

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA E FISIOTERAPIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENVELHECIMENTO HUMANO

Retardo do envelhecimento cronológico pela restrição calórica e a ficocianina em células de *Saccharomyces cerevisiae* mutantes ao gene sir

Marta Beatriz Santolin

Passo Fundo
2013

Marta Beatriz Santolin

Retardo do envelhecimento cronológico pela restrição calórica e a ficocianina em células de *Saccharomyces cerevisiae* mutantes ao gene sir

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano da Faculdade de Educação Física e Fisioterapia da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Envelhecimento Humano.

Orientador:

Prof^ª. Dra. Telma Elita Bertolin

Coorientador:

Prof^ª. Dra. Elis Cristina Araújo Eleutherio

Passo Fundo
2013

CIP – Catalogação na Publicação

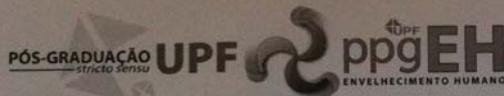
S237r Santolin, Marta Beatriz
Retardo do envelhecimento cronológico pela restrição calórica e a ficocianina em células de *Saccharomyces cerevisiae* mutantes ao gene sir / Marta Beatriz Santolin. – 2013.
78 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) –
Universidade de Passo Fundo, 2013.
Orientador: Prof^ª. Dra. Telma Elita Bertolin.
Coorientador: Prof^ª. Dra. Ellis Cristina Araújo Eleutherio.

1. Envelhecimento. 2. Leveduras. 3. Alimentos - Teor calórico. 4. Ficocianina. I. Bertolin, Telma Elita orientador. II. Eleutherio, Ellis Cristina Araújo, coorientador. III. Título.

CDU: 613.98

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



ATA DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado DA ALUNA

MARTA BEATRIZ SANTOLIN

Aos dois dias do mês de agosto do ano dois mil e doze às quatorze horas, realizou-se, na Faculdade de Educação Física e Fisioterapia da Universidade de Passo Fundo, a sessão pública de defesa da Dissertação: **"Retardo do envelhecimento cronológico pela restrição calórica e a ficocianina em células de *Saccharomyces cerevisiae* mutantes ao gene sir"**, apresentada pela mestranda Marta Beatriz Santolin, que concluiu os créditos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Envelhecimento Humano. Segundo os encaminhamentos do Conselho de Pós-Graduação (CPG) do Mestrado em Envelhecimento Humano e dos registros existentes nos arquivos da Secretaria do Programa, a aluna preencheu todos os requisitos necessários para a defesa. A banca foi composta pelos professores doutores Telma Elita Bertolin - orientadora e presidente da banca examinadora (UPF), Camila Pereira Leguisamo, Diego Bonatto e Adriano Pasqualotti. Após a apresentação e a arguição da dissertação, a banca examinadora considerou a candidata **APROVADA**, em conformidade com o disposto na Resolução Consun Nº 07/2010.

A banca recomenda a consideração dos pareceres, a realização dos ajustes sugeridos e a divulgação do trabalho em eventos científicos e em publicações.

Encerrados os trabalhos de defesa e proclamados os resultados, eu, Prof^a. Dr^a. Telma Elita Bertolin, presidente, dou por encerrada a sessão pela banca.

Passo Fundo, 02 de agosto de 2012.

Prof^a. Dr^a. Telma Elita Bertolin
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Camila Pereira Leguisamo
Universidade de Passo Fundo - UPF

Prof. Dr. Diego Bonatto
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dr. Adriano Pasqualotti
Universidade de Passo Fundo - UPF

DEDICATÓRIA

Ao meu pai e minha mãe,
que me ensinaram a lutar pelos meus sonhos e não desistir nunca.

Depois de um tempo você começa a aceitar suas derrotas de cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de adulto e não com a tristeza de uma criança. E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos... Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser... Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser e que o tempo é curto. Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo, mas se não sabe onde está indo, todo lugar serve... Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as consequências... Aprende que paciência requer muita prática... Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários celebrou. Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha... ... E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.

(William Shakespeare)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a “Deus” por me dar saúde, por me oportunizar tudo que tive durante a minha vida até o presente e por me colocar em uma família fantástica. Obrigada Senhor, por me amparar nos momentos incertos, me dar força interior para superar as dificuldades e mostrar o caminho nas horas mais difíceis.

À minha orientadora e amiga Prof. Telma Elita Bertolin, pela dedicação e empenho sempre; por ter me mostrado o caminho da ciência e por acreditar em mim, concedendo a oportunidade da realização deste trabalho, dividindo seus conhecimentos e me ensinando a buscar sempre mais.

À minha co-orientadora Prof. Elis Cristina Araújo Eleuthério, por me receber no LIFE, pelo incentivo e pela disposição em me ensinar; pelos ensinamentos e contribuições valiosas que fizeram toda a diferença.

Aos professores Fernando Fornari, pelas discussões importantes nos resultados, pelo incentivo e pelos conhecimentos que enriqueceram este trabalho e, à Prof. Sídia Maria Callegari Jaques, por nos receber na UFRGS e nos orientar em toda a análise estatística.

Às minhas colegas de laboratório Fábria, Luana, Renata, Camila e Laís, que me ensinaram sobre a pesquisa experimental, participaram diretamente deste trabalho e me ajudaram em todos os momentos, trabalhando incansavelmente. Obrigada a todas vocês pela força, paciência e por dedicarem mais tempo do que realmente tinham para que eu chegasse até aqui.

Aos alunos pesquisadores do LIFE (Renata, Penélope, Aline, Léo, Eduardo, Thales, Fred, Diana, Cláudia, Luciana, Alan, Alex, Karen, Iuri, prof. Marcos) que me receberam

de braços abertos me dando todo o apoio que eu precisava, me ensinando desde os procedimentos mais simples, sempre com muita paciência e compreensão. Em especial agradeço a amiga Daiane, que me recebeu em sua casa com todo carinho e fez os meus dias de mais alegres.

Aos meus colegas de trabalho, funcionários da Secretaria de Educação da Prefeitura de Cruzaltense, pelo apoio e confiança depositada em mim, ao me comprometer com a execução das minhas tarefas, quando estas eram feitas no mesmo tempo da realização da pesquisa.

A todos os professores do mestrado que me ofereceram a oportunidade de estudar o envelhecimento e por semearem reflexões importantes para a minha formação como Mestre. E, aos meus colegas do mestrado, pelos momentos agradáveis que passamos juntos. Em especial à minha amiga Karine pela amizade e companheirismo, e por dividir os momentos difíceis e os momentos maravilhosos de muitas risadas.

Ao meu namorado Ricardo pela paciência e pela compreensão. Por todo o apoio, sempre atento às dúvidas, inquietações, desânimos e sucessos, o que me deu coragem para ultrapassar a culpa pelo tempo que não aproveitávamos juntos.

A toda minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo. Agradeço meu pai e minha mãe por me ensinarem a dar valor à vida, a tudo e a todos que tenho ao meu redor. Graças a vocês dois, pessoas batalhadoras e sonhadoras, que sempre me incentivaram perante os desafios, a fazer mais e melhor, aprendi que a realização de um sonho depende da dedicação e que para obter um resultado diferente da maioria, devemos ser especiais - pois a maioria não é modelo de sucesso. E hoje completo mais uma etapa. Obrigada, meus queridos pais, por estarem ao meu lado todos os dias, “aguentando” minhas reclamações e me apoiando e incentivando, mesmo quando nem mais eu acreditava que terminaria. Minha Nicole, sobrinha e afilhadinha amada, que veio para iluminar a minha vida e dar mais vida para nossa família.

Quero expressar minha gratidão e apreço a todos que de alguma forma participaram, torceram, acreditaram e incentivaram para que eu pudesse alcançar mais este objetivo. Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

SANTOLIN, Marta Beatriz. Retardo do envelhecimento cronológico pela restrição calórica e a ficocianina em células de *Saccharomyces cerevisiae* mutantes ao gene *sir*. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013.

O processo de envelhecimento é acompanhado por mudanças na atividade das células, tecidos e órgãos. O acúmulo progressivo destas alterações é associado com a crescente suscetibilidade a doenças que acompanha o avanço da idade. O interesse pelo desenvolvimento de terapias antienvhecimento vem crescendo consideravelmente, contudo muitas contribuições nessa linha de pesquisa ainda se fazem necessárias. A restrição calórica vem sendo relatada por prevenir o aparecimento de doenças crônicas ligadas ao envelhecimento e prolongarem vida em diferentes modelos experimentais. É uma das formas de intervenção nutricional mais amplamente discutida para se estender o tempo de vida em uma variedade de espécies, inclusive seres humanos. O uso de moléculas com capacidade antioxidante vem recebendo destaque, visto que estudos sugerem uma relação inversa entre a ingestão de compostos antioxidantes e a incidência de doenças relacionadas ao envelhecimento. Neste contexto, o presente trabalho objetivou analisar o papel da ficocianina e da restrição calórica no envelhecimento cronológico celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para tal, utilizou-se cepas de leveduras controle (BY4741) e deletadas aos genes *sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir4*. As células foram crescidas em meio YPD 2 % glicose (P), YPD 2 % glicose + ficocianina (P + FC), quando expostas a 0,01 mg/mL de ficocianina, durante 1h e YPD 0,5 % glicose (RC). As cepas foram submetidas a 24 h de envelhecimento e coletadas para as análises de sobrevivência celular e peroxidação lipídica. O uso das terapias restrição calórica e ficocianina mostrou benefício no percentual de sobrevivência celular e na peroxidação lipídica. Os resultados apontam que a cepa deletada ao gene *sir2* mostrou maior sensibilidade aos tratamentos com restrição calórica e ficocianina. A peroxidação lipídica foi atenuada pelo uso das terapias Restrição calórica e ficocianina em todas as cepas estudadas, sem diferenças estatisticamente significativas. Estes achados nos permitem sugerir que estas proteínas podem ser influenciadas pela dieta ou pelo uso de antioxidantes, tornando-se interessantes alvos terapêuticos para doenças decorrentes do processo de envelhecimento. Contudo, questões importantes necessitam ser elucidadas para melhorar a compreensão dos mecanismos das sirtuínas e seu potencial terapêutico.

Palavras-chave: **1. Restrição Calórica. 2. Sirtuínas. 3. Envelhecimento. 4. Leveduras. 5. Ficocianina.**

ABSTRACT

SANTOLIN, Marta Beatriz. Retardo do envelhecimento cronológico pela restrição calórica e a ficocianina em células de *Saccharomyces cerevisiae* mutantes ao gene *sir*. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013.

The aging process is accompanied by changes in the activity of the cells, tissues and organs. The progressive accumulation of these changes is associated with the increasing of susceptibility to disease that accompanies advancing age. The interest in developing anti-aging therapies is increasing considerably; however many contributions in this line of research are still needed. Caloric restriction has been reported to prevent the onset of chronic diseases related to aging and prolong life in different experimental models. It is a form of nutritional intervention widely discussed to extend the lifetime in a variety of species, including humans. The use of molecules with functional capacity has received attention, since studies suggest an inverse relationship between intake of these compounds and the incidence of diseases related to aging. In this context, this study aimed to analyze the role of phycocyanin and caloric restriction in chronologically aging yeast cell *Saccharomyces cerevisiae*. To this end, we used the yeast strains control (BY4741) and the deleted genes *sir1*, *sir2*, *sir3* and *sir4*. Cells were grown in YPD medium 2 % glucose (P), glucose 2 % YPD phycocyanin + (P + PC), when exposed to 0.01 mg/ml of phycocyanin, YPD for 1 h and 0.5 % glucose (RC). The strains were subjected to 24 hours of aging and collected for analysis of cell survival and lipid peroxidation. The use of caloric restriction and phycocyanin therapy showed benefit in the percentage of cell survival and lipid peroxidation. The results indicate that the *sir2* gene-deleted strain showed greater sensitivity to treatment with caloric restriction and phycocyanin. Lipid peroxidation was attenuated by the use of therapies Caloric restriction and phycocyanin in all strains studied no statistically significant differences. This finding allows us to suggest that these proteins may be influenced by diet or by the use of antioxidants, becoming interesting therapeutic targets for diseases due to aging. However, there are important questions that need to be elucidated to improve understanding of the mechanisms of sirtuins and their therapeutic potential.

