



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

SOFIA MARGARIDA TOUREIRO E PAIVA

***A INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO NA FISIOPATOLOGIA DO
ENVELHECIMENTO***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE FISIOPATOLOGIA

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

SETEMBRO/2017

Índice

Índice.....	1
1. Resumo	2
2. Abstract.....	3
3. Introdução	4
4. Métodos.....	6
5. Biomarcadores na avaliação de intervenções terapêuticas	8
5.1. Atrito dos telômeros	9
5.2. Perda de proteostase	9
5.3. Desregulação dos sensores de nutrientes.....	11
5.4. Comunicação intercelular alterada: ritmos circadianos.....	13
6. Restrição dietética e longevidade.....	14
6.1. Restrição calórica	14
6.2. Restrição proteica	19
6.3. Jejum e longevidade	21
6.3.1. Jejum em animais não humanos.....	23
6.2.1.1. Jejum e doenças neurodegenerativas.....	24
6.2.1.2. Jejum e doenças metabólicas.....	26
6.2.1.3. Jejum e doenças cardiovasculares	26
6.2.1.4. Jejum e cancro	27
6.3.2. Jejum em humanos	29
6.2.2.1. Jejum e doenças cardiometabólicas.....	29
6.2.2.2. Jejum e ritmo circadiano	31
7. Fitoquímicos	33
7.1. Resveratrol.....	33
7.2. Curcumina	34
7.3. Quercetina.....	35
8. Discussão e Conclusão.....	41
9. Agradecimentos	43
10. Referências bibliográficas	44

1. Resumo

A investigação de possíveis intervenções que aumentem a longevidade e previnam o aparecimento de doenças crônicas - como a diabetes *mellitus* tipo 2, doenças neurodegenerativas e oncológicas - é uma das finalidades *major* da investigação na área do envelhecimento. Estratégias do âmbito nutricional como a restrição calórica, diferentes protocolos de jejum e utilização de componentes biologicamente ativos como os fitoquímicos têm revelado ser técnicas eficazes.

Dado que a maioria dos mecanismos que modulam o processo de envelhecimento está conservada, em termos evolutivos, desde as leveduras até aos mamíferos, serão aqui descritas formas de manipular o processo de envelhecimento, em diversas espécies e, quando existirem fontes bibliográficas adequadas, os seus efeitos em humanos.

O objetivo deste trabalho é rever a literatura existente sobre a influência que estratégias nutricionais têm na fisiopatologia do envelhecimento. Descrever os seus alvos terapêuticos e os seus efeitos na promoção de um envelhecimento saudável, livre de doença.

Palavras-chave: Dieta, Restrição Calórica, Jejum, Fitoquímicos, Envelhecimento e Longevidade.

2. Abstract

The search for interventions that can increase lifespan and decrease the risk of age-related diseases - such as type 2 diabetes, neurodegenerative diseases and cancer - is the main goal in aging research. Nutritional strategies, like caloric restriction, different types of fasting protocols, and consumption of phytochemical rich foods, have been proven efficient anti-aging methods.

Given that most of the pathways known to be responsible for the aging process are conserved from yeast to mammals, in this review there will be described ways to manipulate aging in different species, including humans when the quality of scientific evidence justifies it.

The purpose of this work is to review the existing literature on nutritional strategies and their influence in the physiopathology of aging. Report physiological targets and outcomes in maximizing lifespan and healthspan, without age-related diseases.

Key-words: *Diet, Caloric Restriction, Fasting, Phytochemicals, Aging and Longevity.*

3. Introdução

O envelhecimento é um processo inevitável na maioria dos organismos vivos, sendo caracterizado por um conjunto de alterações moleculares e celulares que culminam na perda de integridade fisiológica e conseqüente morte. Um dos grandes fins da humanidade é o prolongamento da longevidade, fantasiada pela busca da fonte da juventude eterna. Nos últimos séculos, os países desenvolvidos, através da melhoria das condições de vida e dos cuidados de saúde prestados, conseguiram um aumento importante da esperança de vida (1). Idealmente, isto deveria traduzir-se em mais anos com qualidade de vida e livres de doença. No entanto esta premissa nem sempre se verifica, uma vez que estes últimos anos são acompanhados de uma elevada taxa de doenças crónicas – como a diabetes *mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e neoplasias.

As baixas taxas de natalidade e o aumento da esperança de vida nos países desenvolvidos são duas tendências que resultam numa estrutura etária da população muito idosa. Segundo as projeções do Eurostat para os 27 países estados-membros da União Europeia, para o período entre 2011 e 2060, a população com 65 anos ou mais, passará de 17% para 30%, e a população com 80 ou mais anos de 5% para 12% (2). Este envelhecimento da população tem conseqüências sociais e económicas importantes, uma vez que esta população envelhecida tem, associadamente, uma elevada incidência de doenças crónicas. Em 2012 as principais causas de morte em Portugal foram as doenças do aparelho circulatório (30%), seguidas de tumores malignos (24%) e de doenças do aparelho respiratório (13%), sendo que a importância da diabetes *mellitus* tipo 2 aumentou de 1,5% em 1980 para 4,5% em 2012 (2).

Um grande objetivo na área do envelhecimento é desenvolver estratégias simples que consigam aumentar a longevidade, bem como paralelamente, atrasar, prevenir e reverter o

aparecimento de doenças crônicas. Várias intervenções metabólicas atingem estes objetivos como por exemplo: restrição calórica, limitação de nutrientes específicos, vários tipos de jejum, exercício físico e administração de fitoquímicos como o resveratrol e a espermidina (3). Estas intervenções atuam, do ponto de vista molecular, sobre biomarcadores do envelhecimento, propostos em 2013 por López-Otín *et al* (4).

Este trabalho de revisão da literatura tem como objetivo principal, descrever estratégias nutricionais que interfiram na fisiopatologia do envelhecimento, relatar diferentes métodos que tenham como alvo os processos biológicos que habitualmente se encontram alterados no processo de envelhecimento, nomeadamente a proteostase e cascatas de sensores de nutrientes. Como objetivo a médio e longo prazo, pretende-se discutir a implementação de recomendações e tomada de medidas na área da saúde que mudem o paradigma do envelhecimento nas populações ocidentais.

4. Métodos

A pesquisa para esta revisão bibliográfica foi realizada nas bases de dados eletrônicas *PubMed*, *Embase* e *Cochrane Library*, entre maio (primeira pesquisa a 12-05-2017) e setembro de 2017 (última pesquisa a 16-09-2017).

Foram utilizados termos *Medical Subject Headings* (MESH) de forma a encontrar publicações que abordassem a forma como a nutrição pode influenciar os mecanismos envolvidos no envelhecimento. As equações de pesquisa utilizadas foram as seguintes:

- diet AND (longevity OR aging OR ageing)
- nutrition AND (longevity OR aging OR ageing)
- autophagy AND (longevity OR aging OR ageing)
- (nutrition OR diet) AND autophagy AND (longevity OR aging OR ageing)
- (telomerase OR telomere) AND (diet OR food) AND (longevity OR aging OR ageing)
- (fasting OR “intermittent fasting”) AND (longevity OR aging OR ageing)
- “fasting mimicking diet” AND (longevity OR aging OR ageing)
- "time-restricted feeding" AND (longevity OR aging OR ageing)
- “caloric restriction” AND (longevity OR aging OR ageing)
- “dietary restriction” AND (longevity OR aging OR ageing)
- “energy restriction” AND (longevity OR aging OR ageing)
- (phytochemical* OR phytonutrient) AND (longevity OR aging OR ageing)

Os critérios de inclusão utilizados foram os seguintes: artigos publicados entre 2007 e 2017; escritos na língua inglesa ou portuguesa; artigo de revisão; artigo científico; ensaio clínico randomizado; meta-análise.

Com os resultados obtidos realizou-se uma primeira seleção através da leitura dos resumos/*abstracts*, de forma a selecionar apenas os artigos que abordavam o tema pretendido. De seguida, a avaliação dos artigos a utilizar foi feita através da leitura integral dos mesmos, leitura essa que, em situações pontuais, proporcionou o encontro de outras fontes bibliográficas igualmente utilizadas para a realização deste trabalho. Pontualmente foram utilizados estudos mais antigos, por serem relevantes ao tema abordado, e não existirem publicações mais recentes sobre esse tópico.

5. Biomarcadores na avaliação de intervenções terapêuticas

O desenvolvimento de intervenções eficazes para atrasar o processo de envelhecimento e doenças associadas ao mesmo requer o conhecimento dos reconhecidos biomarcadores de envelhecimento (4). Os biomarcadores são de extrema importância para o desenvolvimento, análise e implementação de estratégias antienvelhecimento, sendo definidos como características biológicas que podem ser objetivamente medidas e avaliadas como indicadores do envelhecimento normal e de processos patogénicos (5). De facto, são essenciais para determinar a eficácia e segurança de intervenções que requerem longos períodos de tempo.

López-Otín e colaboradores publicaram, em 2013 (4), nove candidatos a biomarcadores do envelhecimento, divididos em 3 categorias: os biomarcadores primários (instabilidade genómica, atrito dos telómeros, alterações epigenéticas e perda de proteostase) são as causas principais de dano molecular envolvidos no envelhecimento; os marcadores antagonistas (desregulação dos sensores de nutrientes, disfunção mitocondrial e senescência celular) que medeiam efeitos benéficos quando expressos em pequena quantidade, protegendo o organismo de danos moleculares e escassez de alimento, mas quando em grande atividade têm efeitos deletérios; por último, os biomarcadores integrativos (exaustão das células estaminais e comunicação intercelular alterada) designados “os culpados” pelo envelhecimento e que surgem quando a acumulação de danos não conseguem ser compensada por mecanismos de homeostasia.

De seguida nos subcapítulos 5.1. a 5.4. serão descritos alguns dos biomarcadores mais utilizados no estudo das intervenções antienvelhecimento no âmbito da nutrição.

5.1. Atrito dos telómeros

Os telómeros são sequências repetitivas de nucleotídeos localizados na porção final dos cromossomas, responsáveis pela estabilidade genómica; são sensíveis à replicação celular uma vez que as suas extremidades encurtam com cada replicação. A enzima telomerase sintetiza sequências repetitivas de nucleotídeos à extremidade 3' do cromossoma, prevenindo a perda de informação genética, a senescência celular e consequente apoptose. Se atrito dos telómeros é uma causa ou mera consequência do processo de envelhecimento, é um tema que gera discordância. Contudo, o seu envolvimento no processo de envelhecimento é indiscutível, daí o atrito telomérico ser considerado um dos biomarcadores do envelhecimento (4).

5.2. Perda de proteostase

O envelhecimento e algumas doenças relacionadas com o mesmo estão associados a perda da homeostasia proteica (ou proteostase) (6, 7). Todas as células dispõem de mecanismos de controlo de qualidade para preservar a estabilidade e função dos seus proteomas. A proteostase envolve mecanismos para a estabilização de proteínas corretamente formadas e mecanismos para a degradação de proteínas através do proteassoma ou lisossoma. Todos estes mecanismos funcionam de forma a prevenir a acumulação de componentes danificados e asseguram a renovação contínua das proteínas intracelulares (4).

O *stress* endógeno e exógeno causa a desnaturação proteica ou impede o correto enrolamento durante a síntese proteica. Estas proteínas aberrantes são habitualmente renaturadas (em língua inglesa *refolded*) pelas proteínas de choque térmico ou são alvo de destruição pelo sistema ubiquitina-proteassoma ou lisossoma - que realiza autofagia. A

autofagia engloba diferentes métodos que as células utilizam de forma a fazer chegar ao lisossoma substratos citoplasmáticos para degradação sendo um processo predominantemente citoprotetor. Para além da sua função celular individual, a autofagia tem um papel determinante na determinação da longevidade de vários modelos animais (8).

