* e redução da atividade física. Surgiu portanto um progressivo aumento de ingestão calórica, o que terá então resultado no súbito

aumento de doenças cardiovasculares e na diminuição da esperança média de vida. Esta parece ser uma explicação mais simples e plausível para a maioria dos investigadores (7). Apesar de tudo, esta mantém-se como uma das regiões do mundo com maior número de centenários (28).

2.6 Estudos realizados em humanos

Em seres humanos, os estudos feitos também têm sugerido a ideia segundo a qual as dietas ricas em proteínas e pobres em hidratos de carbono estão mais associadas ao aumento da mortalidade, e vice-versa (4).

O CALERIE (*Comprehensive Assessment of the Long-term Effect of Reducing Intake of Energy*) foi o primeiro ensaio clínico randomizado, que visou determinar os efeitos biológicos da RC nos biomarcadores do envelhecimento e da longevidade em seres humanos, sujeitos a 25% a restrição calórica durante dois anos. 225 pessoas não obesas, com índices de massa corporal (IMC) entre 22 e 28, com idades entre os 21 e 50 anos, foram aleatoriamente distribuídas, numa proporção de 2 para 1, num grupo com RC e noutro com dieta *ad libitum*, respetivamente. Os 82% de pessoas do grupo com RC que concluíram os dois anos de estudo conseguiram manter 19,5% de RC nos primeiros 6 meses, mas apenas 11,7% ao fim dos dois anos. Ainda assim, obtiveram resultados francamente positivos, comparativamente com o outro grupo. Relativamente ao peso corporal, houve uma queda abrupta de cerca de 7 kg, em média, nos primeiros 6 meses, que depois praticamente estabilizou, tendo a média da perda ponderal ao fim de 2 anos sido de cerca de 8 kg. No grupo de controlo houve uma variação temporal inferior a 1 kg. Houve também uma redução metabólica no grupo da RC, que passou por diminuição do metabolismo basal e do gasto energético diário. Diminuiu também a

concentração plasmática da triiodotironina (hormona tiroideia T3) e do TNF α (fator de necrose tumoral α), mediador conhecido da inflamação. Por fim, houve uma diminuição acentuada dos triglicéridos e do colesterol total, com redução dos níveis de LDL (lipoproteína de baixa densidade) e aumento de HDL (lipoproteína de alta densidade), resultando num perfil cardiovascular mais saudável. Demonstrou-se assim algumas das vantagens obtidas pela RC em humanos, além de se demonstrar também, através deste primeiro estudo randomizado, que, apesar das dificuldades, é possível fazer-se estudos de RC em humanos não obesos, sem efeitos adversos na qualidade de vida dos mesmos (33).

Numa investigação recente no âmbito do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), que teve apenas em conta pessoas com idade superior a 50 anos, as dietas com mais percentagem de proteína (> 20%) foram associadas ao aumento da mortalidade e de cancro em indivíduos com menos de 65 anos, mas associadas a riscos reduzidos nos indivíduos com mais de 65 anos. Nos idosos, verificou-se que o ideal para reduzir a mortalidade será manter um consumo proteico no mínimo de 10% do consumo calórico diário, por forma a minimizar a perda ponderal e a perda excessiva de IGF-1, próprias da idade avançada e que poderão ter consequências nefastas e contribuir para uma maior fragilidade e mortalidade dos idosos. O principal risco foi atribuído à fonte das proteínas, no caso, de origem animal, e aos níveis altos de IGF-1 (4,21).

Na mesma investigação, relativa a observações em seres humanos, ficou a sugestão de que não seria a redução do consumo de proteínas nas dietas dos idosos, mas antes a redução ao longo de toda uma vida, que seria capaz de promover uma redução de mortalidade. Mas esta ideia necessita de mais observações e de testes com outro tempo de observação. Contudo, cada vez mais, a tónica é colocada nas interações dos vários nutrientes, no seu equilíbrio e não tanto na mera restrição deste ou daquele nutriente, restrição que revela muito, nomeadamente sobre os mecanismos de sinalização de nutrientes, mas que necessita de ser integrada no todo

da dieta. A nutrição é algo de muito mais complexo e a simples medição do impacto dos componentes individuais da dieta não revela as interações entre os nutrientes e o seu efeito sobre, por exemplo, o apetite e a ingestão de alimentos (4). Assim, os resultados, em termos de saúde, de uma dieta com menos proteína dependerão muito do fato de a proteína ser substituída por gordura ou por hidratos de carbono.