Key words: 1. Caloric Restriction. 2. Sirtuins. 3. Aging. 4. Yeast. 5. Phycocyanin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparativo da população mundial em 2002 e 2025.	18
Figura 2 - Fases do crescimento em glicose da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	21
Figura 3 - Mecanismo de ativação do gene <i>sir2</i> através da restrição calórica.	28
Figura 4 - Atividade enzimática das sirtuínas.	30
Figura 5 - Estratégia experimental utilizada no estudo do envelhecimento cronológico para os diferentes tratamentos.	36
Figura 6 - Sequência de atividades para a análise da viabilidade celular.	39
Figura 7 - Sequência de atividades para a análise de TBARS.	40
Figura 8 - Percentual de sobrevivência após 24 horas de envelhecimento para as cepas controle e deletadas aos genes <i>sir1</i> , <i>sir2</i> , <i>sir3</i> e <i>sir4</i> .	43
Figura 9 - Percentual de sobrevivência celular em 24 horas de envelhecimento para os tratamentos com 0,5 % glicose (RC), 2 % glicose (P) e 2 % glicose + ficocianina (P + FC).	45
Figura 10 - Percentual de sobrevivência celular em 24 horas de envelhecimento para os tratamentos com 0,5 % glicose (RC), 2 % glicose (P) e 2 % glicose + ficocianina (P + FC), nas diferentes cepas.	46
Figura 11 - Aumento de peroxidação lipídica em resposta ao envelhecimento cronológico	48
Figura 12 - Comparação da peroxidação lipídica em 24 h de envelhecimento.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cepas de leveduras estudadas na pesquisa.	34
Tabela 2 - Valores médios do percentual de sobrevivência (%) para os diferentes tratamentos na <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em 24 h de envelhecimento	42
Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão do percentual de sobrevivência (%) nas diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> submetidas a cada tratamento	44
Tabela 4 - Valores médios de peroxidação lipídica (pmoles MDA/mg de cel.) para os diferentes tratamentos na <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Trifosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra Acético
EO	Estresse Oxidativo
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FC	Ficocianina
IL – 6	Interleucina 6
MDA	Malondialdeído
NAD+	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Nucleotídeo Fosfato (forma reduzida)
NF-kB	Nuclear Factor-kappa-B
P	Padrão
Padrão + FC	Padrão + Ficocianina
RC	Restrição Calórica
RL	Radicais Livres
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
sir	Silent Regulator Information
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1. ENVELHECIMENTO	18
2.2. LEVEDURAS <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	19
2.3. RADICAIS LIVRES NO ENVELHECIMENTO	22
2.3.1. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	23
2.4. RESTRIÇÃO CALÓRICA	25
2.4.1. FICOCIANINA	32
3. OBJETIVO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO	34
4.2. MODELO EXPERIMENTAL	34
4.3. MEIOS DE CULTIVO	35
4.4. EXTRATÉGIA EXPERIMENTAL	35
4.5. CRESCIMENTO CELULAR	36
4.6. EXTRAÇÃO DA FICOCIANINA	36
4.7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA FICOCIANINA	37
4.8. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR	38
4.9. OXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS PELO MÉTODO TBARS	39
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5. RESULTADOS	42
5.1. LONGEVIDADE	42
5.2. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	47
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO

Na atualidade, um dos principais focos da pesquisa relacionados ao processo do envelhecimento tem sido direcionado para a compreensão dos mecanismos que fundamentam o prolongamento da vida.

As teorias biológicas do envelhecimento examinam o assunto sob a óptica da degeneração da função e estrutura dos sistemas orgânicos e células. Da interação entre o genoma e os fatores estocásticos resulta a maior ou menor velocidade de envelhecimento do organismo onde, a compreensão do fenômeno de envelhecimento passa pelo contexto dos mecanismos biológicos específicos, manifestando-se através de envelhecimento celular, tecidual e orgânico (FARINATTI, 2002; MOTA, FIGUEIREDO e DUARTE, 2004; MANNARINO et al., 2008).

De acordo com Harman (1981); Montagner e Costa (2009), Vellay (2010) Braidy et al. (2011), o envelhecimento implica em deterioração progressiva, tempo-dependente, do organismo em resposta adaptativa às mudanças ambientais. Trata-se de alterações em nível celular, com diminuição da capacidade dos órgãos em executar suas funções normais, resultando em doença e morte. Nestas investigações ainda permanece a falta de evidências elucidativas sobre os mecanismos biológicos que favorecem a longevidade.

O uso de modelos experimentais torna-se importante para a universalização de conhecimentos relativos ao prologamento da vida. As células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* são utilizadas em larga escala para estudos dos fenômenos da bioquímica, biologia celular e molecular, caracterizando-se como um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular para tais estudos. Seu metabolismo é semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica e de detoxificação. Apesar das diferenças de complexidade entre leveduras e humanos, o estudo do envelhecimento em leveduras tem mostrado informações importantes em vias que modulam o processo do envelhecimento em mamíferos (KABERLEIN, 2010).

Outro fator que colabora para que estes microrganismos sejam uma ótima escolha de modelo experimental para estudos da resposta celular é a facilidade de obtenção de cepas mutantes através de técnicas de genética clássica e molecular. Em

adição, o seu pequeno tempo de geração quando comparado com as células animais e o seu genoma completamente mapeado (MANNARINO et al., 2008).

A busca por terapias preventivas ao processo de envelhecimento, aparece na atualidade como um dos maiores objetos de estudos da ciência. Uma das intervenções investigadas para aumentar o tempo de vida em mamíferos é a restrição calórica (RC), uma redução na ingestão de calorias, sem deficiências nutricionais. Esse modelo de dieta prolonga o tempo de vida, atenua os efeitos indesejados do avançar da idade e retarda o aparecimento de patologias relacionadas ao envelhecimento.

De acordo com Weindruch et al. (1986); Masoro (2000); Guarente (2005); Barger et al. (2008); Baur (2010); Herranz e Serrano (2010) a RC tem sido efetiva no aumento do tempo de vida em diversos modelos experimentais, incluindo os mamíferos. Colman (2009) relatou que a RC em mamíferos (macacos *Rhesus*) resulta em diminuição da incidência de doenças associadas ao envelhecimento tais como o câncer, a diabetes e aterosclerose, doenças neurodegenerativas.

Alguns achados científicos mostram que os benefícios da RC na longevidade podem estar relacionados à indução do gene *Silent Information Regulator 2* (*sir2*), pertencentes à família das proteínas sirtuínas. Isso decorre a partir do achado que a superexpressão do gene *sir* pode estender a vida útil, enquanto a supressão reduz a longevidade (SINLAIR e GUARENTE, 1997; KENNEDY, 1997; KABERLEIN, McVEY e GUARENTE, 1999; KABERLEIN et al., 2004; KABERLEIN, 2010; NAKAGAWA e GUARENTE, 2011)

A conservação dos membros da família das sirtuínas em genes de leveduras indica que, no homem, estas proteínas desempenham papéis fisiológicos vitais. O desenvolvimento de tratamentos específicos para retardar os efeitos do envelhecimento é atualmente um desafio para a medicina preventiva (PALLÁS et al., 2011).

Outra investigação importante que recebe destaque na comunidade científica é a busca de substâncias e/ou terapias que mimetizem a RC. O uso de moléculas com capacidade antioxidante vem sendo estudado com este objetivo. A cianobactéria *Spirulina platensis* devido seus componentes moleculares vem sendo relatada por atenuar os efeitos do estresse oxidativo (BELAY, 2002; KHAN et al., 2005). O efeito antioxidante deve-se principalmente à *ficocianina*, seu principal pigmento (BHAT,

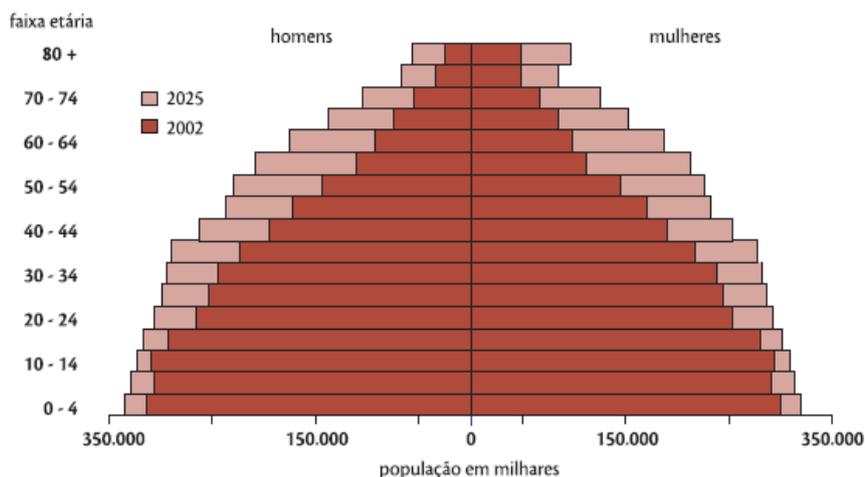
MADYASTHA, 2001; GUARIENTI, BERTOLIN e COSTA, 2010). A ficocianina apresenta propriedades nutricionais e funcionais e tem sido utilizada em diferentes modelos experimentais, corroborando com resultados efetivos na inibição da replicação de alguns vírus, no tratamento de cânceres, nas dislipidemias e diabetes, como antiinflamatório e como redutor de peso. Vários estudos têm sido realizados evidenciando os efeitos terapêuticos da ficocianina, que incluem sua utilização na redução da hipercolesterolemia em roedores (BERTOLIN et al., 2009; DENG e CHOW, 2010), na prevenção de alguns tipos de cânceres (HIRAHASHI et al., 2002), como antiinflamatório (SHIH et al., 2009; DENG e CHOW, 2010), e melhora do sistema imunológico (ESTRADA, BESCOS e FRESNO, 2001; BERTOLIN et al., 2009).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou analisar o papel da ficocianina e da restrição calórica em sinergismo e de forma não sinérgica no envelhecimento cronológico celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental de células eucarióticas. Teve como objetivo secundário avaliar o papel da ficocianina e da restrição calórica na peroxidação lipídica da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para tanto, utilizou-se cepas controle e deletadas ao gene *sir* (*sir 1*, *sir 2*, *sir 3* e *sir4*).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. ENVELHECIMENTO

O envelhecimento populacional é um fenômeno global e de acordo com a Organização Mundial da Saúde, até 2050 haverá dois bilhões de idosos, sendo 80 % nos países em desenvolvimento. Entre 1950 e 2025, a população brasileira acima de 60 anos crescerá 16 vezes (Figura 1), enquanto a população geral sofrerá aumento de cinco vezes (SCAZUFCA et al., 2002; STELLA et al., 2002; WHO, 2005; FILIPPSEN, et al. 2008; MONTAGNER e COSTA, 2009).



Fonte: Opas/OMS, 2005

Figura 1 - Comparativo da população mundial em 2002 e 2025.

Uma das maiores mudanças observadas no século XX foi o aumento da longevidade do ser humano, sendo que hoje a expectativa de vida equivale a quase o dobro da idade alcançada no início do século (WHO, 2005).

O envelhecimento é um fenômeno biopsicossocial que atinge o homem e sua existência na sociedade, manifestando-se em todos os domínios da vida (FILIPPSEN et al., 2008). Como processo biológico está associado a mudanças na atividade das células, tecidos e órgãos, como também com a redução da eficácia de um conjunto de sistemas

fisiológicos, caracterizando uma perda funcional progressiva. Este é um fator de morbidade e fragilidade física ou mental que provoca uma vulnerabilidade perante a sua fisiologia e o ambiente, tornando o indivíduo idoso mais suscetível a doenças crônicas. (ALMEIDA, 2007; FILIPSEN et al., 2008; REBELATTO et al., 2008).