O sistema de autofagia inclui a microautofagia, – invaginação da superfície lisossomal que origina vesículas de conteúdo proteico - autofagia mediada por chaperonas – que reconhecem as proteínas aberrantes e as importam para o lisossoma – e a macroautofagia – onde há o sequestro das proteínas aberrantes e organelos por parte de autofagossomas que se fundem com o lisossoma. A falha em rearranjar ou degradar proteínas aberrantes pode levar à sua acumulação e agregação (4) (Fig.1). A expressão crónica de proteomas aberrantes contribui para o desenvolvimento de doenças relacionadas com o envelhecimento como a Doença de Alzheimer (DA), Doença de Parkinson (DP) e cataratas (6).

A atividade dos proteassomas diminui com a idade, o que leva a alterações marcadas no proteoma das células e tecidos. Em centenários saudáveis existe uma manutenção da atividade do proteassoma (9); existe também um declínio da eficiência da autofagia ao longo do envelhecimento (8). Manipulações genéticas que promovem a autofagia aumentam a longevidade, melhoram a sensibilidade à insulina e a função motora (10). Sendo o contrário verdade, isto é, a inibição da autofagia causa envelhecimento prematuro (8).

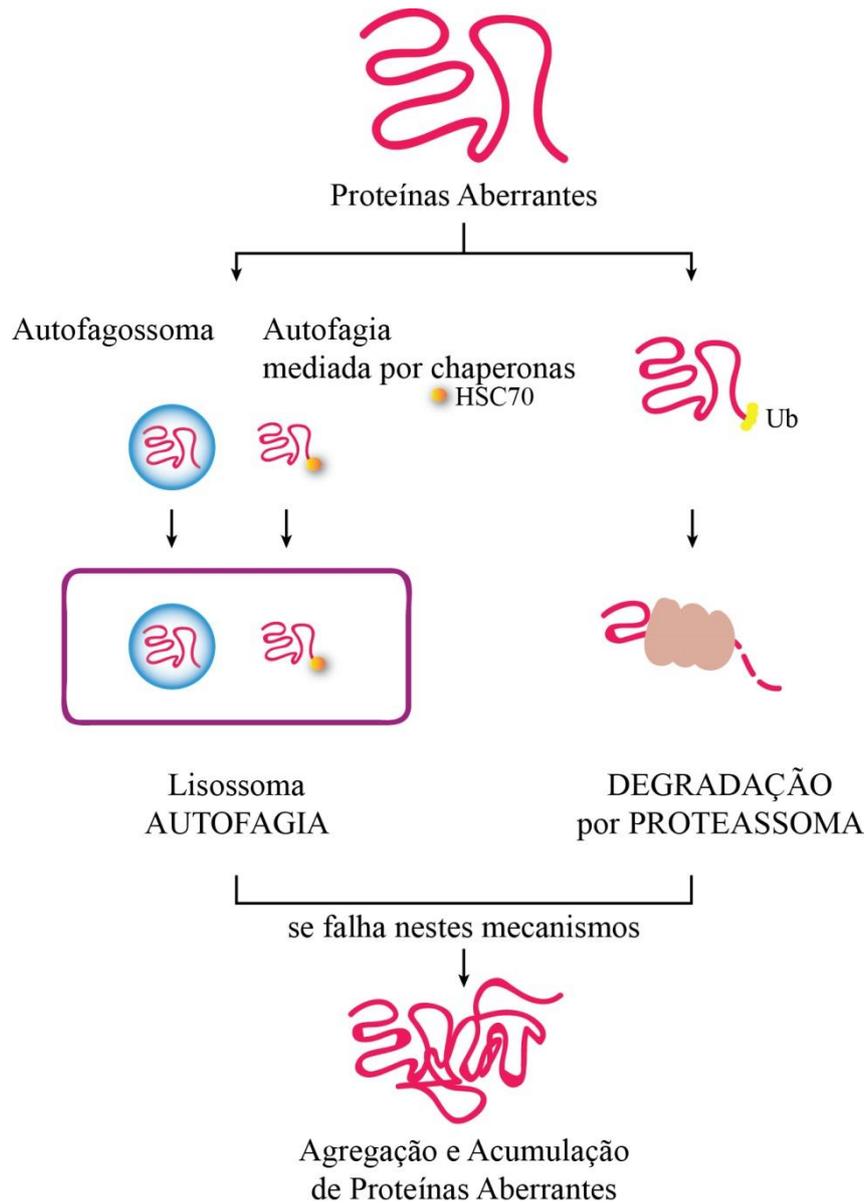


Figura 1: Representação esquemática sobre a proteostase - papel da autofagia, realizada nos lisossomas, e da degradação proteassômica na prevenção de acumulação de proteínas aberrantes. Ub, ubiquitina.

5.3. Desregulação dos sensores de nutrientes

O crescimento e funcionamento do organismo humano estão dependentes da capacidade de utilizar nutrientes e fluidos. Diferentes sensores que respondem à flutuação dos níveis de nutrientes. Estes sensores interligam o metabolismo, a dieta e o envelhecimento, e estão frequentemente desregulados no envelhecimento e em distúrbios metabólicos (3, 11). O

estudo da disrupção destas cascatas de sinalização ganhou importância no campo da investigação porque podem ser manipuladas farmacologicamente e através de intervenções dietéticas (5).

O *Insulin and IGF-1 Signaling* (IIS, do inglês: cascata de sinalização da Insulina e IGF-1, do inglês *insulin-like growth factor*) tem efeitos moduladores do envelhecimento. O IIS foi assim denominado uma vez que a insulina e o IGF-1 partilham a mesma cascata intracelular, sendo esta um dos mecanismos mais conservados durante o processo evolutivo, sendo por isso comum em diferentes espécies. Alguns dos alvos desta cascata são a família de fatores de transcrição *Forkhead box protein of class O* (FOXO) e os complexos *mammalian Target Of Rapamycin* (mTOR), igualmente conservados em múltiplas espécies (4, 12). Um IIS diminuído é uma característica comum ao envelhecimento fisiológico e acelerado, enquanto um IIS constitutivamente diminuído prolonga a longevidade. Estes dados, apesar de aparentemente contraditórios, podem ser explicados pela teoria que a atenuação do IIS é uma resposta defensiva com o objetivo de minimizar o crescimento e metabolismo no contexto de danos sistémicos frequentes (13). Ainda segundo esta teoria, um organismo com o IIS constitutivamente diminuído tem maior longevidade porque tem baixa taxa de metabolismo celular e, conseqüentemente menor dano celular (4).

Para além do IIS, existem 3 outros sensores de nutrientes relacionados e interligados, que são alvo de investigação terapêutica: o mTOR que responde a altas concentrações de aminoácidos; a *adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK) que deteta estados de baixa energia através de elevados níveis da *adenosine monophosphate* (AMP) e as sirtuínas que detetam baixos níveis de energia através de elevados níveis de NAD^+ (14).

A cascata mTOR está envolvida nos processos de metabolismo anabólico; se existem nutrientes suficientes, fatores de crescimento e energia suficientes, o mTOR inibe a

resistência ao *stress* e os processos de autofagia, e ativa o crescimento celular (15). A inibição do mTOR resulta no aumento da longevidade em várias espécies: leveduras, minhocas, moscas e mamíferos (16). O AMPK e as sirtuínas atuam de forma oposta ao IIS e mTOR; estas tendem a estar subexpressas com o envelhecimento, e está reportado que a sua ativação farmacológica aumenta a longevidade (3).

5.4. Comunicação intercelular alterada: ritmos circadianos

Para além das alterações celulares, o envelhecimento envolve também alterações na comunicação intercelular, incluindo sinalização neuroendócrina, inflamação e ritmos circadianos (3). Os ritmos circadianos (do latim, *circa* cerca de + *diem* dia) são oscilações com a duração de aproximadamente 24 horas, que podem ser encontradas a nível molecular, fisiológico e comportamental (17, 18). O núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo atua como um relógio mestre que coordena as oscilações independentes de todo o organismo. Para além da regulação interna, o NSQ também recebe estimulação externa, como a luz, que ajuda o organismo a coordenar-se com o meio envolvente. Também a ingestão de nutrientes influencia os ritmos biológicos, apesar de ter um efeito mais predominante nos osciladores periféricos que no NSQ (18, 19). Com o envelhecimento existe uma deterioração dos ritmos circadianos devido a múltiplos fatores, entre os quais a atenuação da atividade elétrica do NSQ que resulta na descoordenação dos ritmos periféricos. As alterações destes ritmos têm, para além da disrupção mais óbvia dos ciclos de sono-vigília, consequências como o aumento do risco para doenças neoplásicas, cardiovasculares, e metabólicas (18). Por ser influenciado por estímulos externos, existe a oportunidade para intervenções metabólicas e nutricionais que previnam o decaimento funcional do relógio circadiano, durante o envelhecimento.

6. Restrição dietética e longevidade

O conceito de restrição dietética engloba um conjunto de intervenções bastante alargado. Entre elas a restrição calórica, o jejum, dietas que mimetizam o jejum e restrição de macronutrientes específicos.

6.1. Restrição calórica

A redução da ingestão calórica sem provocar malnutrição é definida como restrição calórica (RC). Este é, provavelmente, o método mais estudado que demonstrou ser eficaz a aumentar a esperança média e máxima de vida em várias espécies investigadas até à data, desde leveduras, minhocas, moscas, ratos, cães, até macacos (12).

A RC é a estratégia mais fisiológica para induzir autofagia que, além de ser um mecanismo de adaptação celular, tem um papel determinante na esperança de vida de diversos modelos, incluindo tecidos humanos (8, 20). A autofagia promove um controlo de qualidade dos organelos, da síntese proteica, otimiza a atividade das células estaminais, melhora a função imunológica e inibe a transformação neoplásica (21). A redução da autofagia está associada a um envelhecimento precoce, e a sua estimulação associada a múltiplos efeitos antienvhecimento e atenuação de doenças relacionadas (incluindo arteriosclerose, neurodegenerescência, esteatose hepática e diabetes *mellitus* tipo 2) (3). Para além da indução da autofagia, a RC aumenta o neuropeptído Y (NPY) a nível hipotalâmico e a grelina a nível plasmático, esta última modula a homeostase energética através da sua ação sobre o hipotálamo. Por sua vez, a administração de NPY e grelina exógenos, em neurónios corticais de ratos, atuam sinergicamente na estimulação da autofagia, acabando por mimetizar os efeitos neuroprotetores da RC (22).

Dependendo do modo como a RC for estabelecida - cronicamente ou através de jejum intermitente (que será abordado adiante), desde a infância ou em idade adulta, e ainda conforme a sua intensidade, isto é, percentagem de redução calórica - a autofagia é induzida através de diferentes sensores de nutrientes (8) como mTORC1, Sirtuina 1 (SIRT1), AMPK (23) (estas duas últimas ativam-se mutuamente (24)). Estas respostas parecem estar correlacionadas com a ativação de *Forkhead box protein O1* (FOXO1), que preserva a atividade da telomerase (25) (Fig.2).

Uma RC de 40% imposta a *Wild Type mice* desde os 3 meses de vida, preveniu o encurtamento dos telómeros em diferentes amostras de tecidos, quando comparados com o grupo da mesma espécie que ingeriu a dieta controlo (não *ad libitum*). Esta RC traduziu-se no atraso do aparecimento de doenças relacionadas com o envelhecimento e morte, apesar de não ter aumentado significativamente a longevidade, quando comparada com o grupo de controlo (26). Não existem ensaios clínicos em humanos que relacionem RC com o comprimento dos telómeros (27). Atualmente, existe apenas um estudo longitudinal (28) que relata os efeitos da RC no comprimento dos telómeros dos leucócitos circulantes, numa amostra de 609 adultos jovens (idade média 28-32 anos). Os seus autores reportaram uma associação inversa entre a energia consumida e o comprimento dos telómeros, tanto no início do estudo como no seguimento, passados 13 anos.