Igualmente interessante é o estudo das possíveis influências da RC temporária no envelhecimento. Um exemplo de um período de jejum intermitente é o Ramadão, prática religiosa que muitos muçulmanos levam a cabo durante um mês, todos os anos, em que apenas fazem duas refeições diárias: uma antes do sol nascer, outra depois de se pôr. Abstêm-se, portanto, de qualquer tipo de comida ou bebida durante longos períodos, fazendo, no fundo, jejum intermitente e restrição calórica. As duas refeições variam muito em conteúdo de país para país e até mesmo dentro do mesmo país. Dependem também da altura do ano em que o Ramadão ocorre, visto que todos os anos é um mês diferente, segundo o calendário gregoriano. Caso calhe em meses mais quentes, as pessoas ingerem mais líquidos e comidas mais ricas em água. Geralmente, de madrugada optam por comidas com alto teor de fibra, proteína e hidratos de carbono complexos, enquanto que à noite há quem opte apenas por uns petiscos leves e quem prefira uma refeição semelhante à que inicia o dia, ou mesmo mais pesada. Contudo, o teor calórico total ingerido é por norma inferior aos restantes dias do ano, havendo portanto um período de jejum intermitente diário, associado a restrição calórica com duração de um mês por ano (Tabela 2).

Parecem haver resultados contraditórios em estudos sobre este tema: alguns autores defendem que este período diminui, de forma significativa, marcadores da inflamação, como, entre outros, a proteína amilóide A, que está relacionada com doenças cardiovasculares, pelo stress oxidativo que causa (34); outros afirmam que não há diferenças estatisticamente

significativas entre os períodos de jejum e os de alimentação sem restrições e que há resultados controversos (35,36).

Um estudo (37) parece demonstrar que o ramadão tende a diminuir os valores de pressão arterial, melhora o perfil lipídico e diminui os marcadores de doenças cardiovasculares, como a proteína C reativa de alta sensibilidade (hsPCR) e homocisteína, causando ainda uma redução ponderal e do IMC. Contudo, os resultados não são estatisticamente significativos, sendo a variação dos valores destes parâmetros muito ligeira (Tabela 2).

Valores Bioquímicos	Antes do Ramadão $\bar{X} \pm DP$	Depois do Ramadão $\bar{X} \pm DP$
Colesterol (mg/dL)	193,4 ± 51	184,3 ± 42
Triglicerídeos (mg/dL)	224,8 ± 129	182,9 ± 112
HDL-c (mg/dL)	43,0 ± 9	47,9 ± 8
Colesterol/HDL (Rácio)	4,5 ± 1	3,9 ± 1
VLDL-c (mg/dL)	38,1 ± 14	33,8 ± 17
LDL-c (mg/dL)	109,96 ± 46	96,83 ± 35
LDL/HDL (Rácio)	2,5 ± 0,8	2,0 ± 0,6
Glicémia em jejum (mg/dL)	124,7 ± 48	128,1 ± 54
Insulina (μU/mL)	12,4 ± 9,5	11,8 ± 7,6
Resistência à Insulina (μmol/L)	3,8 ± 3	3,6 ± 3
Homocisteinemia (μmol/L)	10,5 ± 3,8	11,5 ± 3,9
PCR-as (mg/L)	1,0 ± 1	0,9 ± 1
Consumo	Antes do Ramadão $\bar{X} \pm DP$	Depois do Ramadão $\bar{X} \pm DP$
Energia (kcal)	2588,6 ± 1485	2449,3 ± 1179
Hidratos de Carbono (g/dia)	327,8 ± 179	321,0 ± 171
Proteínas (g/dia)	96,7 ± 59	85,4 ± 45
Lípidos (g/dia)	100,0 ± 64	92,6 ± 42
Fibras (g/dia)	22,3 ± 14	20,2 ± 11

Tabela 2 Adaptado com permissão de Nematy *et al.* (37). Comparação entre os períodos pré- e pós-Ramadão relativamente ao perfil lipídico, outros parâmetros clínicos e biológicos e no aporte de energia e nutrientes (n (82).