Além das alterações biológicas normais do envelhecimento, a senescência está associada ao aparecimento de doenças infecciosas, crônicas, neurodegenerativas e cardiovasculares. O desenvolvimento de tais patologias tem sido associado também ao declínio do funcionamento fisiológico podendo levar a uma diminuição na reprodução e um aumento na mortalidade com a idade. De forma geral, o envelhecimento induz menores respostas imunes comparadas às observadas em adultos jovens (BONSALL, 2005; NOVAES et al., 2005; MOTA et al., 2009).

O entendimento dos mecanismos pelos quais acontece o envelhecimento ainda é um dos grandes problemas a serem resolvidos pela biologia moderna, devido ao fato de ser um processo complexo que envolve tipos diferentes de células e interações celulares. A compreensão deste fenômeno ultrapassa pelo conhecimento dos mecanismos biológicos específicos subjacentes a estes desequilíbrios. O estudo desse processo tem gerado um grande número de teorias e uma vasta literatura (MOTA, FIGUEIREDO e DUARTE, 2004; FERREIRA, RODRIGUES e PAIVA, 2008).

Estudos realizados com diferentes modelos experimentais como leveduras, *Drosophila* e ratos têm permitido a identificação de alguns processos que contribuem ao fenótipo de envelhecimento. Porém, o uso de modelos experimentais empregando animais de laboratório é, em geral, de difícil execução. Os ensaios com microrganismos permitem utilizar um grande número de células com as mesmas características genéticas. Por estas razões, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* caracteriza-se como um prático modelo do sistema eucariótico unicelular para estudos do processo do envelhecimento humano.

2.2. LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são microrganismos eucarióticos unicelulares e normalmente se reproduzem por divisões mitóticas através de brotamento ou gemulação. Esses organismos são encontrados nos vegetais, no solo, no homem, nos insetos e na água.

Os ensaios realizados com microrganismos são de relativa facilidade e rapidez, e podem utilizar um grande número de células com as mesmas características genéticas. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* permite estudar a longevidade, quando a avaliação desta pode ser realizada pela medida da sobrevivência de células tratadas com compostos antioxidantes (GUARIENTI, BERTOLIN e COSTA, 2010).

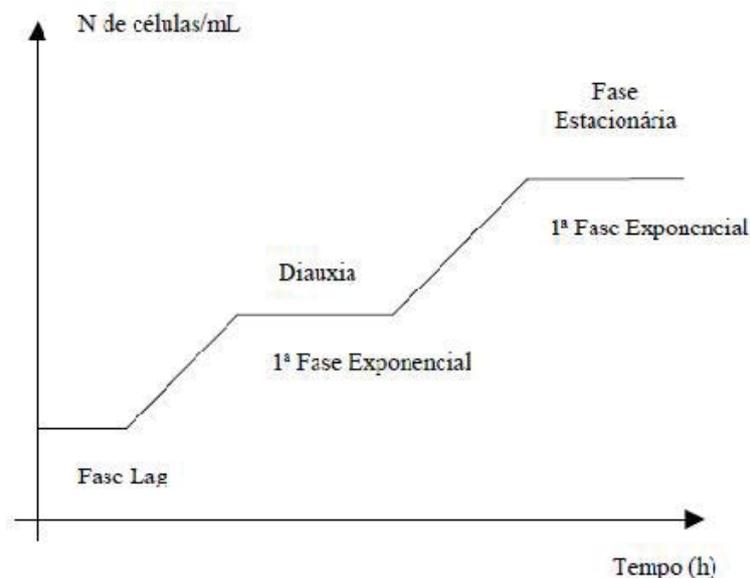
Este modelo é bastante utilizado para estudos de complexos fenômenos de biologia celular, molecular, bioquímica e fisiologia das células eucarióticas. As semelhanças das células de *Saccharomyces cerevisiae* com as células animais, tanto ao nível de suas organelas quanto também de suas biomoléculas, podem ser constatadas pelo fato de que proteínas deste microrganismo tem se mostrado funcionalmente capazes de substituir proteínas ortólogas humanas (PEREIRA, 2003).

Os estudos em células eucarióticas possibilitam a compreensão dos mecanismos moleculares do envelhecimento pela identificação de fatores que modificam a longevidade (FABRÍZIO e LONGO, 2003; SOARES, ANDREAZZA e SALVADOR, 2005; PIPER, 2006; MANNARINO et al., 2008; KAEBERLEIN, 2010). A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sob o ponto de vista genético e metabólico, é um dos organismos mais utilizados em testes biológicos (HENRIQUES, 2001).

As células de leveduras possuem dois tipos de metabolismo dependentes da disponibilidade de nutrientes. Na presença de glicose, as leveduras apresentam um metabolismo fermentativo, tendo parte de seu sistema respiratório inibido por repressão catabólica provocada pelo açúcar (IZAWA, INOUE e KIMURA, 1995). Quando presentes outras fontes de carbono não fermentáveis, como o etanol, as leveduras respiram e, conseqüentemente, ativam o seu sistema de defesa antioxidante para lidar com as espécies reativas de oxigênio (ERO) que passam a ser produzidos nesse processo (MANNARINO, 2005).

No início do crescimento, as células de levedura passam por um período de adaptação, conhecido como fase lag. Estas células possuem também duas fases

exponenciais quando estão crescendo em glicose como fonte de carbono. Na fase exponencial do crescimento, as células usam glicose para produção de energia através da via glicolítica, ocorrendo a fermentação e a repressão do metabolismo oxidativo (MATHIAS, 2008). Com o esgotamento da glicose, as células entram na diáuxia, uma segunda fase de adaptação, sem crescimento, em que as células se adaptam para usar o etanol – principal produto da fermentação – como fonte de carbono. Durante esta fase ocorre a produção de componentes da cadeia de transporte de elétrons e enzimas do ciclo de Krebs, necessárias para que as células voltem a crescer, se o oxigênio estiver disponível. Portanto, após a fase diáuxica, células de levedura modificam seu metabolismo de fermentativo para oxidativo. Uma vez esgotado o etanol ou outro nutriente essencial, as células de levedura entram em fase estacionária do crescimento, não há mais divisão celular e a taxa metabólica diminui (LONGO et al., 1996). As fases de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em glicose estão ilustradas na Figura 2.



Relação entre o crescimento da levedura em mg / mL e o tempo.

Figura 2 - Fases do Crescimento em Glicose da Levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Diversos trabalhos descrevem que o processo de envelhecimento está, de alguma forma, ligado à geração ou à capacidade das células de eliminarem EROs. Portanto ao se tratar células crescendo exponencialmente em glicose (células de metabolismo fermentativo que são sensíveis ao estresse oxidativo) com baixas concentrações de oxidantes pode-se gerar alguma resposta positiva em termos de aumento de longevidade, tendo em vista que tais tratamentos promovem uma alteração na expressão gênica, exercendo forte influência nos níveis da defesa antioxidante e das proteínas de estresse, tais como os chaperonas moleculares e proteases (GASCH et al., 2000).

A ocorrência das EROs é uma consequência natural do metabolismo aeróbico. A formação desses radicais relaciona-se diretamente com os efeitos deletérios do estresse oxidativo (EO) (AMES, SHIGENAGA e HAGEN, 1993; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004; MOTA, FIGUEIREDO e DUARTE, 2004; ANTUNES-NETO; SILVA e MACEDO, 2005; HALLIWELL, 2007). O EO ocorre a partir de um desequilíbrio entre a formação e a destoxificação das EROS, podendo ocorrer tanto pelo aumento na formação dessas quanto pela redução da capacidade antioxidante celular, (SAMPAIO e MORAES, 2010). Este processo leva a uma potencial lesão tecidual, a qual pode ser responsável à patogênese de diversas doenças crônicas, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, neoplasias, diabetes (SOARES; ANDREAZZA e SALVADOR, 2005; GENARO, SARKIS, MARTINI, 2009; BARJA, 2004; AFANAS, 2005; LOPES, OLIVEIRA e FORTUNATO, 2008; COSTA et al., 2011), doenças hepáticas (LIMA e ABDALLA, 2001) e doenças crônicas, entre elas, as doenças auto-imunes (VASCONCELOS et al., 2007).

2.3. RADICAIS LIVRES NO ENVELHECIMENTO

As teorias biológicas do envelhecimento ressaltam a degeneração da função e estrutura dos sistemas orgânicos e células. De forma geral, podem ser classificadas em duas categorias: as de natureza *genético-desenvolvimentista* e as de natureza *estocástica* (FARINATTI, 2002). Dentre as teorias gerais, o que se verifica é que as assertivas e hipóteses envolvem a influência do processo oxidativo no envelhecimento celular. Harman (1956), propunha que o envelhecimento estaria associado com moléculas

produzidas no metabolismo oxidativo, denominadas *radicais livres de oxigênio* (RL) (FARINATTI, 2002; MOTA, FIGUEIREDO e DUARTE, 2004, REBELATTO et al., 2008).

Denham Harman desenvolveu a teoria de que os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio estariam envolvidos no processo de envelhecimento, sugerindo que provocariam dano celular, resultando em aceleração de disfunções, levando ao envelhecimento celular (ALMEIDA, 2007; MONTAGNER e COSTA, 2009; SAMPAIO e MORAES, 2010). Segundo Dröge (2002), Harman também afirmara que os radicais livres poderiam ser responsáveis, além dos danos celulares, por mutagêneses, cânceres, e por último, porém não menos importante, o processo degenerativo do envelhecimento biológico.

Dentre as principais hipóteses estudadas na última década, tem-se o envelhecimento resultante da acumulação de macromoléculas danificadas pelo estresse oxidativo. O principal local para que ocorra este dano é a mitocôndria, a qual desempenha um papel importante em uma variedade de processos celulares, incluindo a produção de ATP, metabolismo catabólico e apoptose (LÓPEZ-LLUCH et al., 2005; BONA WITZ, RODEHEFFER e SHADEL, 2006; LEADSHAM et al., 2010).

A geração das EROs pode ocorrer no citoplasma, nas mitocôndrias e principalmente na membrana. O seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) tem relação com seu sítio de formação (BIANCHI e ANTUNES, 1999; SHAMI e MOREIRA, 2004; SAMPAIO e MORAES, 2010)

A membrana plasmática é mais suscetível a ação das ERO em relação aos demais componentes celulares, por ser mais atingida pela peroxidação lipídica, acarretando alteração na estrutura e permeabilidade das membranas celulares (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SOARES et al., 2002, ANTUNES-NETO, SILVA e MACEDO, 2005).

2.3.1. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Um dos principais mecanismos de lesão causada pelo estresse oxidativo é a oxidação da camada lipídica da membrana celular, a lipoperoxidação (LPO). Este processo provoca alterações estruturais e funcionais da membrana, como principalmente a sua perda de integridade, permeabilidade e fluidez, podendo levar à morte celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004; ANTUNES-NETO, SILVA e MACEDO, 2005; SAMPAIO e MORAES, 2010).

Os lipídios quando oxidados possuem alta capacidade de gerar RL, uma vez que a peroxidação lipídica é a reação do oxigênio molecular com lipídios insaturados. Esta reação de oxidação ocorre devido a fatores ambientais ou pela ação enzimática - pela catalisação de enzimas lipoxigenases ou pelos RL formados nos processos metabólicos (ARAÚJO, 2004).