Dois ensaios clínicos realizados em macacos (*Macaca mulatta*) reportaram resultados, aparentemente contraditórios, sobre os efeitos da RC a longo prazo na longevidade. Um deles, realizado pelo Winsconsin National Primate Center (WNPRC), demonstrou que uma RC de 30% resultava num aumento significativo da longevidade, bem como uma redução de 50% de neoplasias, doença cardiovascular, prevenção de sarcopenia e neurodegenerescência (29, 30). Por outro lado, o estudo realizado pelo National Institute of Aging (NIA) não reportou

resultados estatisticamente relevantes no aumento da esperança de vida, apesar de reduzir a incidência de obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2 (31). Esta diferença de resultados poderá estar associada não só ao desenho dos estudos, mas também à qualidade da dieta, uma vez que o grupo controlo WNPRC ingeriu uma dieta *ad libitum* com elevada concentração em sucrose, óleo de milho e hidratos de carbono processados e refinados, assemelhando-se a uma dieta ocidentalizada, e, conseqüentemente, diminuindo a esperança média de vida do grupo controlo. Pelo contrário, no estudo de NIA os macacos ingeriram uma dieta que se aproximava do tradicional padrão mediterrânico, rica em peixe e produtos de origem vegetal minimamente processados, aumentando assim a esperança de vida tanto no grupo de controlo como no grupo sujeito à RC, diminuindo o impacto estatístico da RC (32, 33). Esta diferença de resultados reforça a ideia de que a composição da dieta tem um papel essencial para a promoção de saúde.

Os efeitos da RC na longevidade não são universais, podendo ter conseqüências neutras ou até mesmo deletérias na sobrevivência de algumas espécies (34). De forma a otimizar os efeitos da restrição energética será necessário considerar múltiplas variáveis, que a influenciam, com vista a adaptar esta estratégia a cada indivíduo. Foi recentemente reportado em duas diferentes estirpes de ratos que o sexo, estirpe e percentagem de RC afetam os resultados obtidos na saúde e sobrevivência (35).

No que diz respeito à espécie humana, devido à sua longa esperança de vida e dificuldade em encontrar voluntários saudáveis para comprovar e testar os seus efeitos a longo prazo, ainda não foi demonstrada a sua eficácia como intervenção que atrasa o processo de envelhecimento (36). Talvez pelos motivos anteriormente mencionados, também não está definido, para o Homem, o intervalo de valores de RC com benefícios em termos de longevidade, podendo apenas inferir-se um valor provável e sustentável a longo prazo, a partir

de estudos observacionais de populações com elevada prevalência de centenários e com baixa incidência de doenças relacionadas com o envelhecimento. É o caso dos centenários de Okinawa, uma ilha japonesa, cuja alimentação tradicional é baseada em alimentos ricos em nutrientes e baixos em densidade calórica (tubérculos, vegetais, leguminosas, fruta, plantas medicinais e especiarias), consistente com uma RC entre 10 a 15% (37, 38).

Outro grupo populacional com interesse científico são os CRONies (*Calorie Restriction with Optimal Nutrition*), membros da sociedade de restrição calórica, que praticam uma dieta com RC média de 30%, há mais de 15 anos. À semelhança dos centenários de Okinawa, estes indivíduos têm uma dieta rica em vegetais, frutas de baixo índice glicémico, frutos secos, trigo, soja, peixe e carnes magras. Não consomem alimentos altamente processados e refinados (como arroz branco, gorduras *trans*, alimentos com alto teor de sal) (33). Os seus elementos têm um índice de massa corporal médio de $19,6 \pm 1,9\%$ e aproximadamente 12% de massa gorda. Quando comparado com as médias populacionais do mesmo sexo e idade, que ingerem uma dieta ocidentalizada, os CRONies apresentam uma redução do colesterol total, *low density lipoprotein* (LDL), dos triglicéridos, dos níveis de glicose e de insulina em jejum, da pressão arterial, uma redução de 40% da espessura média da íntima da artéria carótida e, um aumento do colesterol *high density lipoprotein* (HDL). Através dos dados apresentados conclui-se que padrão de dieta dos CRONies reduz o risco de virem a desenvolver aterosclerose (39), uma das doenças relacionadas com o envelhecimento.

CALERIE fase 2 (“Comprehensive Assessment of Long-term Effects of Reducing Intake of Energy”) é o ensaio clínico randomizado mais completo realizado até à data pelo NIA, em adultos não obesos submetidos a uma dieta com RC, por um período de 2 anos (40). O valor médio de RC conseguido pelos voluntários foi de 11,7% que, para além de diminuir fatores de risco cardiometabólico (41), estimulou o aumento nos níveis plasmáticos de

insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP1), e conseqüentemente diminuindo os níveis de IGF1 (42). Melhorou ainda a qualidade de vida, avaliada através de questionários sobre a qualidade de sono, função sexual e efeitos no humor (43). Atualmente, estão disponíveis os dados do CALERIE num biobanco público (44). Aos dados disponíveis do início, 12 meses e 24 meses de seguimento foram aplicados dois algoritmos que calculam a idade biológica, *Klemera-Doubal Method Biological Age* e *Homeostatic Dysregulation*. Os resultados dos algoritmos foram concordantes, ambos indicaram que a RC atrasa o processo de envelhecimento (45).

A RC levada ao extremo, isto é, feita a longo prazo com elevada percentagem de redução energética, e sem o cuidado de fornecer as doses diárias recomendadas de todos os nutrientes, poderá ter efeitos prejudiciais, acabando mesmo por aumentar a mortalidade e o risco de vir a desenvolver diversos problemas como sarcopenia, redução da densidade mineral óssea, distúrbios metabólicos como resistência à insulina, amenorreia e infertilidade, disfunção imunitária e cardíaca (33). Uma revisão da literatura recente (46) reportou que dois (47, 48) dos três (49) estudos que analisaram a relação entre a RC e a Densidade Mineral Óssea (DMO) em adultos obesos, demonstraram uma diminuição da DMO associada à RC. Sendo ainda desconhecidos os efeitos a longo prazo que esta redução terá sobre os riscos de osteoporose e fratura.

Apesar da evidência que existe sobre os efeitos da RC, o acesso ilimitado a alimentos hipercalóricos e hiperpalatáveis nos países industrializados poderá constituir um dos obstáculos à instituição de uma dieta com RC a longo prazo na maioria da população, por exigir níveis elevados de controlo individual. Recorre-se por isso, à pesquisa de intervenções com efeitos semelhantes aos da RC no processo de envelhecimento, os chamados miméticos da restrição calórica.

6.2. Restrição proteica

Nos últimos anos assistiu-se à popularização de dietas com elevado teor proteico, quer na comunicação social, quer na comunidade médica, quer por razões estéticas quer como um método para combater a obesidade, sarcopenia e osteoporose. Contudo, parece haver uma relação entre uma dieta com teor proteico reduzido e um aumento de longevidade. Tem sido colocada a hipótese de alguns dos benefícios da restrição calórica poderem ser atribuídos, em parte, à consequente restrição proteica (RP) (5). Reduzir proporcionalmente a quantidade de proteína em relação a outros macronutrientes (como hidratos de carbono e gordura), sem a necessidade de redução calórica total, poderá ser umas das alternativas à RC (3).

Uma meta-análise (50) sobre os efeitos da restrição dietética, em diferentes espécies (desde leveduras a ratos), reportou que a quantidade de proteína tem um papel mais importante que a restrição calórica na extensão da longevidade. Contrariamente a estes resultados, uma revisão da literatura mais recente (51) analisou estudos sobre os efeitos da RC e restrição proteica, em ratos. Os seus autores (51) concluíram que os efeitos da RC eram mais importantes que a proporção de macronutrientes: uma redução de 10% do consumo energético resultava num aumento da longevidade independentemente da quantidade proteica consumida.

Apesar dos resultados contraditórios das revisões bibliográficas mencionadas, é relevante perceber quais os mecanismos responsáveis pelos benefícios encontrados numa dieta com baixo teor proteico. Está reportado que a RP altera alguns dos biomarcadores do envelhecimento, nomeadamente o IGF1 e o mTOR, diminuindo a expressão dos mesmos (52). Em roedores a superestimulação do eixo GH/IGF (GH, do inglês *growth hormone*) acelera o envelhecimento e aumenta a mortalidade, ao contrário a sua inibição que atrasa o processo de envelhecimento, previne o aparecimento neoplásico e aumenta a longevidade.

Esta manipulação dos macronutrientes resulta na redução dos níveis séricos de IGF1 em humanos, associada a uma diminuição da incidência de neoplasias e mortalidade em geral (53). Porém, estes efeitos foram apenas relatados em indivíduos com menos de 65 anos. Os benefícios da redução proteica foram atenuados quando a fonte proteica era de origem vegetal (53). Isto é, uma dieta com maior quantidade de proteína de origem vegetal teve um efeito protetor, quando comparado com proteína de origem animal. Ainda sobre o possível papel que a fonte proteica – animal ou vegetal – tem na longevidade, um plano alimentar isocalórico com redução proteica associado à substituição de proteína de origem animal por origem vegetal, inibe o crescimento de neoplasias da próstata e mama, de modelos xenógrafos humanos em ratos, com redução significativa dos níveis de IGF-1 e inibição intratumoral da atividade do mTOR (54).

Dentro da restrição proteica, a restrição específica de aminoácidos como a metionina e o glutamato têm também influência no processo de envelhecimento (52). A restrição de metionina aumenta a longevidade em leveduras, moscas, minhocas e ratos (55). Em humanos foi proposta como adjuvante no tratamento de neoplasias metastizadas (56).

Curiosamente alimentos de origem vegetal, como leguminosas e frutos secos, têm níveis intrinsecamente mais baixos de metionina que alimentos de origem animal (57). Estes dados podem explicar a elevada taxa de centenários saudáveis em grupos populacionais como os de Okinawa (38) que consomem vegetais, leguminosas, frutos secos e fruta. Assim, a implementação de uma dieta predominantemente vegetariana, naturalmente pobre em metionina, sem que por isso seja necessária uma restrição calórica ou proteica intencional, é uma estratégia pro-longevidade de relativa fácil execução a longo-prazo, para a população geral, podendo ser proposta como alternativa à RC.

6.3. Jejum e longevidade

O jejum é a forma mais extrema de restrição dietética, e implica a abstinência de todo o tipo de alimentos com a exceção da água. Existem vários protocolos descritos para executar este método. O jejum intermitente (JI) engloba períodos de tempo em que os indivíduos ficam longos períodos com pouco ou nenhum consumo energético (entre 16 a 48 horas, em regra), seguidos de períodos de ingestão calórica normal, de forma crônica. O termo jejum permanente (JP) será utilizado para dietas em que o período sem ingestão calórica se situe entre as 48 horas até 21 ou mais dias (58). São alguns exemplos de JI: 70% de restrição calórica em dias alternados (59); consumo de 500 a 700 kcal em dois dias consecutivos por semana (também denominada a dieta '5:2') (60); restringir o consumo energético para 6-8 horas por dia (58). O JP pode ser realizado, entre outros, com: 2 a 5 dias de jejum com ingestão apenas de água (61); 7 dias de uma dieta que mimetiza os efeitos do jejum (62). Diferentes protocolos levam a diferentes alterações moleculares, em fatores de crescimento e biomarcadores metabólicos, sendo que o JI causa alterações mais frequentes mas menos pronunciadas que o JP (63).

Do ponto de vista evolutivo, se considerarmos que só recentemente o Homem tem acesso constante a recursos alimentares, este padrão de dieta poderá refletir o comportamento alimentar dos nossos antepassados, ou seja, sobrealimentação em períodos de abundância, e jejum ou redução drástica da ingestão em períodos de escassez. Esta é a forma como algumas tribos indígenas vivem atualmente, a maioria das quais com reduzida incidência de doenças relacionadas com o envelhecimento.

Assim, o organismo humano está adaptado para funcionar durante longos períodos sem acesso a alimentos. Durante o jejum o organismo sofre alterações metabólicas para compensar as necessidades energéticas. Após o consumo das reservas de glicogénio, é ativada

a gliconeogénese hepática e não hepática, assim como a produção de ácidos gordos livres, a partir do tecido adiposo, e corpos cetónicos. Os ácidos gordos livres surgem na circulação sanguínea após um jejum de 12 a 24 horas (1). Depois disto, a principal fonte energética é a cetólise, que produz a partir da oxidação dos corpos cetónicos (ácidos D-β-hidroxibutírico ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_2\text{COOH}$) e acetacético ($\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COOH}$)), acetil-CoA, sendo esta a molécula utilizada pelo ciclo de Krebs (64). Ao contrário da maioria dos tecidos que consegue utilizar ácidos gordos livres para produção energética, no cérebro, o metabolismo dos corpos cetónicos é de particular importância, uma vez que em períodos de pausa alimentar produz entre 60 a 70% do total da energia consumida, sendo os restantes 30 a 40% provenientes do catabolismo de aminoácidos, lactato e glicerol (65). Dependendo do peso e composição corporal, os corpos cetónicos, ácidos gordos livres e aminoácidos permitem à maioria dos homens sobreviver 30 ou mais dias em total ausência de ingestão calórica.