DP (Desvio-Padrão); HDL-c (Colesterol-Lipoproteínas de Alta Densidade); LDL-c (Colesterol-Lipoproteínas de Baixa Densidade); PCR-as (Proteína C Reativa Detetada por Métodos de Alta Sensibilidade); VLDL (Colesterol-Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade); \bar{X} (Média)

Num outro estudo (34), obtiveram-se resultados positivos relativamente a todos esses mesmos parâmetros, mas ainda outros, nomeadamente um aumento do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e do óxido nítrico, melhorando a função endotelial; diminuição dos valores de citocinas pró-inflamatórias, como a IL (interleucina) 1 β , IL-6 e TNF α . Este estudo demonstrou também a diminuição de proteína amilóide A, um marcador de inflamação de fase aguda, utilizado para avaliar o risco cardiovascular. Verifica-se, de fato, segundo estes autores, muito menor quantidade de pessoas a necessitar de cuidados de saúde relacionados com problemas cardiovasculares durante este mês.

Contudo, há autores que obtiveram resultados contraditórios, sem variação significativa do número de eventos cardiovasculares registados em pessoas com doenças cardíacas estáveis, como acidente vascular cerebral, hospitalização por insuficiência cardíaca, enfarte agudo do miocárdio, dor anginosa, doenças das artérias coronárias, ou doenças valvulares cardíacas (35). Houve, inclusivamente, um estudo em jovens não obesos (18-29 anos) (36), em que apenas houve dois resultados positivos: em média, o peso apenas diminuiu 1 kg (uma diminuição pouco significativa) e a glicémia em jejum diminuiu 7,4 mg/dL. Os restantes resultados resultaram piores valores do que no estado pré-ramadão: diminuíram as HDL e aumentaram as LDL, VLDL, triglicérides, colesterol total e relação LDL/HDL.

Estas divergências de resultados dever-se-ão provavelmente ao fato de existirem demasiados fatores que podem influenciar o risco cardiovascular de cada indivíduo, tais como idade, género, estado geral de saúde, duração do período de jejum, que varia muito com o país em questão, devido à variação do número de horas diárias de exposição solar, e com o próprio tipo de comida ingerido nas refeições que se fazem durante o ramadão (35). Serão necessários novos estudos, para tentar esclarecer as dúvidas face às possíveis vantagens, a nível de saúde, que poderão advir, ou não, desta prática.

Discussão/Conclusão

A partir desta revisão da literatura, que tentámos que fosse o mais atualizada possível, demonstrámos que é no contexto da investigação dos equilíbrios de nutrientes que a restrição calórica joga o seu papel central, e não apenas como estratégia isolada. O que se verifica é um deslocamento da ênfase antes dada à RC simples para a conjugação desta com investigações detalhadas sobre o equilíbrio ideal de nutrientes nas dietas.

Nos trabalhos de investigação realizados pelos diferentes autores que analisámos, tivemos oportunidade de deduzir de que forma o entrecruzamento dos mecanismos e vias de sinalização de nutrientes e de energia está implicado na proporção dietética testada desde as leveduras aos mamíferos. Daqui concluindo as razões do “caso da dieta tradicional de Okinawa”. A via de sinalização da glicose, nuclear nas dietas de restrição calórica, e as vias de sinalização de aminoácidos, mediante o entrecruzamento das vias GCN2 e mTOR, estão implicadas na regulação da longevidade verificada nos regimes de restrição de proteínas LPHC, dieta baseada nas fontes mais saudáveis de aminoácidos essenciais e de hidratos de carbono, numa proporção dietética semelhante à verificada na dieta tradicional de Okinawa.

A possibilidade de as experiências mais recentes poderem recorrer a um padrão como o do *Geometrical Framework* vem permitir uma comparação das mesmas e a oportunidade de empreender investigações cada vez mais pormenorizadas sobre o papel e as interações dos diversos nutrientes no crescimento e no envelhecimento humano. Este tipo de investigação promete novos conhecimentos detalhados da relação dieta/longevidade.

Apesar da tendência geral ser no sentido da tese do equilíbrio de nutrientes, e de já existirem múltiplas conclusões dentro deste âmbito, persistem ainda inúmeras dúvidas, que exigem que novos estudos mais detalhados continuem a surgir, para tentar dar resposta às múltiplas e pertinentes questões ainda existentes sobre o tema.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Anabela Mota Pinto, pela atitude de responsabilidade, respeito e cooperação comigo no trabalho e pela prontidão de resposta a todas as dúvidas ou solicitações que lhe fiz.