A partir disso, ocorrem alterações nas membranas celulares, alterando a permeabilidade, resultando na perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído (MDA), culminando com a morte celular (LIMA e ABDALLA, 2001; LEHNINGER; NELSON e COX, 2002). A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (HARMAN, 1981; SHIGENAGA, HAGEN e AMES, 1994; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Os produtos resultantes da peroxidação lipídica são parâmetros importantes para o monitoramento do dano causado por ERO em lipídeos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS et al., 2007). Esses são instáveis e se degradam em vários produtos secundários como o MDA. Os níveis de MDA são largamente utilizados como marcadores da peroxidação lipídica nos estados de estresse oxidativo (DRAPER et al., 1993; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; YILDIRIM et al., 2007)

O processo de reparo das lesões está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas (BIANCHI e ANTUNES, 1999). Os estudos com antioxidantes têm evidenciado benefícios no uso de

nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças relacionadas ao envelhecimento (BIANCHI e ANTUNES, 1999; MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2004; VASCONCELOS et al., 2007; DANI et al., 2010). Estes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células dificultando o ataque das espécies reativas sobre os lipídeos (BIANCHI e ANTUNES, 1999). No entanto, o efeito deletério deste processo varia de um organismo para outro, de acordo com a idade, estado fisiológico e a dieta (HALLIWELL, 2007; BERTOLIN et al., 2009).

Na atualidade, o interesse pelo desenvolvimento de terapias anti envelhecimento vem crescendo exponencialmente. Contudo muitas contribuições nessa linha de pesquisa ainda se fazem necessárias. Percebe-se a partir de estudos já existentes, que a dieta sob restrição calórica contribui com a longevidade, em razão da menor geração de EROs. A dieta sob RC tem sido relatada por diversos autores, contribuindo com a diminuição do processo do envelhecimento (BERTOLIN, FURLONG e COSTA, 2006). O uso de compostos naturais e suplementos alimentares também têm sido alvo de muitos estudos com relatos de que estes agem de forma benéfica em muitos sistemas biológicos (ESTRADA, BESCÓS e FRESNO, 2001; COSTA et al., 2011).

2.4. RESTRIÇÃO CALÓRICA

A RC refere-se à redução na ingestão de calorias, sem deficiências de nutrientes essenciais (KOUBOVA e GUARENTE, 2003; GENARO, SARKIS e MARTINI, 2009). Em 1930, McCay e colaboradores observaram pela primeira vez que a RC poderia ter impacto sobre tempo de vida em roedores (McCAY, CROWEL e MAYNARD, 1935). Desde então, muitos estudos surgiram mostrando que a RC retarda os efeitos do envelhecimento em outros modelos experimentais como leveduras, moscas, peixes e ratos (HOLLOSZY e FONTANA, 2007).

Na última década a pesquisa sobre o envelhecimento identificou importantes vias metabólicas que podem contribuir para a longevidade. Determinantes genéticos foram encontrados principalmente em espécies eucarióticas (KAEBERLEIN e

KENNEDY, 2005; SMITH et al., 2007; GENARO, SARKIS e MARTINI, 2009; KAEBERLEIN, 2010; BUHLER e GASSER, 2009 GUARENTE, 2011). A redução tanto de glicose ou das concentrações de aminoácidos, ou ambos, pode retardar os efeitos do envelhecimento ou aumentar a expectativa de vida replicativa e cronológica. Este paradigma de restrição de nutrientes tem sido referido com a RC, atenuando os efeitos do envelhecimento em organismos como leveduras, vermes, moscas e roedores (KOUBOVA e GUARENTE, 2003; KAEBERLEIN, BURTNER e KENNEDY, 2007, KAEBERLEIN, 2010). De forma geral, este protocolo de restrição alimentar é bastante utilizado em leveduras (GENARO, SARKIS e MARTINI, 2009; KAEBERLEIN, 2010).

Em primatas, o efeito da RC prolongada está sob investigação (HEILBRONN et al., 2006). Em 2009, Colman e colaboradores, descobriram a prova que faltava em estudos com RC com primatas. Foi evidenciado que o modelo de RC pode beneficiar também seres humanos em se tratando de uma vida mais longa e vigorosa (COLMAN et al., 2009).

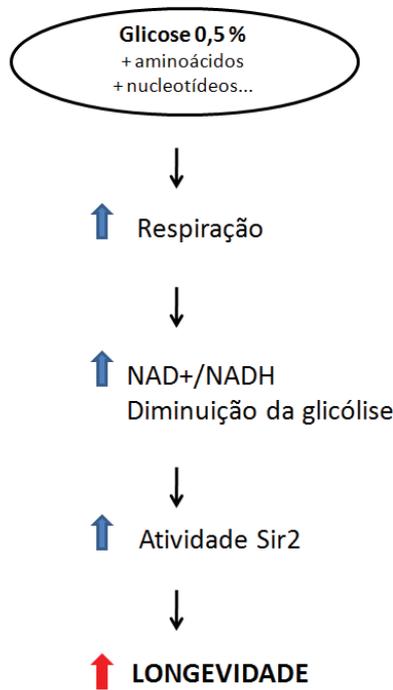
Uma hipótese para explicar os efeitos da RC na longevidade é a redução do gasto de energia com consequente aumento na produção de EROs (HEILBRONN et al., 2006; COLMAN et al., 2009). Alguns autores (Sohal e Weindruch, 1996; Mannarino et al., 2008; Mannarino et al., 2011) apresentam que a RC pode prorrogar o tempo de vida, devido a resistência às espécies reativas de oxigênio e a diminuição da produção destas espécies. Fontana, Partridge e Longo (2010) citam que a redução do consumo alimentar em leveduras e roedores, propicia uma vida útil mais longa e ainda a proteção contra diabetes, câncer, doença cardiovascular. Em seres humanos pode provocar mudanças que protegem de efeitos decorrentes de patologias relacionadas à idade.

A via de sinalização importante encontrada em células eucariótica é mediada pela indução de um gene chamado *silent information regulator* (*sir2* em leveduras e *sir1* em mamíferos) que codifica a enzima histona desacetilase, dependente de nicotinamida dinucleotídeo adenina (NAD⁺) (FONTANA, PARTRIDGE e LONGO, 2010; EVANS et al. 2010). Alguns achados demonstram que os mecanismos moleculares pelos quais a RC retarda o envelhecimento vêm sendo associados com a ativação da família da proteína *sir2* e a modulação das vias de sinalização de nutrientes (SOHAL E

WEINDRUCH, 1996; HOWITZ, et al., 2003; MANNARINO et al, 2008; MANNARINO et al. 2011).

A hipótese das sirtuínas, homólogas do *sir2* serem mediadoras dos efeitos da RC, foi baseada diretamente pela descoberta de que a atividade enzimática de todas as sirtuínas são dependentes do NAD⁺ (ANDERSON et al, 2003; LIN et al, 2004). Uma vez que reduzido, forma a molécula NADH, inibidor competitivo da sirtuína. Sugere-se que um aumento no NAD⁺ em proporção ao NADH, impulsionada por uma mudança no metabolismo oxidativo, poderia ser responsável por um aumento da atividade da sirtuína, e, posteriormente o prolongamento da vida em leveduras submetidas à restrição calórica (Figura 3) (KOUBOVA e GUARENTE, 2003; LIN et al., 2004; BORDONE e GUARENTE, 2005; BAUR, 2010).

As proteínas *sir2* podem através da RC regular a longevidade, aumentando níveis de NAD disponível. A atividade do gene *sir2* provavelmente é elevada, resultando em maior silenciamento e como consequência, uma vida mais longa, sendo que a superexpressão do gene resulta em prolongamento da longevidade (GUARENTE, 2000; FABRÍZIO e LONGO, 2003; KAEBERLEIN et al., 2004; ALMEIDA, 2007; HERRANZ e SERRANO, 2010; UNNIKRIISHNAN, GAFKEN e TSUKIYAMA, 2010), enquanto a supressão da *sir2* diminui o tempo de vida útil (LIN et al., 2002; KABERLEIN, 2010).



Fonte: Adaptado de Koubova e Guarente, 2003.

Figura 3 - Mecanismo de ativação do gene *sir2* através da restrição calórica.

Mamíferos têm sete homólogos de sirtuínas que realizam funções na adaptação fisiológica humana a estressores ambientais, tais como a escassez de alimentos. Pequenas moléculas foram identificadas por supostamente inibir, assim como ativar sirtuínas *in vivo* e *in vitro* (GUARENTE, 2011).

As sirtuínas têm papel importante na regulação do metabolismo e possuem funções especializadas para atender a complexidade do organismo, o que pode ser evidenciado pela diferente localização das sirtuínas em mamíferos: *sir1* e *sir6* encontradas no nucleoplasma; *sir7*, no nucléolo; *sir2*, no citoplasma; *sir3*, mitocôndrias e núcleo; *sir4* e *sir5*, na mitocôndria (BAUR, 2010).

Em 1997, Sinclair e Guarente, demonstraram que uma das causas do envelhecimento em levedura é o acúmulo de espécies DNA ribossomal (SINCLAIR e GUARENTE, 1997).

Embora o silenciamento de DNA ribossomal é uma característica do envelhecimento em leveduras, em determinadas regiões do genoma, é mediado pelo *sir2*, o qual faz parte de um complexo de proteínas. O papel dos produtos relacionados com gene *sir2* no envelhecimento parece ser universal. Sirtuínas ortólogas do *sir2* têm mostrado o retardo envelhecimento em nematóides *Caenorhabditis elegans*, na *Drosophila melanogaster* e em camundongos (KABERLEIN, 1999; TISSENBAUM E GUARENTE, 2010; GUARENTE, 2011).

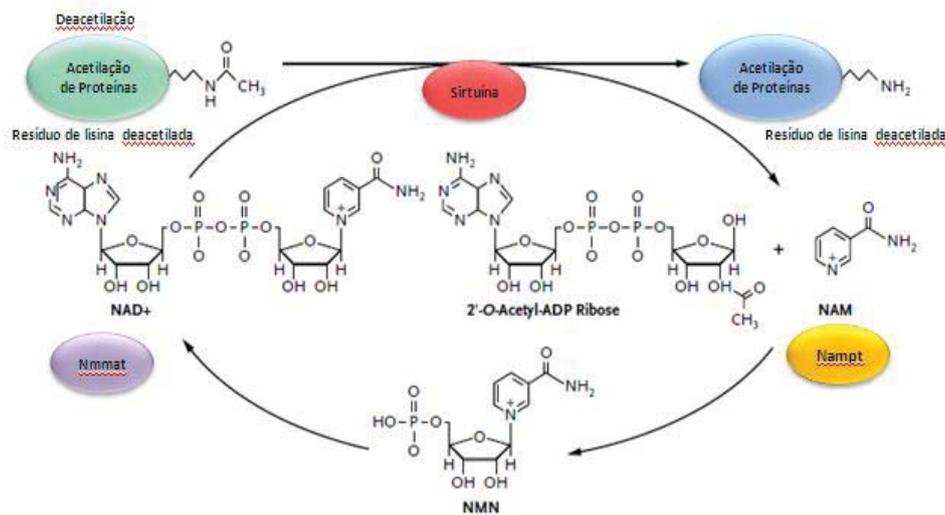
O envelhecimento e outros processos de desenvolvimento, tais como apoptose, diferenciação e gametogênese, associam características epigenéticas a alterações celulares, incluindo a metilação do DNA e modificação de histonas. Embora as sirtuínas promovam a longevidade em leveduras, vermes e moscas, as vias de conservação de para sirtuínas na regulação do envelhecimento permanecem controversos (DANG et al., 2009, HU et al., 2011).

Em *Saccharomyces cerevisiae* a enzima deacetilase da família *sir2* atua no silenciamento e na cromatina (MICHISHITA et al, 2008). Em adição, é regulador importante do ciclo de vida e resistência ao estresse (HICKMAN e RUSCHE, 2009). Em revisão, Kenyon (2010) cita que a *sir2* prolonga a vida através da manutenção de silenciamento gênico em telômeros durante o envelhecimento. Cepas de levedura com níveis anormais da proteína *sir2* mostraram defeitos em várias funções celulares, incluindo a transcrição e recombinação do silenciamento, senescência e reparo do DNA (YAMAMOTO, SCHOONJANS e AUWERX, 2007).