Os mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos metabólicos do jejum não estão ainda totalmente compreendidos, estando associadas, a estes, alterações nos sensores de nutrientes, como o AMPK e o ATK/mTOR (63). (Fig. 2)

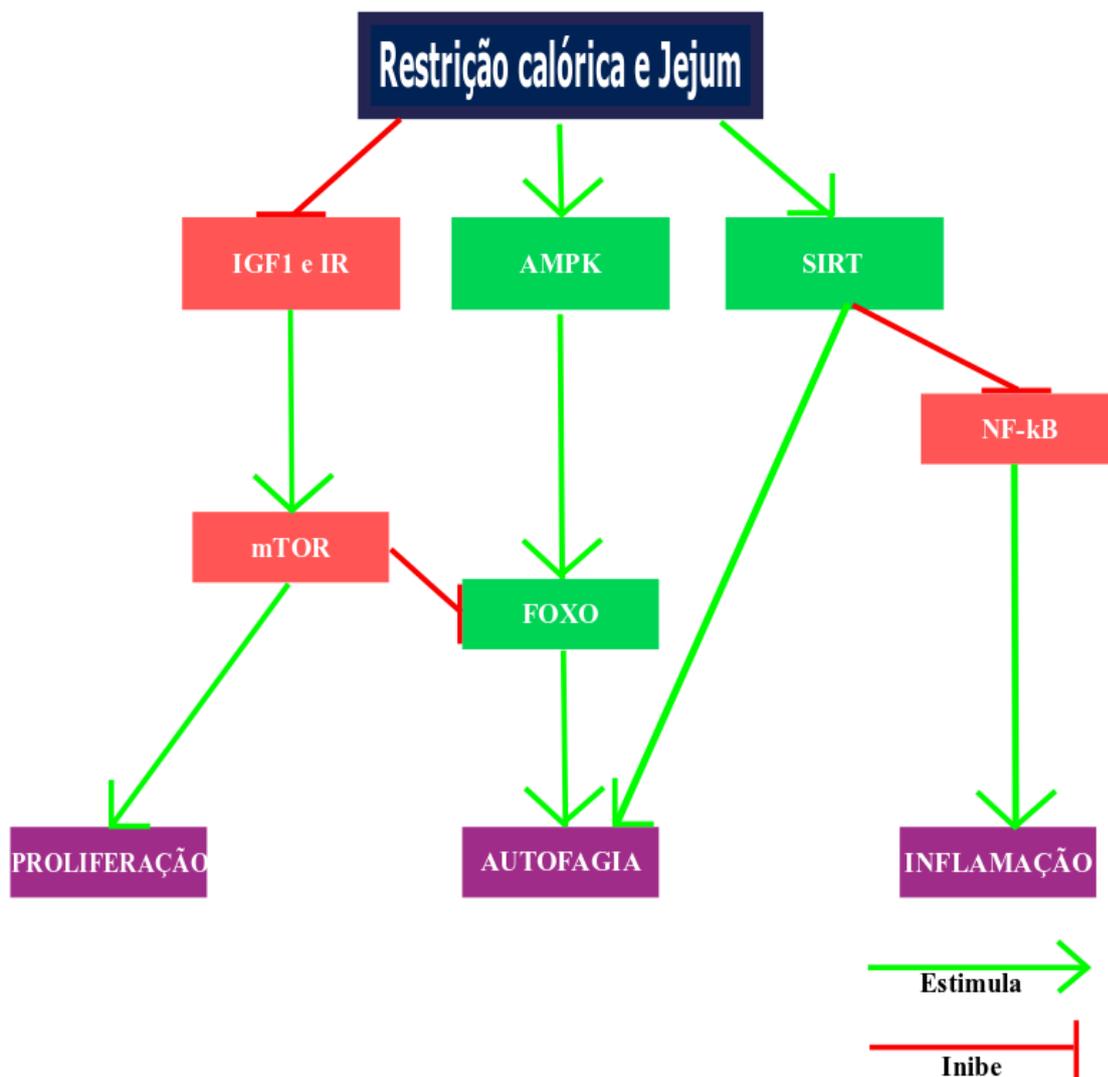


Figura 2: Representação esquemática e simplificada dos efeitos que a restrição calórica e jejum têm sobre os sensores de nutrientes.

De seguida serão descritos os efeitos, na longevidade, em animais não humanos e humanos, que diferentes protocolos de jejum têm, bem como o seu efeito em doenças relacionadas com o envelhecimento.

6.3.1. Jejum em animais não humanos

Foi de estudos laboratoriais com ratos que surgiram as primeiras evidências que o JI poderia influenciar o processo de envelhecimento (66); nesta publicação (66), foi testado o JI em animais jovens: os ratos alimentados em dias alternados tiveram um aumento de 83% na

esperança média de vida, quando comparados com o grupo com uma dieta diária *ad libitum*. A mesma intervenção foi testada em grupos etários mais avançados, da mesma espécie (67), com um aumento de 30-40% na longevidade, podendo este resultado ser ampliado quando associado exercício físico regular. Contudo, em ratos com diferente herança genética o JI pode ter um efeito nulo ou mesmo adverso na longevidade (68).

Uma vez que o jejum praticado apenas com a ingestão de água pode levar a uma rápida perda de peso em ratos, foi desenvolvida uma dieta baixa em proteína e açúcar, mas com o teor elevado de gordura, com o objetivo de mimetizar os efeitos metabólicos do jejum. Esta dieta foi denominada *Fasting Mimicking Diet* (FMD); os ciclos têm a duração de 4 dias, nos quais são ingeridos entre 10 a 50% das necessidades energéticas diárias (69, 70). A FMD tem efeitos semelhantes, nos biomarcadores do envelhecimento, aos de um jejum com a duração de 2 a 3 dias. Ciclos de FMD iniciados aos 16 meses de idade resultaram num aumento de 11% da esperança média de vida (70).

Nos subcapítulos seguintes serão descritos alguns dos efeitos do jejum e FMD em doenças relacionadas com o envelhecimento (Tabela 1).

6.2.1.1. Jejum e doenças neurodegenerativas

A hipótese que JI pode conferir um efeito protetor contra as doenças neurodegenerativas proveio de dois pressupostos: a idade avançada ser um fator de risco *major* para doenças como as DA e DP (71) e o JI atrasar o processo de envelhecimento (72).

Modelos de ratos transgênicos com DA foram criados para testar os efeitos do JI; estes apresentam acumulação de β -amilóide, com e sem patologia Tau, e têm associados défices de memória e aprendizagem. Pretendia-se com estes modelos mimetizar algumas das mutações

presentes das formas familiares de DA. Os animais sujeitos a uma RC de 40% ou JI durante 1 ano não desenvolveram alterações cognitivas, ao contrário dos controlos alimentados *ad libitum* (73). Um dado curioso deste estudo foi o facto de os níveis de β -amilóide e Tau serem mais reduzidos no grupo sujeito a RC que no do JI, sugerindo assim que apesar do JI não prevenir a acumulação das proteínas confere um efeito protetor aos neurónios mesmo na presença dessas proteínas.

Diversos mecanismos serão responsáveis pelos efeitos que o JI apresenta contra a disfunção sináptica e cognitiva, em modelos animais, de doenças neurodegenerativas. Entre esses a redução da acumulação dos danos provocados pelo *stress* oxidativo, preservação da função mitocondrial, e a diminuição da inflamação (72). Esta hipótese é sustentada por vários dados: o JI induz a expressão de enzimas antioxidantes e fatores neurotróficos com o BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) (74); o BDNF estimula a biogénese mitocondrial (75); o JI estimula a autofagia (76); os fatores neurotróficos o aumento da biogénese mitocondrial e autofagia (77-79) que protegem os neurónios em modelos experimentais de DA e DP.

Como anteriormente referido, o JI aumenta a expressão de BDNF. Este fator aparenta ter efeitos antienvhecimento locais e sistémicos: aumenta a plasticidade sináptica, promove a neurogénese, aumenta a resistência dos neurónios à morte celular, regula o apetite, aumenta o metabolismo periférico da glicose e melhora o controlo autonómico dos sistemas cardiovascular e gastrointestinal (3).

Ainda no âmbito das alterações cerebrais, os ciclos de jejum melhoram a função cognitiva, motoro-sensorial e neuroinflamação, em diversos trabalhos desenvolvidos em ratos (80-82). À semelhança do JI, a FMD provocou melhorias na coordenação motora e na memória a curto e longo prazo, quando comparada com uma dieta controlo (70).

6.2.1.2. Jejum e doenças metabólicas

Uma dieta indutora de obesidade (DIO) é um modelo experimental de obesidade, diabetes *mellitus* e outras doenças metabólicas, onde os animais têm acesso livre a uma dieta com elevado teor em gordura (18). A combinação de JI com uma DIO tem demonstrado os efeitos notáveis que, o limitar do número de horas por dia do acesso a alimento, tem na prevenção e tratamento de doenças metabólicas. Sendo o JI suficiente para atenuar os efeitos prejudiciais de uma dieta com elevado teor em gordura. Isto foi demonstrado por diversos estudos (83-85). Nestas publicações o grupo controlo e o experimental ingeriram igual quantidade calórica de uma dieta com elevado teor em gordura sendo a única diferença entre grupos, o intervalo de tempo em que os ratos tinham acesso a comida (8 horas ou 4 horas, consoante as publicações acima referenciadas). A restrição temporal reduziu o risco de obesidade, esteatose hepática e hiperinsulinémia (86). Os benefícios do JI estendem-se também a dietas com elevado teor em açúcar simples e dietas que combinam elevado teor em gordura e açúcar simples (87).

O JI previne e reverte a Diabetes *mellitus* tipo 2 através de mecanismos celulares e moleculares que envolvem o aumento da sensibilidade do recetor de insulina, resultando numa mais rápida e eficiente captação de glicose por parte das células musculares e hepáticas, e provavelmente outros tipos celulares, como os neurónios (58, 88). Em modelos de ratos com diabetes *mellitus* tipo 1, o jejum melhora ainda o défice de insulina e a intolerância à glicose (89).

6.2.1.3. Jejum e doenças cardiovasculares

Um protocolo alimentar de JI com duração de 3 meses realizado em modelos de ratos com Enfarte Agudo do Miocárdio (EAM) apresenta efeitos cardioprotetores: o grupo do JI

apresentou uma diminuição da área de enfarte miocárdico e uma redução de 75% do número de células apoptóticas, quando comparado com o grupo designado a uma dieta (90). Noutro trabalho (76) relatou achados ecocardiográficos no seguimento de ratos com EAM que haviam sido sujeitos a períodos de jejum de 24 horas em dias alternados durante 6 meses. O jejum protegeu o coração dos danos induzidos pela isquémia miocárdica, entre os quais preveniu a remodelação e dilatação do ventrículo esquerdo, que ocorreu no grupo com dieta *ad libitum*. Ainda sobre o EAM, o JI com duração de 8 semanas, melhorou a sobrevivência e função cardíaca de ratos, quando executado 14 dias, após o enfarte induzido pela oclusão da artéria coronária esquerda – com uma taxa de sobrevivência de 75% *versus* 25%, este último valor correspondente ao controlo (91).

6.2.1.4. Jejum e cancro

Ao contrário das células normais que são capazes de se ajustar a períodos de jejum, a maioria das células neoplásicas não têm essa capacidade de adaptação. Este fenómeno foi designado de sensibilização diferencial ao *stress*, baseado na noção de que a maioria das mutações é deletéria e que a sua acumulação promove o crescimento das células neoplasias em condições específicas, dificultando a sua adaptação em ambientes metabólicos diferentes e extremos (92).