Agradeço ao Professor Doutor David Raubenheimer, da Universidade de Sidney, pelo envio e autorização de uso dos artigos “Nutritional ecology and the evolution of aging” e “Putting the balance back in diet”.

Agradeço ao Professor Doutor Mohsen Nematy e ao Dr. Alinezhad, da Universidade de Ciências Médicas de Mashhad, no Irão, pela autorização de uso de uma tabela do artigo “Effects of Ramadan fasting on cardiovascular risk factors: a prospective observational study”.

Agradeço ao Hatim Amine Zahidi, pela informação que me prestou sobre o Ramadão, que se tornaram úteis para este trabalho.

Por fim, agradeço à Inês, que me dá força e motivação para trabalhar sempre que eu preciso e aos meus pais e irmão que também estão sempre presentes.

Referências Bibliográficas

1. Piper MDW, Partridge L, Raubenheimer D, Simpson SJ. Dietary restriction and ageing : a unifying perspective. *Cell Metab.* 2011;14(2):154–60.
2. Kolovou GD, Kolovou V, Mavrogeni S. We are ageing. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–12.
3. Wang Y. Molecular links between caloric restriction and Sir2/SIRT1 activation. *Diabetes and Metabolism Journal.* 2014. p. 321–9.
4. Le Couteur DG, Solon-Biet S, Wahl D, Cogger VC, Willcox BJ, Willcox DC, et al. New Horizons: Dietary protein, ageing and the Okinawan ratio. *Age Ageing.* 2016;1–5.
5. Efeyan A, Comb WC, Sabatini DM. Nutrient Sensing Mechanisms and Pathways. *Nature.* 2015;4(164):302–310.
6. Solon-Biet SM, McMahon AC, Ballard JWO, Ruohonen K, Wu LE, Cogger VC, et al. The ratio of macronutrients, not caloric intake, dictates cardiometabolic health, aging, and longevity in ad libitum-fed mice. *Cell Metab.* 2014;19(3):418–30.
7. Gavrilova NS, Gavrilov LA. Comments on dietary restriction, okinawa diet and longevity. *Gerontology.* 2012;58(3):221–3.
8. Solon-Biet SM, Mitchell SJ, de Cabo R, Raubenheimer D, Le Couteur DG, Simpson SJ. Macronutrients and caloric intake in health and longevity. *J Endocrinol.* 2015;226(1):R17–28.
9. Santos J, Leao C, Sousa MJ. Ammonium-dependent shortening of CLS in yeast cells starved for essential amino acids is determined by the specific amino acid deprived, through different signaling pathways. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013.
10. Lee D, Hwang W, Artan M, Jeong DE, Lee SJ. Effects of nutritional components on aging. *Aging Cell.* 2015;14(1):8–16.
11. Hu J, Wei M, Mirzaei H, Madia F, Mirisola M, Amparo C, et al. Tor-Sch9 deficiency activates catabolism of the ketone body-like acetic acid to promote trehalose accumulation and longevity. *Aging Cell.* 2014;13(3):457–67.

12. Lin S-J, Kaeberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez P-A, Cullota VC, et al. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature*. 2002;418(6895):336–40.
13. Mirzaei H, Suarez JA, Longo VD. Protein and Amino Acid Restriction, Aging and Disease: from yeast to humans. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(11):558–66.
14. Dong W, Wang R, Ma LN, Xu BL, Zhang JS, Zhao ZW, et al. Autophagy involving age-related cognitive behavior and hippocampus injury is modulated by different caloric intake in mice. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(7):11843–53.
15. Diot A, Morten K, Poulton J. Mitophagy plays a central role in mitochondrial ageing. *Mamm Genome*. 2016;27(7–8):381–95.
16. Sui B, Hu C, Jin Y. Mitochondrial metabolic failure in telomere attrition-provoked aging of bone marrow mesenchymal stem cells. *Biogerontology*. 2015.
17. Kenyon C. A pathway that links reproductive status to lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1204:156–62.
18. Cabreiro F, Au C, Leung KY, Vergara-Irigaray N, Cochemé HM, Noori T, et al. Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. *Cell*. 2013;153(1):228–39.
19. Feng Y, Williams BG, Koumanov F, Wolstenholme AJ, Holman GD. FGT-1 is the major glucose transporter in *C. elegans* and is central to aging pathways. *Biochem J*. 2013;456(2):219–29.
20. Piper MDW, Blanc E, Leitão-Gonçalves R, Yang M, He X, Linford NJ, et al. A holidic medium for *Drosophila melanogaster*. *Nat Methods*. 2014;11(1):1–19.
21. Levine ME, Suarez JA, Brandhorst S, Balasubramanian P, Cheng CW, Madia F, et al. Low protein intake is associated with a major reduction in IGF-1, cancer, and overall mortality in the 65 and younger but not older population. *Cell Metab*. 2014;19(3):407–17.