Os telômeros têm sido vistos como determinantes do envelhecimento por encurtar com o passar da idade. Ratos projetados para ter telômeros mais longos, vivem por mais tempo. A extensão da vida útil mediada pelos telômeros, restrição alimentar, perturbações em sensores de nutrientes e respiração reduzida podem inibir a formação de tumores (KENYON, 2005). Essas descobertas sugerem que o alongamento do telômero pode não só aumentar a longevidade, como conduzir o animal em um estado

de proteção fisiológica. Estudos na área do envelhecimento buscam saber se o tempo de vida estendido, com ausência de câncer, poderia ser influenciado pela combinação de alongamento do telômeros com a restrição alimentar ou mutações em sensores de nutrientes (KENYON, 2010).

A atividade deacetilase NAD-dependentes de *sir2* é essencial para a repressão dos telômeros, enquanto *sir3* e *sir4* atuam como componentes estruturais (BUCHBERGER et al., 2008; SCHOEFTNER e BLASCO, 2009). As sirtuínas estão relacionadas com a atividade deacetilase de proteínas, que é associada com a divisão do NAD durante cada ciclo de deacetilação (Figura 4) (GUARENTE, 2011).



A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) dependente da deacetilação de lisina de um substrato de proteínas por sirtuínas, em que a nicotinamida (NAM) e o acetil-ADP ribose também são gerados. A NAM pode ser resintetizada e retornar ao NAD pela enzima Nampt que gera o mononucleotídeo nicotinamida intermediária (NMN) e Nmnat, o que gera o NAD+

Fonte: Adaptado de Guarente, 2011.

Figura 4 - Atividade enzimática das sirtuínas.

Os níveis de acetilação das proteínas histonas são alterados durante o envelhecimento e essas mudanças contribuem diretamente para o processo. Em adição, as deacetilases, incluindo a classe das sirtuínas, são alvo tanto de histonas como de proteínas não histonas. Em células de mamíferos a *sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir6* deacetilam

histonas. Alguns desses genes são candidatos promissores em vias de envelhecimento (DANG et al., 2009, GUARENTE et al., 2011).

Um número crescente de proteínas não-histonas também são desacetiladas pela sirtuínas, expandindo suas funções biológicas. Os substratos de proteínas não-histonas incluem vários reguladores transcricionais, tais como o *nuclear factor kappaB* (NF- κ B), fatores de transcrição (FOXO) e do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR γ) e seu coativador (PGC-1 α) (KABERLEIN e KENNEDY, 2005; BORDONE et al., 2007; HAIGIS e SINCLAIR, 2010; FADINI et al., 2011), enzimas como a acetil coenzima A sintetase (CoA), acetil coenzima A sintetase 2 (AceCS2), e proteínas estruturais como tubulina. Em revisão, Genaro, Sarkis e Martini (2009) afirmam que o Nf- κ B é responsável pela ativação dos genes próinflamatórios contribuindo para os danos oxidativos. A RC parece promover redução nesses danos, através da supressão da expressão e da ativação do NF- κ B.

Enquanto que o papel das sirtuínas em mamíferos na regulação da expectativa de vida não está determinado, evidências sugerem que o ortólogo da *sir2*, pode regular processos fisiológicos afetados durante o envelhecimento e podem ser alteados pela RC. A *sir1* e seus substratos podem afetar a resistência ao estresse em células, que pode estar relacionada com a RC (COHEN et al., 2004; HAIGIS e GUARENTE, 2006; KEBERLEIN e KENNEDY, 2005).

Em mamíferos, das três sirtuínas (*sir1*, *sir6* e *sir7*) localizadas no núcleo, a *sir1* é estudada com maior frequência. Possui vários substratos conhecidos e apresenta efeito protetor contra o estresse oxidativo e danos do DNA. Além disso, a *sir1* desempenha papel proeminente nos tecidos metabólicos, tais como pâncreas, fígado e adiposidade (HAIGIS e GUARENTE, 2006). Embora não seja especificamente associada com mitocôndrias, demonstra influencia nas suas funções como resposta ao estresse oxidativo e envelhecimento. Evidências crescentes relacionam sirtuínas mitocondriais com o uso de energia e o tempo de vida em humanos (HAIGIS e GUARENTE, 2006).

A primeira sirtuína demonstrada por ser localizada na mitocôndria foi a *sir3* (MICHISHITA et al, 2005), a qual está localizada na matriz mitocondrial e sua clivagem seqüencial é necessária para a atividade enzimática.

Estudos buscando elucidar esses mecanismos têm avaliado os efeitos benéficos de compostos antioxidantes, visto que a relação entre antioxidantes, envelhecimento e algumas doenças degenerativas tem sido demonstrada em humanos. Em estudos com antioxidantes em leveduras, descobriu-se que o resveratrol age como simulador da restrição calórica, estimulando o gene *sir2* e aumentando, desta forma, a estabilidade do DNA prolongando o tempo de vida da levedura em 70% (KABERLEIN et al., 2005; BARGER et al., 2008). Compostos funcionais podem constituir uma ferramenta importante que pode ser usada para estudar as vias envolvidas no reconhecimento e na reparação destas lesões (PÁDULA e BOITEUX, 1999).

2.4.1. FICOCIANINA

A ficocianina é principal pigmento da cianobactéria *Spirulina platensis* (ANDRADE e COSTA, 2008). O interesse em recursos biológicos, em especial as algas, como fontes de substâncias antioxidantes vem crescendo de maneira significativa. Os estudos mostram que as algas como peptídeos de polissacarídeos e ficobiliproteínas podem interferir na multiplicação de tumores (LIU et al., 2000).

Ambrosi et al. (2008) mostraram que a microalga pode ser utilizada como alimento pelo homem devido a sua composição química que apresenta elevada quantidade e quantidade de aminoácidos essenciais, minerais, ácidos graxos poliinsaturados e vitaminas. Possui grande quantidade de compostos fenólicos, tocoferol e pigmentos como carotenóides, ficocianina e clorofila (AMBROSI et al., 2011; SIXABELA et al., 2011)

A cianobactéria apresenta características que sugerem aplicações clínicas, conferindo efeitos terapêuticos em pacientes acometidos de diversas patologias (RICHMOND, 1990; GUARENTI, BERTOLIN e COSTA, 2010). Estudos clínicos e epidemiológicos estabeleceram uma relação inversa entre a ingestão de compostos antioxidantes e a incidência de doenças crônico degenerativas, epidemiológico, como as cardiovasculares (BELAY, 1993) além de apresentar-se como estimulante ao sistema imunológico (RICHMOND, 1990; AMBROSI et al., 2008; HENRIKSON, 1995; ANDREWS et al., 2010).

Os compostos extraídos de microalgas como a *Spirulina platensis* são reconhecidos mundialmente devido ao seu uso na alimentação humana e como alimentos funcionais e nutracêuticos (BERTOLIN et al., 2009; PARISI et al., 2009).

Em muitos países é utilizado como suplemento alimentar (BELAY, 1993; ANDRADE e COSTA, 2008), devido ao seu potencial nutracêutico e anti-inflamatório (SHIH et al., 2009; AS et al., 2010; PATEL et al., 2006; DENG e CHOW, 2010), antibacteriano (OZDEMIR et al., 2004), no perfil lipídico (BELAY, 1993; RISS, et al., 2007; COLLA, BAISH e COSTA, 2008; BERTOLIN et al., 2009), neuroprotetor e anti-estressor, observados em diferentes modelos experimentais (SHIH et al., 2009; THAKUR e SRAVANTHI, 2010), na prevenção de certos tipos de cânceres (LIU et al., 2000; HIRAHASHI et al., 2002; ROY et al., 1996) e antioxidante (ROMAY, REMÍREZ, e GONZÁLEZ, 2001; BERTOLIN et al., 2009; GUARIENTI, BERTOLIN e COSTA, 2010; DENG e CHOW, 2010).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. LOCAL DO EXPERIMENTO

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Alimentos e de Bioprocessos do Curso de Engenharia de Alimentos da UPF e no Laboratório de Investigação de Fatores de Estresse, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

3.2. MODELO EXPERIMENTAL

Foram utilizadas cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* deletadas, ou não, para os genes *sir*. As cepas foram obtidas da companhia *Euroscarf*, Frankfurt, Alemanha. A Tabela 1 apresenta os genótipos e os fenótipos, de cada cepa utilizada em nossos experimentos.

Tabela 1 - Cepas de leveduras obtidas da companhia *Euroscarf*, Frankfurt, Alemanha

Cepas	Genótipos	Fenótipos
BY4741	MAT A; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0	Controle
<i>sir1</i>	Isogênica a BY4741 exceto o gene <i>sir1::kMX4</i>	Deletada ao gene <i>sir1</i>
<i>sir2</i>	Isogênica a BY4741 exceto o gene <i>sir2::kMX4</i>	Deletada ao gene <i>sir2</i>
<i>sir3</i>	Isogênica a BY4741 exceto o gene <i>sir3::kMX4</i>	Deletada ao gene <i>sir3</i>
<i>sir4</i>	Isogênica a BY4741 exceto o gene <i>sir4::kMX4</i>	Deletada ao gene <i>sir4</i>

As linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram mantidas em meio YPD (yeast, peptona e dextrose) 2 % sólido (2 % de glicose, 2 % de peptona, 1 % extrato de levedura e 2 % de ágar) (SHERMAN et al., 1979) sob refrigeração a 4 °C. A manutenção dos micro-organismos foi realizada através de repiques periódicos em meio YPD 2 % glicose. As cepas mutantes foram obtidas a partir da inserção do gene de resistência a geneticina (*kanMX4*) no gene de interesse. Desta forma o gene alvo é interrompido e para que a pressão seletiva fosse mantida adicionou-se 0,02 % de

geneticina no meio YPD 2 % glicose. A Tabela 2 apresenta os tratamentos e as respectivas condições de cultivo.

Tabela 2 - Tratamentos e suas condições de cultivo

Meios de cultivo	Tratamentos
2 % glicose	Padrão (P)
2 % glicose + FC	Padrão + Ficocianina (P + FC)
0,5 % glicose	Restrição Calórica (RC)

3.3. MEIOS DE CULTIVO

As células retiradas de um repique fresco em meio sólido YPD 2 %, foram cultivadas em erlenmeyers contendo 20 % do seu volume preenchido por meio YPD 2 % (2 % glicose, 2 % peptona, 1 % extrato de levedura) ou YPD 0,5 % (0,5 % glicose, 2 % peptona, 1 % extrato de levedura) a 28 °C e 160 rpm até a primeira fase exponencial de crescimento (aproximadamente 0,5 mg de peso seco de células/mL). As células se encontravam em metabolismo fermentativo em YPD 2 % pela repressão catabólica e em metabolismo respiratório no meio YPD 0,5 %.

3.4. EXTRATÉGIA EXPERIMENTAL

A estratégia experimental utilizada no estudo do envelhecimento cronológico pode ser observada no fluxograma ilustrado na Figura 5. As cepas crescidas em 0,5 % de glicose caracterizam o processo de restrição calórica (RC) enquanto que as crescidas em 2 % de glicose se referem ao metabolismo sem restrição calórica (P). A ficocianina (FC) foi acrescida nas células cultivadas em 2 % glicose (P + FC), antes do processo do envelhecimento.