O jejum tem efeitos benéficos na prevenção e tratamento neoplásico. Com a dieta FDM há uma redução de 45% de neoplasias e a sua deteção é apenas possível decorridos 4 meses (70). Múltiplos ciclos de jejum podem ser tão eficazes quanto ciclos de quimioterapia em modelos de rato com alguns tipos de neoplasia (92). Quando combinado com a quimioterapia, um jejum de 3 a 4 dias aumenta a citotoxicidade da quimioterapia nas células neoplásicas e protege as células saudáveis dos seus efeitos nefastos (93-95).

Protocolo	Espécie	Patologia existente	Resultados terapêuticos	Ref. Biblio.
Jejum intermitente (dias alternados)	Ratos (início em idade jovem)	NA (saudáveis)	↑83% EMV	(66)
Jejum intermitente (dias alternados)	Ratos (adultos)	NA (saudáveis)	↑30-40% EMV	(67)
FMD (ciclos de 4 dias com ingestão 10-50%NET)	Ratos	NA (saudáveis)	↑11% EMV ↑Coordenação motora ↑Memória a curto e longo ↓45% de neoplasias	(70)
Jejum intermitente D: 1ano	Ratos	Modelos transgênicos c/ acumulação de β-amilóide	S/ alterações cognitivas, (vs controles <i>ad libitum</i>)	(73)
Jejum intermitente + DIO	Ratos	NA	↓Efeitos prejudiciais da DIO: ↓Obesidade, esteatose hepática e hiperinsulinemia	(83-86)
Jejum intermitente	Ratos	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	↑Tolerância à glicose	(89)
Jejum intermitente	Ratos	Pós-EAM	Melhoria da função cardíaca Prevenção da dilatação/remodelação do VE	(76) (91)
Jejum D: 4 a 5 dias + Quimioterapia	Ratos	Diversas neoplasias	↑Citotoxicidade para as células neoplásicas C/proteção das células saudáveis	(93-95)

Tabela 1: Efeitos de diferentes protocolos de jejum em ratos. NA, não aplicável. EMV, esperança média de vida. FMD, *fasting mimicking diet*. NET, necessidades energéticas totais. D, duração. DIO, dieta indutora de obesidade. EAM, enfarte agudo do miocárdio. VE, ventrículo esquerdo. Na FMD os ratos foram alimentados com ciclos de FDM com duração de 4 dias, 2 vezes por mês. A FMD consistia na ingestão de entre 10-50% das NET. Nos restantes dias do mês, a dieta era *ad libitum*.

6.3.2. Jejum em humanos

À semelhança do capítulo 6.2.1, nos subcapítulos seguintes, serão descritos alguns dos efeitos do jejum e FMD em doenças relacionadas com o envelhecimento, diferindo na quantidade de informação contida, que por se tratar da espécie humana, é escassa (Tabela 2).

6.2.2.1. Jejum e doenças cardiometabólicas

Para além da escassez de dados bibliográficos sobre o tema, a grande maioria dos estudos existentes acerca do jejum em humanos é realizada em adultos com excesso de peso ou obesos. Apesar de ser uma população muito específica, e de serem necessários estudos em maior escala em adultos saudáveis, para assegurar a sua segurança, eficácia e fiabilidade, os resultados existentes permitem inferir quais as consequências que protocolos de JI têm na redução de fatores de risco cardiovascular. Já que o excesso de peso é um problema *major* relacionado com doenças com elevada prevalência na população envelhecida, tais como o cancro, diabetes, doença cardiovascular e demencial (96). Adultos com excesso de peso e obesos, após um protocolo de JI de 2 meses, conseguiram diminuir fatores de risco cardiovascular, como o colesterol total, colesterol LDL e triglicédeos, e gordura corporal (59).

Alguns estudos (60, 97) comparam os efeitos do jejum intermitente com a restrição calórica no âmbito a fisiopatologia da diabetes *mellitus*. O JI executado durante 2 semanas, em indivíduos com excesso de peso e obesos, resulta numa resistência à insulina 25% inferior ao grupo que cumpriu a RC (60, 97). No seguimento destes indivíduos, o grupo do JI foi designado padrão alimentar em que 2 dias por semana realizavam um dieta baixa em calorias e hidratos de carbono, semelhante à FMD mencionada anteriormente (69), e o grupo da RC

mantteve o mesmo plano. A dieta que mimetizava o jejum resultou numa maior perda de gordura visceral.

Tal como a RC, os efeitos do JI não são universais no Homem, tendo sido reportado para esquemas semelhantes de jejum (2 a 3 semanas de JI nos quais eram alternados 20 a 24 horas de períodos de jejum total com 24 a 28 horas de consumo calórico 175 a 200% das necessidades diárias) diferentes resultados – o insucesso terapêutico (98) e, a melhoria na sensibilidade à insulina com aumento da captação de glicose. A resposta metabólica ao jejum é também dependente do sexo do indivíduo (99). Neste protocolo (99), apenas os elementos do sexo masculino registaram um aumento da sensibilidade à insulina. Esta diferença foi explicada por uma maior libertação de ácidos gordos livres para a circulação sanguínea nos organismos femininos (100).

Em humanos, uma forma eficaz de baixar a tensão arterial (TA), é a prática de um protocolo de jejum prolongado. Existem diversos centros que realizam jejum medicamente assistido em adultos com doenças crónicas, sendo um deles o *TrueNorth Health Center*, localizado nos Estados Unidos da América. Alguns dos trabalhos publicados (101, 102) sobre doentes ali internados, relatam os efeitos do jejum na hipertensão arterial (HTA). Na primeira publicação (101), 174 indivíduos com HTA foram sujeitos a uma dieta pré-jejum limitada a frutas e vegetais (durante 2 a 3 dias), seguida de jejum (que durou em média 10 a 11 dias), e de um período (de 6 a 7 dias) de reintrodução de alimentos de origem exclusivamente vegetal, baixa em gordura e sal. Após o término do protocolo aproximadamente 90% dos doentes atingiram valores de TA inferiores a 140/90mmHg. Com doentes de estadio 3 (TA sistólica superior a 180 mmHg e TA diastólica superior a 110mmHg) registou-se uma descida média de 60/17mmHg. Todos os doentes que tomavam medicação no início do protocolo (6,3%) descontinuaram a medicação. Estes achados são promissores, e alertam para a necessidade de

ensaios clínicos randomizados com maior número de voluntários onde se apliquem protocolos semelhantes.

6.2.2.2. Jejum e ritmo circadiano

Os ritmos circadianos otimizam a fisiologia e saúde através da coordenação da função celular, função tecidual e comportamento. Estes ritmos endógenos, como referido anteriormente, são na grande maioria controlados pelo NSQ. Uma vez que a sua função coordenadora é atenuada com o avançar da idade, torna-se ainda mais importante o controlo destes estímulos externos, nomeadamente a exposição à luz e o padrão temporal de ingestão alimentar, de forma a evitar a descoordenação temporal e fisiológica, que pode resultar em doenças crónicas relacionadas com o envelhecimento (18).

Do ponto de vista molecular, os ritmos circadianos são gerados a nível celular, autonomamente, em ciclos de transcrição-tradução. Estes circuitos moleculares bem como a interação entre o metabolismo, nomeadamente os sensores de nutrientes, o ritmo circadiano e as doenças relacionadas com o envelhecimento foram revistos recentemente noutras publicações (103, 104). O ritmo circadiano está intrinsecamente ligado aos sensores de nutrientes mTOR, AMPK e sirtuinas, cuja ativação depende do estado energético celular. Um exemplo desta interação dá-se quando é ativada a cascata mTOR, que ocorre na presença de elevada quantidade de aminoácidos, e fosforila duas proteínas (CK1 e GSK3) que por sua vez fosforilam um dos componentes do relógio circadiano (PER), alterando a sua estabilidade (105). Assim, o constante consumo alimentar, com ausência de períodos de jejum, pode causar uma disrupção dos ritmos circadianos.

Protocolo	Patologia existente	Resultados terapêuticos	Ref. Biblio.
Jejum intermitente (dias alternados) D: 2 meses	Excesso de peso/obesidade	↓ Fatores de risco cardiovascular: Colesterol total, LDL, triglicerídeos, e gordura corporal	(59)
Jejum intermitente D: 2 semanas	Excesso de peso/obesidade	↓ Resistência à insulina (25% < que o grupo da RC)	(60, 97)
FMD (2 dias/semana) D: 2meses	Excesso de peso/obesidade	↓ Gordura visceral	(60, 97)
Jejum intermitente D: 2 semanas	NA (saudáveis)	Sem benefícios reportados	(98)
Jejum intermitente (36h de jejum/48h) D: 21dias	NA (saudáveis)	↑ Sensibilidade à insulina, apenas no sexo masculino	(99)
Jejum prolongado D média: 11 dias + Dieta de origem vegetal exclusiva D:7dias	HTA	Normalização dos valores de TA, Em 90% dos participantes	(101)

Tabela 2: Efeitos de diferentes protocolos de jejum na prevenção/tratamento de patologias relacionadas com o envelhecimento, em humanos. D, Duração. LDL, *low density cholesterol*. RC, restrição calórica. FMD, *fasting mimiking diet*. NA, não aplicável. HTA, Hipertensão Arterial. TA, Tensão Arterial.

7. Fitoquímicos

Os fitoquímicos são metabolitos secundários de plantas, também de alguns fungos e bactérias, que lhes possibilitam a sobrevivência em ambientes de *stress*. São uma defesa contra infecções, herbívoros e poluentes ambientais. Apesar de não serem considerados nutrientes essenciais, existe evidência de que podem diminuir o risco de doença cardiovascular, metabólica e neoplásica, bem como prolongar a esperança de vida de várias espécies (106).

De seguida serão descritos alguns dos fitoquímicos mais estudados em modelos celulares e animais, e relatados alguns dos mecanismos moleculares responsáveis pelo aumento da longevidade e efeitos protetores em doenças crónicas (Tabela 3).

7.1. Resveratrol

É um polifenol presente em alguns produtos de origem vegetal como uvas, amendoins, frutos vermelhos e frutos secos. Esta pequena molécula tem sido extensamente estudada devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas (107). O resveratrol mimetiza os efeitos da RC, aumentando a longevidade através de mecanismos dependentes de sirtuínas (Sirt1 e Sirt2). Por sua vez, os efeitos da Sirt1 foram demonstrados ser dependentes da autofagia (108).

Estudos em ratos demonstraram que o consumo de resveratrol tem um efeito protetor numa dieta altamente calórica e rica em gordura, melhorando a saúde e aumentando a sobrevivência (109). Foi ainda reportado um ganho de 70% em longevidade, num modelo frequentemente utilizado em estudos de envelhecimento – a levedura *S. cerevisiae* (110).

Não existem dados sobre a extensão da esperança de vida em humanos através do resveratrol. Contudo, existem diversos estudos de curta duração, nos quais é reportado um

aumento da sensibilidade à insulina (111), melhoria da função cerebrovascular e capacidade cognitiva (112), e da função endotelial em adultos com excesso de peso e obesos com hipertensão arterial (113), bem como efeitos anticancerígenos em modelos de cancro do pulmão, colo-retal, mama, carcinoma hepatocelular, entre outros (114).

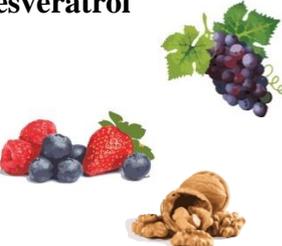
7.2. Curcumina

A curcumina é o principal curcuminoide presente em maior concentração na *Curcuma longa*, cujo rizoma dá origem à especiaria vulgarmente conhecida como açafrão-das-índias. Esta especiaria é utilizada nas medicinas tradicionais chinesa e indiana no tratamento de diversas patologias que cursem com dor abdominal, disenteria e icterícia. O interesse da sua aplicação farmacológica surgiu quando foram demonstradas as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (106).