22. Lee BC, Kaya A, Ma S, Kim G, Gerashchenko M V, Yim SH, et al. Methionine restriction extends lifespan of *Drosophila melanogaster* under conditions of low amino-acid status. *Nat Commun.* 2014;5:1–12.
23. Gallinetti J, Harputlugil E, Mitchell JR. Amino acid sensing in dietary-restriction-mediated longevity: roles of signal-transducing kinases GCN2 and TOR. *Biochem J.* 2013;449(1):1–10.
24. Meissner B, Boll M, Daniel H, Baumeister R. Deletion of the intestinal peptide transporter affects insulin and TOR signaling in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* 2004;279(35):36739–45.
25. Roth GS, Ingram DK. Manipulation of health span and function by dietary caloric restriction mimetics. *Ann N Y Acad Sci.* 2016;1363(1):5–10.
26. Raubenheimer D, Simpson SJ, Le Couteur DG, Solon-Biet SM, Coogan SCP. Nutritional ecology and the evolution of aging. *Exp Gerontol.* 2016;1–12.
27. Colman RJ, Beasley TM, Kemnitz JW, Johnson SC, Weindruch R, Anderson RM. Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nat Commun.* 2014;5:3557.
28. Mishra BN. Secret of Eternal Youth; Teaching from the Centenarian Hot Spots (“Blue Zones”). *Indian J Community Med.* 2009;34(4):273–5.
29. Winnik S, Auwerx J, Sinclair DA, Matter CM. Protective effects of sirtuins in cardiovascular diseases: From bench to bedside. *Eur Heart J.* 2015;36(48):3404–12.
30. Pedersen AN, Kondrup J, Børsheim E. Health effects of protein intake in healthy adults: a systematic literature review. *Food Nutr Res.* 2013;1(4):1–29.
31. Simpson SJ, Le Couteur DG, Raubenheimer D. Putting the balance back in diet. *Cell.* 2015;161(1):18–23.
32. Yoon M-S. The Emerging Role of Branched-Chain Amino Acids in Insulin Resistance and Metabolism. *Nutrients.* 2016;8(7):405.

33. Ravussin E, Redman LM, Rochon J, Das SK, Fontana L, Kraus WE, et al. A 2-year randomized controlled trial of human caloric restriction: Feasibility and effects on predictors of health span and longevity. *Journals Gerontol Med Sci.* 2015;70(9):1097–104.
34. Asadi H, Abolfathi AA, Badalzadeh R, Majidinia M, Yaghoubi A, Asadi M, et al. Effects of Ramadan Fasting on Serum Amyloid A and Protein Carbonyl Group Levels in Patients With Cardiovascular Diseases. *J Cardiovasc Thorac Res.* 2015;7(2):55–9.
35. Mazidi M, Rezaie P, Chaudhri O, Karimi E, Nematy M. The effect of Ramadan fasting on cardiometabolic risk factors and anthropometrics parameters: A systematic review. *Pakistan J Med Sci.* 2015;31(5):1250–5.
36. Ziaee V, Razaee M, Ahmadinejad Z, Shaikh H, Yousefi R, Yarmohammadi L, et al. The changes of metabolic profile and weight during Ramadan fasting. *Singapore Med J.* 2006;47(475):409409–14.
37. Nematy M, Alinezhad-Namaghi M, Rashed MM, Mozhdehifard M, Sajjadi SS, Akhlaghi S, et al. Effects of Ramadan fasting on cardiovascular risk factors: a prospective observational study. *Nutr J.* 2012;11(1):69.