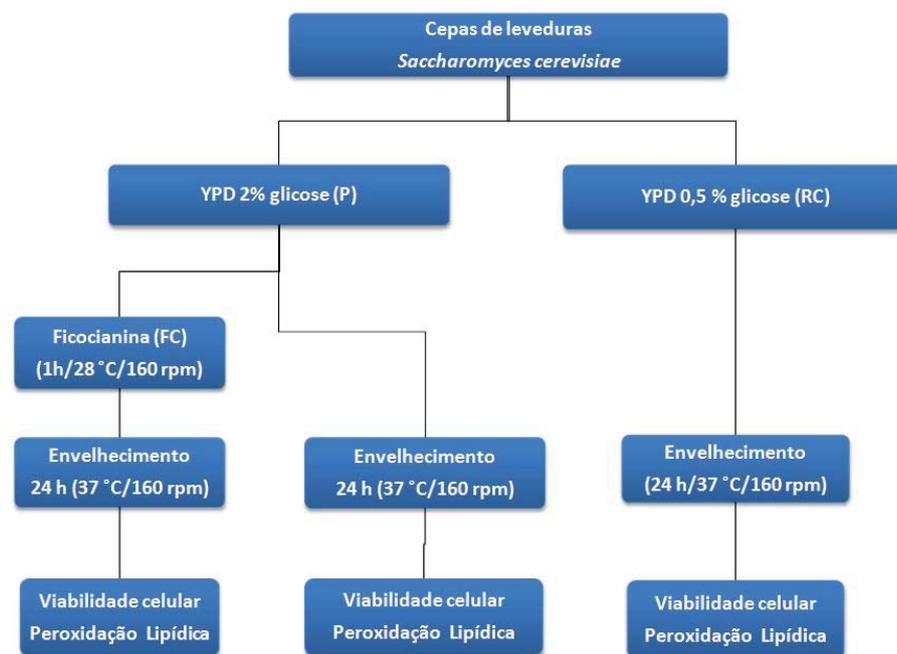


Figura 5 - Estratégia experimental utilizada no estudo do envelhecimento cronológico para os diferentes tratamentos.

3.5. CRESCIMENTO CELULAR

A avaliação do crescimento celular foi determinada por espectrofotometria através da medida da absorbância a 570 nm de uma suspensão de células e convertida em concentração de células (mg de peso seco de células/mL). O fator de conversão em peso seco foi calculado a partir da filtração de um volume adequado da suspensão de células em filtro Millipore (0,45 μm), que posteriormente, foi colocado em estufa a 80 °C até peso constante.

3.6. EXTRAÇÃO DA FICOCIANINA

A ficocianina foi extraída pelo processo de congelamento/descongelamento. Para tanto, foram utilizadas 1 g da microalga *Spirulina platensis* em pó e adicionados

30 mL de água e submetidos à embalagens plásticas com tampa. As suspensões foram submetidas ao processo de ruptura celular por congelamento a 0 °C por cerca de 3 h e após esse período foram conduzidas ao refrigerador para o descongelamento a 4 °C (BERTOLIN et al., 2011).

Os ciclos de congelamento e descongelamento aconteceram de forma sucessiva por 3 vezes. As amostras foram submetidas à centrifugação a 6000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi extraído, sendo este o extrato de ficocianina. Determinou-se a concentração do extrato através de leitura espectrofotométrica (item 4.7). A microalga *Spirulina platensis* foi fornecida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Fundação Universidade Federal de Rio Grande – FURG.

3.7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA FICOCIANINA

A concentração de ficocianina, de acordo com Bennet e Bogorard (1973), foi definida na Equação 1.

$$FC = \frac{DO_{620} - 0,474 (DO_{652})}{5,34} \quad \text{Equação 1.}$$

Onde:

FC = concentração de ficocianina (mg/mL-1);

DO 620 = densidade ótica em 620 nm;

DO 652 = densidade ótica em 652 nm.

A partir de uma solução concentrada de 0,246 mg/mL de ficocianina o volume de 10 mL foi adicionado ao meio de cultivo no momento em que o crescimento celular encontrava-se na primeira fase exponencial (DANI et al., 2008). Foram realizados testes com diferentes concentrações (0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL e 0,01 mg/mL), para tanto, realizou-se diluições adequadas para cada concentração. As células voltaram a ser incubadas por 1 h, a 28 °C / 160 rpm (DANI et al., 2008). Após o tempo de exposição

ao extrato, uma alíquota de 400 µg de peso seco de células foi coletada e transferida para um tubo de 10 mL de água destilada tampão fosfato de sódio 0,05M pH 6 que após diluição apropriada foi plaqueada em triplicatas em meio sólido YPD 2 % (2 % glicose, 2 % peptona, 1 % extrato de levedura, 2 % ágar). As colônias foram contadas após 72 h de crescimento em estufa a 28 °C. O percentual de sobrevivência foi calculado a partir da razão entre o número de colônias obtidas em meio YPD 2 % após e antes da exposição ao extrato (ELEUTHERIO et al., 1993; SILVA et al., 2005; DANI et al., 2008).

Das concentrações estudadas (0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL e 0,01 mg/mL), fez-se a escolha da concentração 0,01 mg/mL, visto que esta não mostrou toxicidade às células submetidas aos diferentes tratamentos. O procedimento foi realizado em triplicata e teve como objetivo verificar a capacidade das células de formar colônias (UFC). Estas análises caracterizaram em nosso estudo, um trabalho preliminar.

3.8. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

Após o crescimento das cepas até a metade da fase exponencial (0,5 - 0,8 mg/mL de peso), as células cultivadas em meio YPD 2 % foram expostas a um volume de 10 mL do extrato, na concentração de 0,01 mg/mL de ficocianina e submetidas a 160 rpm/28 °C, durante 1 h (DANI et al., 2008). Posteriormente, as cepas foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm/5 min e ressuspensas em água destilada. Após lavadas duas vezes, as células foram ressuspensas em água destilada e incubadas por 24h, a 37 °C/160 rpm (para acelerar o envelhecimento das cepas) (MANNARINO et al., 2008). Uma alíquota de 400 µg peso seco de células foi transferida para um tubo de 10 mL de água destilada, que após diluição apropriada, foi plaqueada em triplicatas em meio sólido YPD 2% (2% glicose, 2% peptona, 1 % extrato de levedura, 2% ágar). As colônias foram contadas após 72 h de crescimento em estufa a 28°C. O percentual de sobrevivência foi calculado a partir da razão entre o número de colônias obtidas em meio YPD 2% após e antes de 24 h de envelhecimento celular (MANARINNO, et al., 2008). A velocidade específica do crescimento celular foi calculada através de uma curva de crescimento (item 4.5). A Figura 6 ilustra estas etapas em um fluxograma.

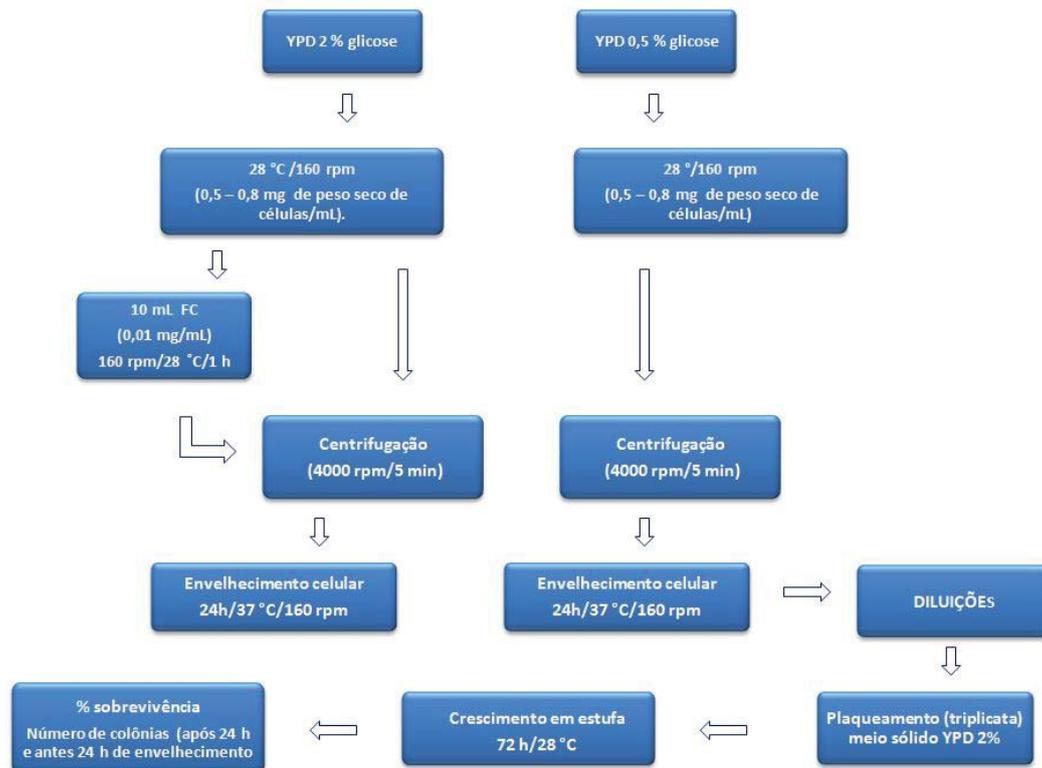


Figura 6 - Sequência de atividades para a análise da viabilidade celular.

3.9. OXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS PELO MÉTODO TBARS

Cerca de 50 mg de células foram recolhidas por centrifugação a 4000 rpm / 5 min antes, após 1 h de exposição a 0,01 mg/mL de ficocianina (160 rpm / 28 °C), e após 24 h de envelhecimento celular. As células foram lavadas duas vezes com água destilada estéril gelada, ressuspensas em 500 µL de ácido tri-cloro acético (TCA) 10 % (1,5 mL TCA 2 M + 3,5 mL de água destilada) e transferidas para tubo de parede grossa. Foram adicionadas 1,5 g de pérolas de vidro e as células rompidas sob agitação vigorosa com 6 ciclos intercalados em 20 segundos no vórtex e 20 segundos no gelo. O extrato foi recolhido em micro tubo e as pérolas de vidro lavadas com 500 µL de TCA 10%, sendo recolhidos no mesmo tubo. Após a lise os extratos passaram por uma centrifugação a 4000 rpm/4 minutos, sendo o sobrenadante coletado e utilizado para as análises de peroxidação lipídica através do método TBARS (STEELS et al., 1994).

O ensaio foi realizado com a mistura reacional contendo 150µL de extrato, 150µL de H₂O, 100µL de EDTA 0,1M e 600µL de ácido tiobarbitúrico 1% em NaOH 0,05M. Também foi preparado um branco reacional contendo 0,3 mL de H₂O sem o extrato celular. A mistura reacional foi incubada a 100 °C por 15 minutos. Os tubos foram resfriados e a absorvância medida por espectrofotometria a 532 nm. A dosagem foi feita em duplicata e os resultados expressos em picomoles de malondialdeído (MDA – produto da peroxidação lipídica) por miligrama de célula (pmoles MDA/mg cel), conforme cálculo apresentado na Equação 2(STEELS et al., 1994):

$$\text{pmoles} \frac{\text{MDA}}{\text{mgCel}} (\text{peso seco}) = \frac{(\text{ABS}_{532} \times 11,5_{\text{nmolesMDA}}) \times 1000}{(\text{ABS}_{570} \times \text{fatorcel.} \times 100) \times 4,9 \times 0,15} \quad \text{Equação 2}$$

O fluxograma apresentado na Figura 7, mostra as etapas da análise de TBARS.