Por ser um componente não tóxico e farmacologicamente ativo, foi sugerido como uma potencial molécula anticancerígena (107). Vários estudos *in vitro* e *in vivo* reportaram os seus efeitos supressores tumorais (115-117), sendo a indução da autofagia através da inibição da cascata ATK/mTOR, e ativação da cascata ERK1/2 (116). Os efeitos da curcumina têm também sido testados na Doença de Alzheimer; contudo devido à sua baixa biodisponibilidade não existem muitos trabalhos em humanos sobre o tema. Estão descritos diversos mecanismos através dos quais a curcumina oferece neuroprotecção: inibe e promove a desagregação de placas β -amiloides, aumenta a eliminação da proteína Tau, modifica a atividade da microglia, entre outros (118). A curcumina melhora também a função endotelial, diminuindo a rigidez arterial (119).

7.3. Quercetina

A quercetina é um flavenoide largamente presente em muitas frutas e vegetais, como mirtilos, cebolas, maçãs e brócolos. Está descrito o aumento de longevidade em nemátodes da espécie *Caenorhabditis elegans* em 20%. Estimula a atividade dos proteassomas em fibroblastos humanos senescentes, aumentando a sua longevidade (120). Este flavenoide tem um elevado efeito protetor contra espécies reativas de oxigénio, com um poder antioxidante 6 vezes superior ao da vitamina C (106). Ativa a Sirt1 (107), e é um agente com efeitos pro-apoptóticos, antiproliferativos, pro e antioxidantes. Sendo estas duas últimas características opostas relevantes para o seu potencial anticancerígeno (121). A quercetina é um quimiosensibilizador mas também atua como quimioprotetor: poupando as células normais dos efeitos nefastos da quimioterapia (121). Este bioflavonoide tem também efeitos neuroprotectores, inibindo os efeitos neurotóxicos provocados pela exposição cerebral a manganês. Exposição essa que resulta em sintomas extrapiramidais semelhantes aos encontrados na Doença de Alzheimer (122).

Fitoquímico	Origem	Organismo	Alvo terapêutico	Resultado terapêutico	Ref. Biblio.
Resveratrol		Levedura <i>S. cerevisiae</i>	↑Sirtuina Sir1	Aumento da esperança média de vida em 70%	(110)
		Ratos numa dieta com elevado teor de gordura	↑Sirtuina Sirt1 ↑ AMPK	↑Sensibilidade à insulina, redução do IGF-1 ↓Mortalidade em 31% associada à dieta referida	(109)
		Ratos com síndrome progeróide	↑Sirtuina Sirt1	↓Características progeróides e ↑Longevidade	(123)
		Macacos: <i>Macaca mulatta</i>	↓NF-kB	↑Sensibilidade à insulina,	(124)
		Sujeitos a dieta com ↑teor em gordura e açúcar		Neuroproteção contra doença cerebrovascular	(125)
		Homens adultos com excesso de peso	-	Melhoria da função endotelial	(113)
Curcumina, Tetrahidrocurcumina		Mosca: <i>Drosophila melanogaster</i>	-	↓Dano da exposição à radiação ↓Stress oxidativo ↑Longevidade	(126)
		Modelos animais não humanos com Alzheimer	-	↓Placas β-amiloides ↓ Tau	(118)
		Ratos com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	Proteassoma	Melhoria da função das células β-pancreáticas e da sensibilidade à	(127)

				insulina
				↑Longevidade
Modelos celulares humanos:				
Curcumina, Tetrahidrocurcumina (cont.)	-melanoma	↓ATK/mTOR ↑ Autofagia	Supressão tumoral	(115)
	-glioblastoma	↓ATK/mTOR ↑ ERK1/2 ↑ Autofagossomas	Supressão tumoral	(116)
	-tecidos sem patologia	↑Produção de NO por parte dos macrófagos ↑Atividade da TERT	↑Reparação tecidual e ↑Longevidade	(117)
	-endotélio de veia do cordão umbilical	↑Autofagia	↑Proteostasia ↓ Resistência à insulina	(128)
	Humanos:			
	- Mulheres saudáveis pós-menopausa	↑Biodisponibilidade de NO	Melhoria da função endotelial e ↓PCR	(119)
Quercetina	<i>C. elegans</i>	↑Autofagia	↑20% Longevidade	(120)
	Cérebro de rato exposto a dose neurotóxicas de Mn	↓NF-kB ↑Nrf2	↓ <i>Stress</i> oxidativo ↓Neuroinflamação e apoptose induzidas pelo Mn	(122)
	Fibroblastos humanos	↑ Proteassoma	↑Longevidade	(120)

Tabela 3: Descrição dos fitoquímicos - alimentos onde estão presentes em maior quantidade (representados pelas imagens), organismos em que os seus efeitos foram testados, alvos e resultados terapêuticos. TERT, transcriptase reversa da telomerase - é uma subunidade da enzima telomerase. Mn, Manganês.

A figura 3 sintetiza os efeitos que as intervenções de âmbito nutricional descritas neste trabalho têm sobre a fisiopatologia do envelhecimento.

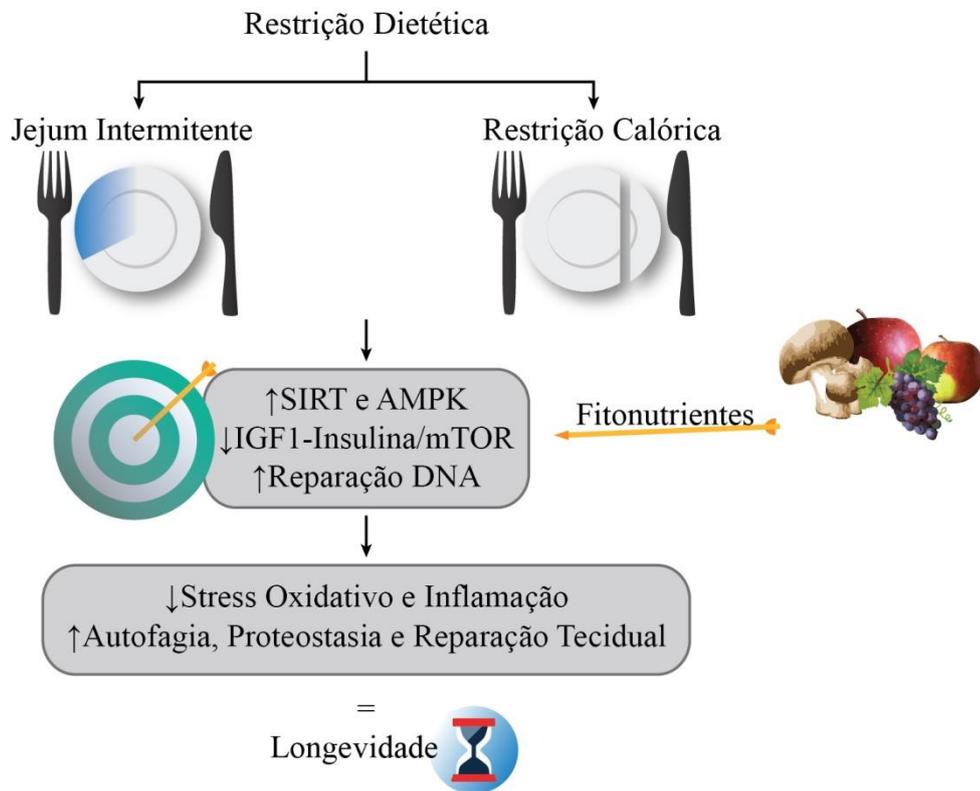


Figura 3: Representação esquemática dos efeitos da restrição dietética e dos fitonutrientes. A restrição dietética promove a longevidade através da regulação de diversos sensores de nutrientes: SIRT, AMPK, IGF1-Insulina/mTOR. Os fitonutrientes por sua vez atuam diretamente em alguns alvos moleculares, tendo também como consequência um aumento na longevidade.

8. Discussão e Conclusão

A descoberta de intervenções que culminem num envelhecimento livre de doença é importante a nível individual e mundial, uma vez que a maioria dos países desenvolvidos tem uma população envelhecida e doente. A famosa expressão cuja origem é atribuída ao pai da medicina moderna – Hipócrates – “Que o alimento seja o teu medicamento” ganha um novo significado neste contexto. Quando, quanto e o que ingerimos pode então ser manipulado e ajustado de forma a maximizar o potencial que a nutrição tem em modular o processo de envelhecimento.

No entanto, antes de poderem ser aplicadas manipulações nutricionais com segurança a nível populacional, falta compreender com mais detalhe os mecanismos moleculares influenciados pelas mesmas. É também necessária mais investigação em diferentes modelos animais, uma vez que a grande maioria das intervenções testadas neste âmbito não foram ainda validadas em mamíferos. É de salientar que, as estratégias executadas em humanos, tais como a restrição calórica, jejum intermitente e ingestão de fitoquímicos, foram realizadas num curto período de tempo, e em amostras consideradas pequenas. Não sendo possível, por isso, avaliar os seus efeitos a longo prazo na longevidade e prevenção de doenças crónicas, nem extrapolar para a população em geral. Dentro da mesma limitação, os regimes de restrição dietética em humanos foram maioritariamente testados em adultos com excesso de peso, sendo necessária a investigação em adultos saudáveis e em outros tipos de patologia. Falta ainda realizar uma discriminação dos efeitos em diferentes sexos, e a quantificação de percentagens de restrição calórica/duração dos períodos de jejum/determinação de doses terapêuticas de fitoquímicos, de forma a comprovar a eficácia e segurança destas intervenções para casos específicos.

A chave para um envelhecimento saudável está na aplicação de medidas que previnam ou, pelo menos, atrasem o aparecimento de doenças crônicas. Os estudos populacionais e laboratoriais, referidos neste trabalho, conduzem-nos à conclusão que a quantidade e qualidade da dieta têm um papel fundamental na promoção de saúde. Já no âmbito do tratamento de doenças crônicas, a manipulação e personalização das estratégias alimentares referidas nesta revisão seria também uma área a investir nos cuidados de saúde primários. Por exemplo, num doente com diabetes *mellitus* tipo 2 poder-se-ia testar um protocolo de jejum associado à ingestão de determinados alimentos cuja composição inclua fitonutrientes específicos adequados à sua patologia. Especificando: Protocolo de jejum intermitente (16 horas de jejum com 8 horas de ingestão alimentar) + ingestão de uvas, frutos silvestres, frutos secos (ricos em resveratrol), açafraão-das-índias e mostarda (ricos em curcumina). Todas as parcelas referidas, entre outros efeitos, diminuem a resistência à insulina (60, 97, 99, 124, 128). É então de esperar que, com o avanço da investigação científica nesta área, as estratégias nutricionais aqui mencionadas, e suas variantes, se tornem alternativas viáveis e seguras aos tratamentos farmacológicos convencionais, ou que sejam utilizados simultaneamente com terapias convencionais, de forma a potenciar os efeitos de ambas.

9. Agradecimentos

À Professora Doutora Anabela Mota Pinto por toda a sabedoria e conhecimento partilhados. Sem estes dificilmente teria conseguido realizar este trabalho. Representa para mim um modelo a seguir, por todo o seu profissionalismo e disponibilidade.

À minha família por me ter apoiado ao longo de todo o meu percurso académico. Em especial ao meu irmão Miguel que desde o início do curso repartiu os seus conhecimentos médicos e experiências comigo. Partilhou também o seu talento artístico na elaboração de algumas das ilustrações deste trabalho.

10. Referências bibliográficas

1. Cabo R, Carmona-Gutierrez D, Bernier M, Hall Michael N, Madeo F. The Search for Antiaging Interventions: From Elixirs to Fasting Regimens. *Cell*. 2014;157(7):1515-26.
2. Portugal, Saúde D-Gd, Análise DdSdIe. Portugal IDADE MAIOR em números, 2014: A Saúde da População Portuguesa com 65 ou mais anos de idade. Lisboa: DGS; 2014.
3. Lopez-Otin C, Galluzzi L, Freije JM, Madeo F, Kroemer G. Metabolic Control of Longevity. *Cell*. 2016;166(4):802-21.
4. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
5. Longo VD, Antebi A, Bartke A, Barzilai N, Brown-Borg HM, Caruso C, et al. Interventions to Slow Aging in Humans: Are We Ready? *Aging Cell*. 2015;14(4):497-510.
6. Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:959-91.
7. Labbadia J, Morimoto RI. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu Rev Biochem*. 2015;84:435-64.
8. Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell*. 2011;146(5):682-95.
9. Chondrogianni N, Voutetakis K, Kapetanou M, Delitsikou V, Papaevgeniou N, Sakellari M, et al. Proteasome activation: An innovative promising approach for delaying aging and retarding age-related diseases. *Ageing Research Reviews*. 2015;23(Part A):37-55.
10. Pyo JO, Yoo SM, Ahn HH, Nah J, Hong SH, Kam TI, et al. Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat Commun*. 2013;4:2300.
11. Aunan JR, Watson MM, Hagland HR, Soreide K. Molecular and biological hallmarks of ageing. *Br J Surg*. 2016;103(2):e29-46.

12. Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science*. 2010;328(5976):321-6.
13. Garinis GA, van der Horst GT, Vijg J, Hoeijmakers JH. DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nat Cell Biol*. 2008;10(11):1241-7.
14. Houtkooper RH, Williams RW, Auwerx J. Metabolic networks of longevity. *Cell*. 2010;142(1):9-14.
15. Kapahi P, Chen D, Rogers AN, Katewa SD, Li PW-L, Thomas EL, et al. With TOR, Less Is More: A Key Role for the Conserved Nutrient-Sensing TOR Pathway in Aging. *Cell Metabolism*.11(6):453-65.
16. Lushchak O, Strilbytska O, Piskovatska V, Storey KB, Koliada A, Vaiserman A. The role of the TOR pathway in mediating the link between nutrition and longevity. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2017;164(Supplement C):127-38.
17. Loudon Andrew SI. Circadian Biology: A 2.5 Billion Year-Old Clock. *Current Biology*.22(14):R570-R1.
18. Manoogian ENC, Panda S. Circadian rhythms, time-restricted feeding, and healthy aging. *Ageing Res Rev*. 2017;39:59-67.
19. Castillo MR, Hochstetler KJ, Tavernier RJ, Greene DM, Bult-Ito A. Entrainment of the master circadian clock by scheduled feeding. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2004;287(3):R551-R5.
20. Finkel T. The metabolic regulation of aging. *Nat Med*. 2015;21(12):1416-23.
21. Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *Embo j*. 2015;34(7):856-80.

22. Ferreira-Marques M, Avelaira CA, Carmo-Silva S, Botelho M, Pereira de Almeida L, Cavadas C. Caloric restriction stimulates autophagy in rat cortical neurons through neuropeptide Y and ghrelin receptors activation. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(7):1470-84.
23. Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G. Metabolic control of autophagy. *Cell*. 2014;159(6):1263-76.
24. Canto C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matakai C, Coste A, Lagouge M, et al. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab*. 2010;11(3):213-9.
25. Makino N, Oyama J, Maeda T, Koyanagi M, Higuchi Y, Shimokawa I, et al. FoxO1 signaling plays a pivotal role in the cardiac telomere biology responses to calorie restriction. *Mol Cell Biochem*. 412. New York 2016. p. 119-30.
26. Vera E, Bernardes de Jesus B, Foronda M, Flores JM, Blasco MA. Telomerase Reverse Transcriptase Synergizes with Calorie Restriction to Increase Health Span and Extend Mouse Longevity. In: Vina J, editor. *PLoS One*. 8. San Francisco, USA 2013.
27. Freitas-Simoes TM, Ros E, Sala-Vila A. Nutrients, foods, dietary patterns and telomere length: Update of epidemiological studies and randomized trials. *Metabolism*. 2016;65(4):406-15.
28. Kark JD, Goldberger N, Kimura M, Sinnreich R, Aviv A. Energy intake and leukocyte telomere length in young adults. *Am J Clin Nutr*. 2012;95(2):479-87.
29. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*. 2009;325(5937):201-4.
30. Colman RJ, Beasley TM, Allison DB, Weindruch R. Skeletal effects of long-term caloric restriction in rhesus monkeys. *Age (Dordr)*. 34. Dordrecht 2012. p. 1133-43.

31. Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, et al. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature*. 2012;489(7415):318-21.
32. Mattison JA, Colman RJ, Beasley TM, Allison DB, Kemnitz JW, Roth GS, et al. Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nat Commun*. 2017;8.
33. Rizza W, Veronese N, Fontana L. What are the roles of calorie restriction and diet quality in promoting healthy longevity? *Ageing Res Rev*. 2014;13:38-45.
34. Szafranski K, Mekhail K. The fine line between lifespan extension and shortening in response to caloric restriction. *Nucleus*. 52014. p. 56-65.
35. Mitchell SJ, Madrigal-Matute J, Scheibye-Knudsen M, Fang E, Aon M, Gonzalez-Reyes JA, et al. Effects of Sex, Strain, and Energy Intake on Hallmarks of Aging in Mice. *Cell Metab*. 2016;23(6):1093-112.
36. Robert L. Calorie-restriction and longevity. End of a dream, at least for primates? *European Geriatric Medicine*. 2013;4(2):129-32.
37. Willcox BJ, Willcox DC. Caloric Restriction, CR Mimetics, and Healthy Aging in Okinawa: Controversies and Clinical Implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2014;17(1):51-8.
38. Willcox DC, Scapagnini G, Willcox BJ. Healthy aging diets other than the Mediterranean: A Focus on the Okinawan Diet. *Mech Ageing Dev*. 2014;136-137:148-62.
39. Fontana L, Meyer TE, Klein S, Holloszy JO. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(17):6659-63.
40. Rickman AD, Williamson DA, Martin CK, Gilhooly CH, Stein RI, Bales CW, et al. The CALERIE Study: design and methods of an innovative 25% caloric restriction intervention. *Contemp Clin Trials*. 2011;32(6):874-81.

41. 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. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015;70(9):1097-104.
42. Fontana L, Villareal DT, Das SK, Smith SR, Meydani SN, Pittas AG, et al. Effects of 2-year calorie restriction on circulating levels of IGF-1, IGF-binding proteins and cortisol in nonobese men and women: a randomized clinical trial. *Aging Cell*. 2016;15(1):22-7.
43. Martin CK, Bhapkar M, Pittas AG, Pieper CF, Das SK, Williamson DA, et al. Effect of Calorie Restriction on Mood, Quality of Life, Sleep, and Sexual Function in Healthy Nonobese Adults: The CALERIE 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med*. 2016;176(6):743-52.
44. CALERIE database and stored specimens available for future studies (44) [cited 2017 August 4] Available from: (<https://calerie.duke.edu/biorepository>).
45. Belsky DW, Huffman KM, Pieper CF, Shalev I, Kraus WE. Change in the Rate of Biological Aging in Response to Caloric Restriction: CALERIE Biobank Analysis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017.
46. Locher JL, Goldsby TU, Goss AM, Kilgore ML, Gower B, Ard JD. Calorie restriction in overweight older adults: Do benefits exceed potential risks? *Experimental Gerontology*. 2016;86:4-13.
47. Villareal DT, Chode S, Parimi N, Sinacore DR, Hilton T, Armamento-Villareal R, et al. Weight loss, exercise, or both and physical function in obese older adults. *N Engl J Med*. 2011;364(13):1218-29.
48. Beavers KM, Beavers DP, Nesbit BA, Ambrosius WT, Marsh AP, Nicklas BJ, et al. Effect of an 18-month physical activity and weight loss intervention on body composition in overweight and obese older adults. *Obesity (Silver Spring)*. 2014;22(2):325-31.

49. Santanasto AJ, Glynn NW, Newman MA, Taylor CA, Brooks MM, Goodpaster BH, et al. Impact of Weight Loss on Physical Function with Changes in Strength, Muscle Mass, and Muscle Fat Infiltration in Overweight to Moderately Obese Older Adults: A Randomized Clinical Trial. *J Obes*. 2011;2011.
50. Nakagawa S, Lagisz M, Hector KL, Spencer HG. Comparative and meta-analytic insights into life extension via dietary restriction. *Aging Cell*. 2012;11(3):401-9.
51. Speakman JR, Mitchell SE, Mazidi M. Calories or protein? The effect of dietary restriction on lifespan in rodents is explained by calories alone. *Exp Gerontol*. 2016;86:28-38.
52. Fontana L, Partridge L. Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell*. 2015;161(1):106-18.
53. 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.
54. Fontana L, Adelaye RM, Rastelli AL, Miles KM, Ciamporcero E, Longo VD, et al. Dietary protein restriction inhibits tumor growth in human xenograft models. *Oncotarget*. 2013;4(12):2451-61.
55. Hine C, Mitchell JR. Calorie restriction and methionine restriction in control of endogenous hydrogen sulfide production by the transsulfuration pathway. *Exp Gerontol*. 2015;68:26-32.
56. Thivat E, Durando X, Demidem A, Farges MC, Rapp M, Cellarier E, et al. A methionine-free diet associated with nitrosourea treatment down-regulates methylguanine-DNA methyl transferase activity in patients with metastatic cancer. *Anticancer Res*. 2007;27(4c):2779-83.

57. McCarty MF, Barroso-Aranda J, Contreras F. The low-methionine content of vegan diets may make methionine restriction feasible as a life extension strategy. *Med Hypotheses*. 2009;72(2):125-8.
58. Mattson MP, Longo VD, Harvie M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Research Reviews*. 2017;39:46-58.
59. Varady KA, Dam VT, Klempel MC, Horne M, Cruz R, Kroeger CM, et al. Effects of weight loss via high fat vs. low fat alternate day fasting diets on free fatty acid profiles. 2015;5:7561.
60. Harvie MN, Pegington M, Mattson MP, Frystyk J, Dillon B, Evans G, et al. The effects of intermittent or continuous energy restriction on weight loss and metabolic disease risk markers: a randomized trial in young overweight women. *Int J Obes*. 2011;35(5):714-27.
61. Safdie FM. Fasting and cancer treatment in humans: A case series report. 2009;1(12):988-1007.
62. Choi In Y, Piccio L, Childress P, Bollman B, Ghosh A, Brandhorst S, et al. A Diet Mimicking Fasting Promotes Regeneration and Reduces Autoimmunity and Multiple Sclerosis Symptoms. *Cell Reports*.15(10):2136-46.
63. Longo VD, Mattson MP. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab*. 2014;19(2):181-92.
64. Grabacka M, Pierzchalska M, Dean M, Reiss K. Regulation of Ketone Body Metabolism and the Role of PPAR α . In: Desvergne B, editor. *Int J Mol Sci*. 172016.
65. Cahill GF, Jr. Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr*. 2006;26:1-22.
66. Goodrick CL, Ingram DK, Reynolds MA, Freeman JR, Cider NL. Effects of intermittent feeding upon growth and life span in rats. *Gerontology*. 1982;28(4):233-41.

67. Goodrick CL, Ingram DK, Reynolds MA, Freeman JR, Cider NL. Differential Effects of Intermittent Feeding and Voluntary Exercise on Body Weight and Lifespan in Adult Rats. *Journal of Gerontology*. 1983;38(1):36-45.
68. Arum O, Bonkowski MS, Rocha JS, Bartke A. The growth hormone receptor gene-disrupted mouse fails to respond to an intermittent fasting diet. *Aging Cell*. 2009;8(6):756-60.
69. Brandhorst S, Wei M, Hwang S, Morgan TE, Longo VD. Short-term calorie and protein restriction provide partial protection from chemotoxicity but do not delay glioma progression. *Exp Gerontol*. 2013;48(10):1120-8.
70. Brandhorst S, Choi In Y, Wei M, Cheng Chia W, Sedrakyan S, Navarrete G, et al. A Periodic Diet that Mimics Fasting Promotes Multi-System Regeneration, Enhanced Cognitive Performance, and Healthspan. *Cell Metabolism*.22(1):86-99.
71. Yankner BA, Lu T, Loerch P. The Aging Brain. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2008;3(1):41-66.
72. Mattson Mark P. Energy Intake and Exercise as Determinants of Brain Health and Vulnerability to Injury and Disease. *Cell Metabolism*.16(6):706-22.
73. Halagappa VKM, Guo Z, Pearson M, Matsuoka Y, Cutler RG, LaFerla FM, et al. Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*. 2007;26(1):212-20.
74. Arumugam TV, Phillips TM, Cheng A, Morrell CH, Mattson MP, Wan R. Age and energy intake interact to modify cell stress pathways and stroke outcome. *Ann Neurol*. 2010;67(1):41-52.
75. Cheng A, Wan R, Yang J-L, Kamimura N, Son TG, Ouyang X, et al. Involvement of PGC-1 α in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines. 2012;3:1250.