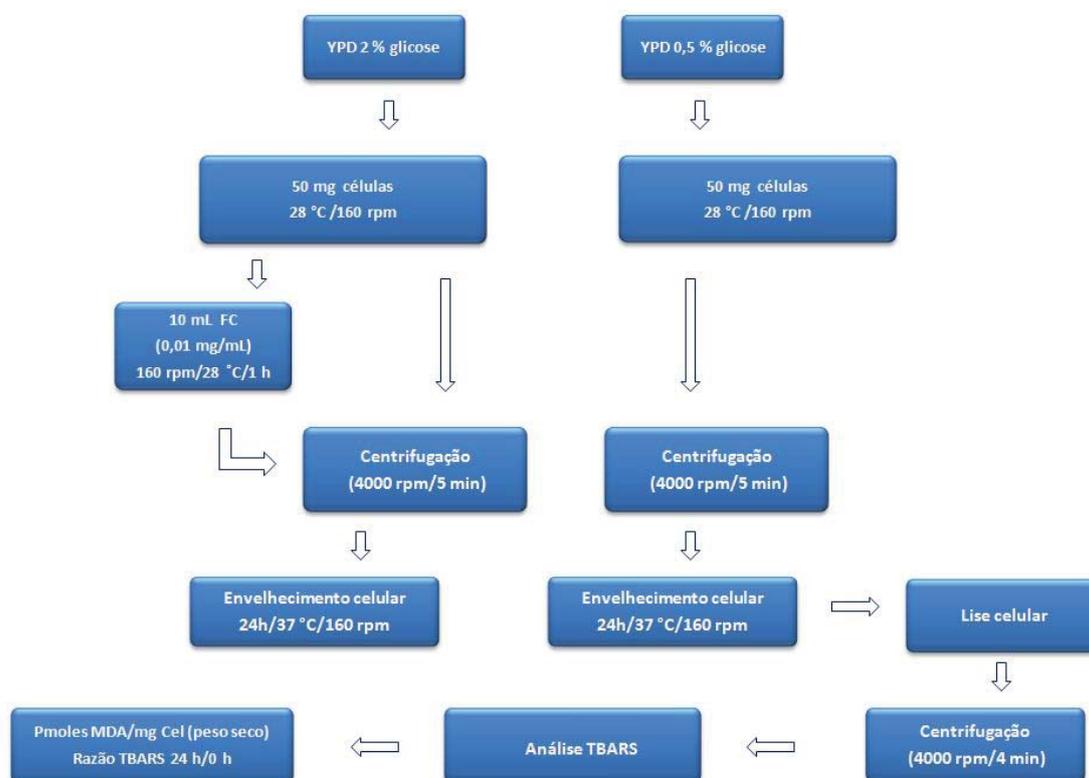


Figura 7 - Sequência de atividades para a análise de TBARS.

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados usando média \pm desvio padrão (ou intervalo interquartilico). Para a comparação entre tratamentos e entre cepas, foi realizada uma Análise de Variância Fatorial 3X5, seguida de comparação múltipla entre médias usando a correção de Bonferroni. Para a análise da relação entre TBARS 24 h/TBARS 0 h, foi usada transformação logarítmica nos dados. Os símbolos indicam médias significativamente diferentes usando a correção de Bonferroni. Uma diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. LONGEVIDADE

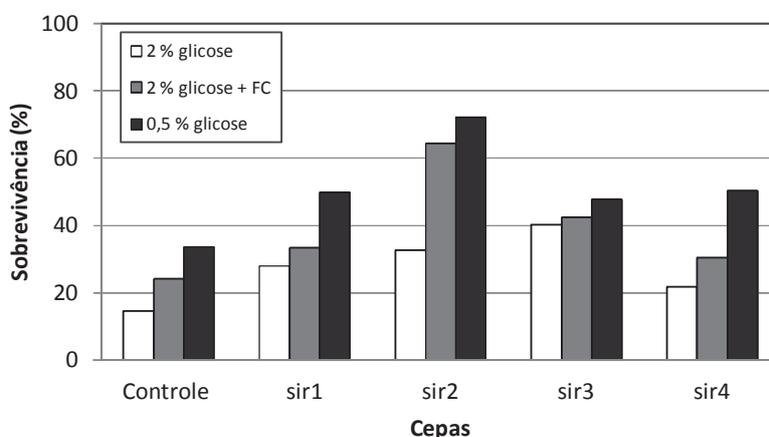
A longevidade celular foi verificada através do percentual de células viáveis (percentual de sobrevivência) após o processo de envelhecimento, conforme descrito no item 4.8. A Tabela 3 apresenta as médias \pm desvio padrão do percentual de sobrevivência para os diferentes tratamentos nas cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 3 - Valores médios do percentual de sobrevivência (%) para os diferentes tratamentos na *Saccharomyces cerevisiae* em 24 h de envelhecimento

Tratamentos	2% glicose 24h	0,5% glicose 24h
Controle	14,61 \pm 2,81	33,67 \pm 5,18
Controle + FC*	24,19 \pm 3,05	-
<i>sir1</i>	27,93 \pm 0,54	49,79 \pm 2,11
<i>sir1</i> + FC*	33,29 \pm 1,43	-
<i>sir2</i>	32,62 \pm 2,62	72,16 \pm 0,71
<i>sir2</i> + FC*	64,34 \pm 4,62	-
<i>sir3</i>	40,23 \pm 1,21	47,78 \pm 0,28
<i>sir3</i> + FC*	42,31 \pm 6,42	-
<i>sir4</i>	21,78 \pm 8,31	50,32 \pm 3,40
<i>sir4</i> + FC*	30,35 \pm 9,03	-

*cepas submetidas à 1h de cultivo em presença da ficocianina (FC).

Os resultados apresentados na Tabela 3 estão ilustrados na Figura 8. No primeiro momento analisaremos o cultivo com 2 % glicose (P). Observa-se que o percentual de sobrevivência foi superior nas cepas deletadas aos genes *sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir4* em relação à cepa controle. Essa superioridade foi estatisticamente significativa apenas para as cepas deletadas aos genes *sir2* ($p = 0,011$) ($p < 0,05$) e *sir3* ($p = 0,000$) ($p < 0,05$). No entanto, observou-se interação estatisticamente significativa entre todas as cepas ($p < 0,001$). Esses dados estatísticos estão descritos na Tabela 4.



Células das cepas controle (BY4741) e mutantes deficientes em sirtuínas (sir1, sir2, sir3 e sir4) crescidas em meio YPD 0,5 % ou YPD 2 % foram submetidas ao envelhecimento cronológico por 24 h. No caso do cultivo em YPD 2 %, parte das células foram previamente tratadas com 0,01 mg/mL de ficocianina (+ FC) durante 60 minutos antes de serem envelhecidas por 24 h. As porcentagens de sobrevivência foram calculadas a partir da razão da concentração de células viáveis obtida após (24 h) e antes (0 h) do envelhecimento. Os resultados representam a média \pm desvio padrão.

Figura 8 - Percentual de sobrevivência após 24 horas de envelhecimento para as cepas controle e deletadas aos genes *sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir4*.

No cultivo de células em 2 % de glicose acrescidas de ficocianina (P + FC), observa-se que o percentual de sobrevivência também foi superior nas cepas deletadas para os genes *sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir4* em relação à cepa controle. Diferenças estatísticas foram observadas apenas nas cepas deletadas aos genes *sir2* ($p = 0,000$) ($p < 0,05$) e *sir3* ($p = 0,010$) ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores médios e desvio padrão do percentual de sobrevivência (%) nas diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas a cada tratamento

Sobrevivência (média ± DP)					
Tratamento	Comparação entre cepas	Cepa mutante	Cepa controle	Diferença ± DP	P
2 %	<i>sir1</i> vs. controle	27,92 ± 0,54	14,61 ± 2,81	13,31 ± 3,06	0,095
	<i>sir2</i> vs. controle	32,62 ± 2,62	14,61 ± 2,81	18,0 ± 4,13	0,011*
	<i>sir3</i> vs. controle	40,23 ± 1,21	14,61 ± 2,81	25,66 ± 5,89	<0,001*
	<i>sir4</i> vs. controle	21,78 ± 8,31	14,61 ± 2,81	7,17 ± 1,6	1
2% + FC	<i>sir1</i> vs. controle	33,29 ± 1,43	24,19 ± 3,05	9,10 ± 2,09	0,648
	<i>sir2</i> vs. controle	64,34 ± 4,62	24,19 ± 3,05	40,15 ± 9,22	<0,001*
	<i>sir3</i> vs. controle	42,31 ± 6,42	24,19 ± 3,05	18,13 ± 4,16	0,010*
	<i>sir4</i> vs. controle	30,35 ± 9,03	24,19 ± 3,05	6,16 ± 1,41	1
0,5 %	<i>sir1</i> vs. controle	49,79 ± 2,11	33,66 ± 5,18	16,12 ± 3,7	0,025*
	<i>sir2</i> vs. controle	71,65 ± 0,71	33,66 ± 5,18	37,99 ± 8,71	<0,001*
	<i>sir3</i> vs. controle	47,77 ± 0,28	33,66 ± 5,18	14,11 ± 3,24	0,066
	<i>sir4</i> vs. controle	50,32 ± 3,40	33,66 ± 5,18	16,65 ± 3,82	0,019*

Significância entre as cepas mutantes comparadas com a cepa controle analisada por ANOVA. Aqueles que possuem o símbolo () apresentaram resultados com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$; 2% (padrão); 2% + FC (padrão + ficocianina), 0,5 % (RC).

Quando analisamos o cultivo com 0,5 % de glicose (RC) para os resultados do percentual de sobrevivência, verificamos que as cepas deletadas aos genes *sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir4* apresentam superioridade em relação à cepa controle. A análise estatística desse resultado mostra que as cepas deletadas aos genes *sir1*, *sir2* e *sir4* diferiram estatisticamente da cepa controle, com valores de $p = 0,025$, $p = 0,000$, $p = 0,019$, respectivamente (Tabela 4). A Figura 9 ilustra a comparação entre as cepas deletadas (*sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir4*) e a cepa controle nos tratamentos estudados.

Quando analisamos cada cepa de forma individual, nos cultivos 2% de glicose + ficocianina (P + FC) e 2% glicose (P), verificamos que o resultado mostrou que no

envelhecimento de 24 h, todas as cepas cultivadas no tratamento 2 % de glicose + ficocianina (P + FC), mostraram percentual de sobrevivência superior aos do cultivo com 2% glicose (P). Nesta comparação, foram encontradas diferenças significativas apenas para a cepa deletada para o gene *sir2* ($p = 0,000040$; $p < 0,05$) (Tabela 4).

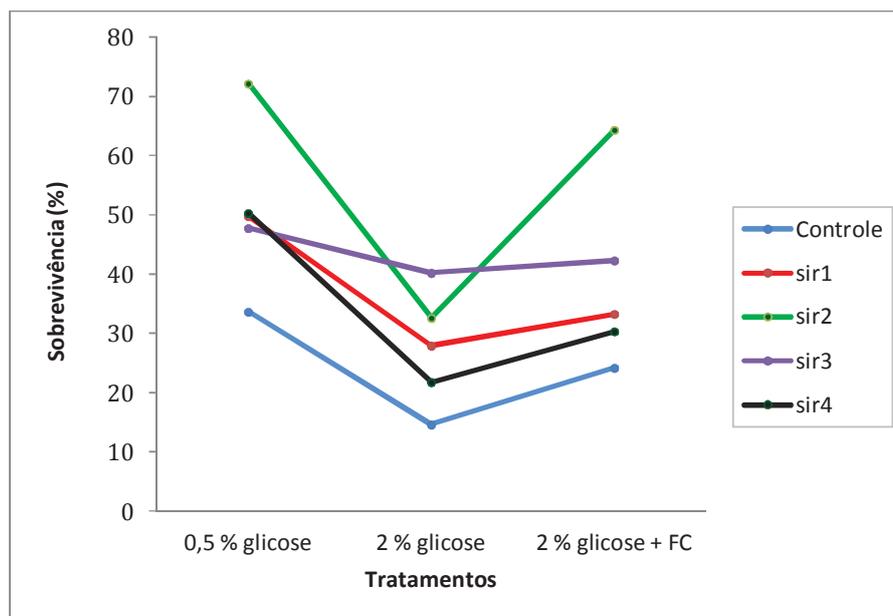


Figura 9 - Percentual de sobrevivência celular em 24 horas de envelhecimento para os tratamentos com 0,5 % glicose (RC), 2 % glicose (P) e 2 % glicose + ficocianina (P + FC).

Na continuidade da apresentação dos resultados referentes ao percentual de sobrevivência entre os tratamentos de forma individual, verificou-se que o percentual de sobrevivência foi superior nas células cultivadas em 0,5 % de glicose (RC). Este resultado está ilustrado na Figura 10, a qual também nos mostra que o cultivo com 2% de glicose e adição de ficocianina (P + FC) apresentou-se superior às células do cultivo com 2 % glicose (P), porém, inferior quando comparadas às células crescidas em 0,5 % glicose (RC).