76. Godar RJ, Ma X, Liu H, Murphy JT, Weinheimer CJ, Kovacs A, et al. Repetitive stimulation of autophagy-lysosome machinery by intermittent fasting preconditions the myocardium to ischemia-reperfusion injury. *Autophagy*. 2015;11(9):1537-60.
77. Caccamo A, Maldonado MA, Bokov AF, Majumder S, Oddo S. CBP gene transfer increases BDNF levels and ameliorates learning and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(52):22687-92.
78. Liu D, Pitta M, Jiang H, Lee J-H, Zhang G, Chen X, et al. Nicotinamide forestalls pathology and cognitive decline in Alzheimer mice: evidence for improved neuronal bioenergetics and autophagy procession. *Neurobiology of Aging*.34(6):1564-80.
79. Lin AL, Zheng W, Halloran JJ, Burbank RR, Hussong SA, Hart MJ, et al. Chronic rapamycin restores brain vascular integrity and function through NO synthase activation and improves memory in symptomatic mice modeling Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(9):1412-21.
80. Fontan-Lozano A, Saez-Cassanelli JL, Inda MC, de los Santos-Arteaga M, Sierra-Dominguez SA, Lopez-Lluch G, et al. Caloric restriction increases learning consolidation and facilitates synaptic plasticity through mechanisms dependent on NR2B subunits of the NMDA receptor. *J Neurosci*. 2007;27(38):10185-95.
81. Singh R, Manchanda S, Kaur T, Kumar S, Lakhanpal D, Lakhman SS, et al. Middle age onset short-term intermittent fasting dietary restriction prevents brain function impairments in male Wistar rats. *Biogerontology*. 2015;16(6):775-88.
82. Vasconcelos AR, Yshii LM, Viel TA, Buck HS, Mattson MP, Scavone C, et al. Intermittent fasting attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment. *Journal of Neuroinflammation*. 2014;11(1):85.

83. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab.* 2012;15(6):848-60.
84. Sherman H, Genzer Y, Cohen R, Chapnik N, Madar Z, Froy O. Timed high-fat diet resets circadian metabolism and prevents obesity. *Faseb j.* 2012;26(8):3493-502.
85. Duncan MJ, Smith JT, Narbaiza J, Mueez F, Bustle LB, Qureshi S, et al. Restricting feeding to the active phase in middle-aged mice attenuates adverse metabolic effects of a high-fat diet. *Physiology & Behavior.* 2016;167:1-9.
86. Asher G, Sassone-Corsi P. Time for food: the intimate interplay between nutrition, metabolism, and the circadian clock. *Cell.* 2015;161(1):84-92.
87. Chaix A, Zarrinpar A, Miu P, Panda S. Time-Restricted Feeding Is a Preventative and Therapeutic Intervention against Diverse Nutritional Challenges. *Cell Metabolism.*20(6):991-1005.
88. Sequea DA, Sharma N, Arias EB, Cartee GD. Calorie Restriction Enhances Insulin-Stimulated Glucose Uptake and Akt Phosphorylation in Both Fast-Twitch and Slow-Twitch Skeletal Muscle of 24-Month-Old Rats. *The Journals of Gerontology: Series A.* 2012;67(12):1279-85.
89. Louiza Belkacemi GS-A, Emeline Hupkens, et al.,. Intermittent Fasting Modulation of the Diabetic Syndrome in Streptozotocin-Injected Rats. *International Journal of Endocrinology.* 2012;2012.
90. Ahmet I, Wan R, Mattson MP, Lakatta EG, Talan M. Cardioprotection by intermittent fasting in rats. *Circulation.* 2005;112(20):3115-21.
91. Katare RG, Kakinuma Y, Arikawa M, Yamasaki F, Sato T. Chronic intermittent fasting improves the survival following large myocardial ischemia by activation of

BDNF/VEGF/PI3K signaling pathway. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*.46(3):405-12.

92. Lee C, Raffaghello L, Brandhorst S, Safdie FM, Bianchi G, Martin-Montalvo A, et al. Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy. *Sci Transl Med*. 2012;4(124):124ra27.

93. Raffaghello L, Lee C, Safdie FM, Wei M, Madia F, Bianchi G, et al. Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(24):8215-20.

94. Safdie F, Brandhorst S, Wei M, Wang W, Lee C, Hwang S, et al. Fasting enhances the response of glioma to chemo- and radiotherapy. *PLoS One*. 2012;7(9):e44603.

95. Tinkum KL, Stemler KM, White LS, Loza AJ, Jeter-Jones S, Michalski BM, et al. Fasting protects mice from lethal DNA damage by promoting small intestinal epithelial stem cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(51):E7148-54.

96. Sun Q, Townsend MK, Okereke OI, Franco OH, Hu FB, Grodstein F. Adiposity and weight change in mid-life in relation to healthy survival after age 70 in women: prospective cohort study. *BMJ*. 2009;339.

97. Harvie M, Wright C, Pegington M, McMullan D, Mitchell E, Martin B, et al. The effect of intermittent energy and carbohydrate restriction v. daily energy restriction on weight loss and metabolic disease risk markers in overweight women. *Br J Nutr*. 2013;110(8):1534-47.

98. Soeters MR, Lammers NM, Dubbelhuis PF, Ackermans M, Jonkers-Schuitema CF, Fliers E, et al. Intermittent fasting does not affect whole-body glucose, lipid, or protein metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009;90(5):1244-51.

99. Heilbronn LK, Civitarese AE, Bogacka I, Smith SR, Hulver M, Ravussin E. Glucose tolerance and skeletal muscle gene expression in response to alternate day fasting. *Obes Res.* 2005;13(3):574-81.
100. Hedrington MS, Davis SN. Sexual Dimorphism in Glucose and Lipid Metabolism during Fasting, Hypoglycemia, and Exercise. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015;6.
101. Goldhamer A, Lisle D, Parpia B, Anderson SV, Campbell TC. Medically supervised water-only fasting in the treatment of hypertension. *J Manipulative Physiol Ther.* 2001;24(5):335-9.
102. Goldhamer AC, Klaper M, Foorohar A, Myers TR. Water-only fasting and an exclusively plant foods diet in the management of stage IIIa, low-grade follicular lymphoma. *BMJ Case Rep.* 2015;2015.
103. Cao Y, Wang RH. Associations among Metabolism, Circadian Rhythm and Age-Associated Diseases. *Aging Dis.* 2017. p. 314-33.
104. Longo VD, Panda S. Fasting, Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan. *Cell Metab.* 2016;23(6):1048-59.
105. Zheng X, Sehgal A. AKT and TOR signaling set the pace of the circadian pacemaker. *Curr Biol.* 2010;20(13):1203-8.
106. Si H, Liu D. Dietary antiaging phytochemicals and mechanisms associated with prolonged survival. *J Nutr Biochem.* 2014;25(6):581-91.
107. Hannigan AM, Gorski SM. Macroautophagy: the key ingredient to a healthy diet? *Autophagy.* 2009;5(2):140-51.
108. Morselli E, Maiuri MC, Markaki M, Megalou E, Pasparaki A, Palikaras K, et al. Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death Dis.* 2010;1:e10.

109. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 2006;444(7117):337-42.
110. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 2003;425(6954):191-6.
111. Brasnyo P, Molnar GA, Mohas M, Marko L, Laczy B, Cseh J, et al. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br J Nutr*. 2011;106(3):383-9.
112. Wong RHX, Raederstorff D, Howe PRC. Acute Resveratrol Consumption Improves Neurovascular Coupling Capacity in Adults with Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrients*. 82016.
113. Wong RHX, Howe PRC, Buckley JD, Coates AM, Kunz I, Berry NM. Acute resveratrol supplementation improves flow-mediated dilatation in overweight/obese individuals with mildly elevated blood pressure. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 21(11):851-6.
114. McCubrey JA, Lertpiriyapong K, Steelman LS, Abrams SL, Yang LV, Murata RM, et al. Effects of resveratrol, curcumin, berberine and other nutraceuticals on aging, cancer development, cancer stem cells and microRNAs. *Aging (Albany NY)*. 92017. p. 1477-536.
115. Zhao G, Han X, Zheng S, Li Z, Sha Y, Ni J, et al. Curcumin induces autophagy, inhibits proliferation and invasion by downregulating AKT/mTOR signaling pathway in human melanoma cells. *Oncol Rep*. 2016;35(2):1065-74.
116. Aoki H, Takada Y, Kondo S, Sawaya R, Aggarwal BB, Kondo Y. Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Pharmacol*. 2007;72(1):29-39.

117. Pan MH, Wu JC, Ho CT, Badmaev V. Effects of water extract of *Curcuma longa* (L.) roots on immunity and telomerase function. *J Complement Integr Med*. 2017;14(3).
118. Tang M, Taghibiglou C. The Mechanisms of Action of Curcumin in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;58(4):1003-16.
119. Akazawa N, Choi Y, Miyaki A, Tanabe Y, Sugawara J, Ajisaka R, et al. Curcumin ingestion and exercise training improve vascular endothelial function in postmenopausal women. *Nutrition Research*. 2012;32(10):795-9.
120. Chondrogianni N, Kapeta S, Chinou I, Vassilatou K, Papassideri I, Gonos ES. Anti-ageing and rejuvenating effects of quercetin. *Exp Gerontol*. 2010;45(10):763-71.
121. Brito AF, Ribeiro M, Abrantes AM, Pires AS, Teixo RJ, Tralhao JG, et al. Quercetin in Cancer Treatment, Alone or in Combination with Conventional Therapeutics? *Curr Med Chem*. 2015;22(26):3025-39.
122. Bahar E, Kim JY, Yoon H. Quercetin Attenuates Manganese-Induced Neuroinflammation by Alleviating Oxidative Stress through Regulation of Apoptosis, iNOS/NF-kappaB and HO-1/Nrf2 Pathways. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9).
123. Liu B, Ghosh S, Yang X, Zheng H, Liu X, Wang Z, et al. Resveratrol Rescues SIRT1-Dependent Adult Stem Cell Decline and Alleviates Progeroid Features in Laminopathy-Based Progeria. *Cell Metabolism*. 16(6):738-50.
124. Jimenez-Gomez Y, Mattison JA, Pearson KJ, Martin-Montalvo A, Palacios HH, Sossong AM, et al. Resveratrol improves adipose insulin signaling and reduces the inflammatory response in adipose tissue of rhesus monkeys on a high-fat, high-sugar diet. *Cell Metab*. 2013;18(4).
125. Bernier M, Wahl D, Ali A, Allard J, Faulkner S, Wnorowski A, et al. Resveratrol supplementation confers neuroprotection in cortical brain tissue of nonhuman primates fed a high-fat/sucrose diet. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(5):899-916.

126. Seong KM, Yu M, Lee KS, Park S, Jin YW, Min KJ. Curcumin Mitigates Accelerated Aging after Irradiation in *Drosophila* by Reducing Oxidative Stress. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
127. Weisberg S, Leibel R, Tortoriello DV. Proteasome inhibitors, including curcumin, improve pancreatic beta-cell function and insulin sensitivity in diabetic mice. *Nutr Diabetes.* 2016;6:e205.
128. Ye M, Qiu H, Cao Y, Zhang M, Mi Y, Yu J, et al. Curcumin Improves Palmitate-Induced Insulin Resistance in Human Umbilical Vein Endothelial Cells by Maintaining Proteostasis in Endoplasmic Reticulum. *Front Pharmacol.* 2017;8.