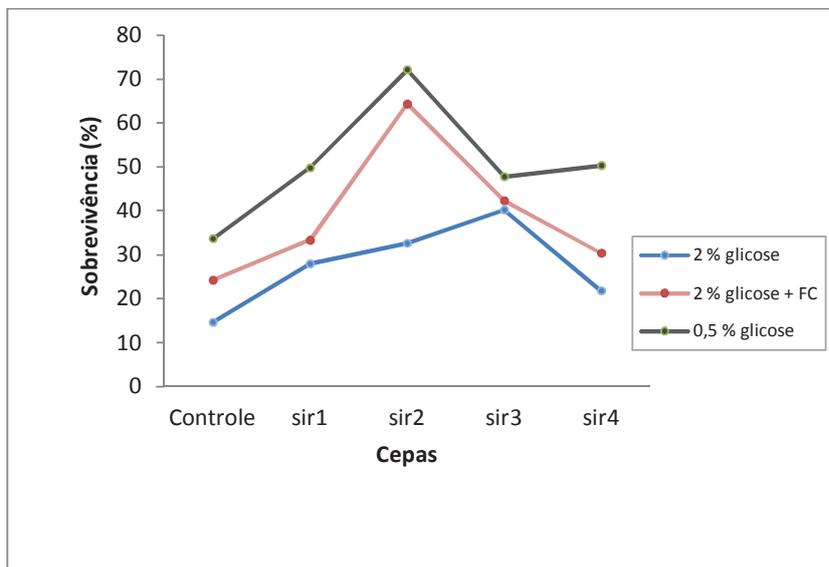


Figura 10 - Percentual de sobrevivência celular em 24 horas de envelhecimento para os tratamentos com 0,5 % glicose (RC), 2 % glicose (P) e 2 % glicose + ficocianina (P + FC), nas diferentes cepas.

Na cepa controle, houve diferença significativa entre células crescidas em 2 % (P) e 0,5 % (RC) ($p = 0,0081$; $p < 0,05$). Não diferiram os experimentos com ficocianina, com ou sem restrição calórica, da cepa controle ($p > 0,05$). Já na cepa deletada ao gene *sir1*, podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos com e sem ficocianina, quando crescidas em 2 % glicose (P + FC) e (P) ($p > 0,05$), porém os mesmos diferiram das células submetidas à 0,5 % glicose (RC), apresentando valor de $p = 0,027$ ($p < 0,05$) para a comparação destas com as não submetidas a RC, mas com a presença de ficocianina (P + FC) e $p = 0,0022$ ($p < 0,05$) para as células sem a presença de ficocianina (RC vs. P).

Na cepa deletada para o gene *sir2* o tratamento com ficocianina (P + FC) mostrou um aumento significativo em relação às células crescidas em 2 % glicose (P) ($p = 0,00004$; $p < 0,05$). Ao comparar as células crescidas em 2% glicose (P) com as células crescidas e 0,5 % (RC), verificou-se diferença significativa ($p = 0,000003$; $p <$

0,05). O mesmo não ocorreu com as células tratadas com ficocianina (P + FC), quando comparadas com células sob restrição calórica (RC) ($p > 0,05$).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na cepa deletada para o gene *sir3*, em todos os tratamentos ($p > 0,05$). Em contrapartida, ao estudarmos a cepa deletada ao gene *sir4*, percebemos que, assim como na cepa *sir1*, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos submetidos ou não à ficocianina ($p = 0,068$; $p > 0,05$). Estas células apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas às células em restrição calórica (RC), sendo que os valores para a comparação com células sob tratamento com ficocianina (P e P + FC) foram $p = 0,0052$ ($p < 0,05$) e $p = 0,0001$ ($p < 0,05$) para as células crescidas em diferentes quantidades de glicose, sem a presença de ficocianina.

4.2. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

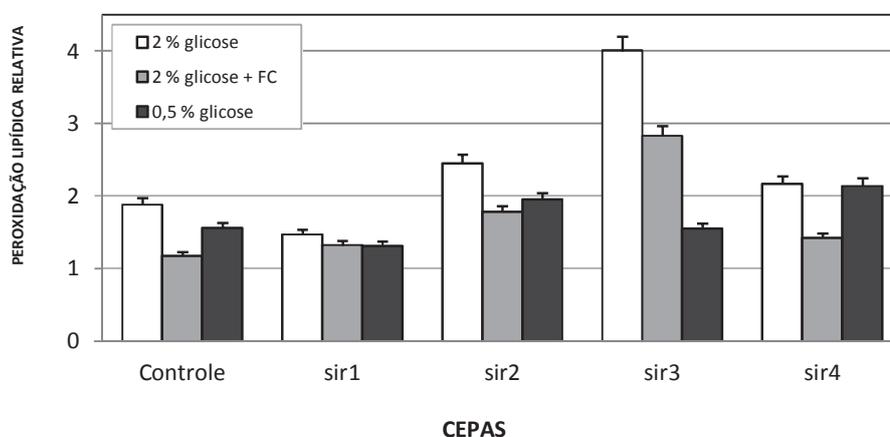
A oxidação de lipídeos foi verificada através do método TBARS, obtida antes e após o envelhecimento de 24 h, conforme descrito no item 4.8. A Tabela 5 apresenta a média \pm desvio padrão de 2 experimentos independentes.

Tabela 5 - Valores médios de peroxidação lipídica (pmoles MDA/mg de cel.) para os diferentes tratamentos na *Saccharomyces cerevisiae*

Tratamentos	2% glicose		0,5% glicose	
	0h	24h	0h	24h
Controle	167,24 \pm 40,08	314,56 \pm 56,46	72,43 \pm 6,71	113,64 \pm 18,26
Controle + FC*		196,72 \pm 11,49	-	-
<i>sir1</i>	255,66 \pm 41,06	377,54 \pm 209,15	205,52 \pm 256,84	270,59 \pm 173,98
<i>sir1</i> + FC*		338,16 \pm 122,13	-	-
<i>sir2</i>	197,46 \pm 66,48	483,90 \pm 114,8	160,65 \pm 49,39	314,50 \pm 53,08
<i>sir2</i> + FC*		354,65 \pm 40,56	-	-
<i>sir3</i>	137,61 \pm 51,55	551,12 \pm 111,25	170,63 \pm 74,79	265,57 \pm 22,71
<i>sir3</i> + FC*		390,22 \pm 202,47	-	-
<i>sir4</i>	178,36 \pm 95,24	388,11 \pm 287,03	99,15 \pm 32,37	212,39 \pm 5,33
<i>sir4</i> + FC*		253,81 \pm 40,23	-	-

*cepas submetidas a 1h de cultivo em presença da ficocianina.

Os resultados descritos na Tabela 5 são apresentados na Figura 11. Com o intuito de verificar o aumento de peroxidação lipídica devido ao processo de envelhecimento cronológico, os resultados foram expressos como a razão entre o nível de peroxidação lipídica após 24 h de envelhecimento e antes do envelhecimento (0 h) em todas as cepas.



Células das cepas controle (BY4741) e mutantes deficientes em sirtuínas (*sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir4*) crescidas em meio YPD 0,5 % ou YPD 2 % foram submetidas ao envelhecimento cronológico. No caso do cultivo em YPD 2%, parte das células foram previamente tratadas com 0,01 mg/mL de ficocianina (FC) durante 60 minutos antes de serem envelhecidas por 24 horas. Os resultados apresentados em vezes de aumento foram calculados a partir da razão dos valores de peroxidação lipídica obtidos após (24 h) e antes (0 h) do envelhecimento. Os resultados representam a média \pm desvio.

Figura 11 - Aumento de peroxidação lipídica em resposta ao envelhecimento cronológico

Ao apresentarmos os resultados referentes à peroxidação lipídica, iniciaremos pelas células do cultivo em 2% glicose (P). Podemos perceber que as cepas deletadas aos genes *sir* (*sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir4*), apresentaram maiores parâmetros de peroxidação lipídica quando comparadas à cepa controle, com exceção da cepa deletada ao gene *sir1*, que mostrou parâmetros de peroxidação lipídica inferiores em relação à cepa controle. Não foram encontradas diferenças significativas, nestas comparações (dados não mostrados).

Nos cultivos submetidos à restrição calórica (0,5 % glicose), verificamos que as cepas deletadas aos genes *sir* (*sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir4*) quando comparadas à cepa controle, mostraram valores semelhantes de peroxidação lipídica, sendo que as cepas deletadas aos genes *sir2* e *sir4*, tiveram maior percentual de peroxidação, ao contrário das cepas *sir1* e *sir3*. Não observamos diferenças estatísticas entre as cepas ($p = 0,86$) (dados não mostrados).

Quando tratadas com ficocianina (P + FC), todas as cepas apresentaram maiores valores de peroxidação lipídica em relação à cepa controle, com destaque para a cepa deletada ao gene *sir3*. Este resultado não apresentou diferenças significativas (dados não mostrados). Comparando cada cepa de forma individual, nossos resultados mostraram que, quando submetidas ao tratamento com ficocianina, as cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* deletadas aos genes *sir* (*sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir4*) e controle, apresentaram níveis de peroxidação lipídica inferiores, em relação às cepas ausentes de ficocianina.

Por fim, ao compararmos os parâmetros de peroxidação lipídica nos tratamentos de forma individual, não observamos diferenças entre estes ($p = 0,0737$). Em nosso estudo, também não observamos diferenças estatisticamente significativas entre as cepas deletadas aos genes *sir* (*sir1*, *sir2*, *sir3* e *sir4*) (dados não mostrados).

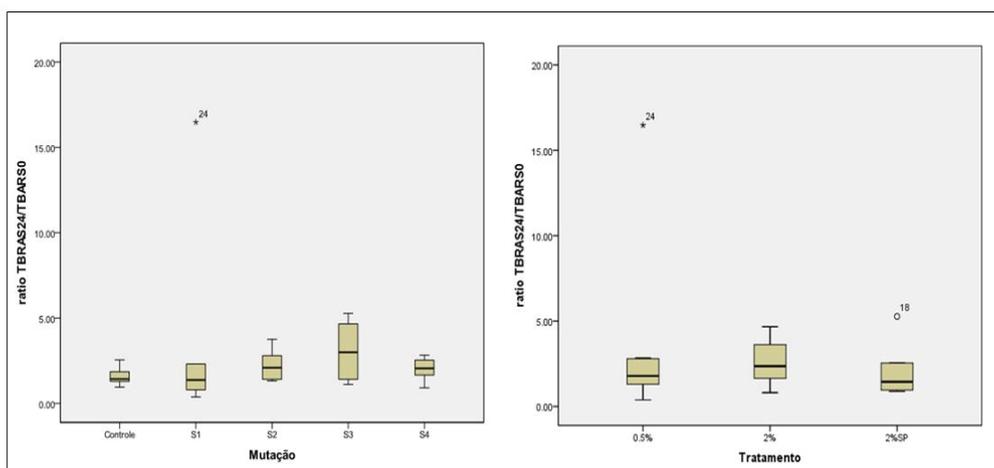


Figura 12 - Comparação da peroxidação lipídica em 24 h de envelhecimento.

5. DISCUSSÃO

Diante da apresentação destes resultados, podemos discutir que o percentual de sobrevivência foi aumentado frente aos tratamentos com ficocianina e com restrição calórica nas cepas deletadas ao gene *sir1*, *sir2* e *sir4* e na cepa controle. Foi possível observar que a deleção do gene *sir3*, foi a que apresentou menor influência no percentual de sobrevivência frente aos tratamentos com ficocianina e restrição calórica. Este comportamento não apresentou diferenças estatísticas.

Em contrapartida, quando se observa as demais cepas incluindo a cepa controle, verifica-se um aumento do percentual de sobrevivência quando comparados aos seus próprios controles, com destaque para a deleção do gene *sir2*, em ambos os tratamentos (FC e RC) que, mostrou diferença significativa, quando comparada ao seu controle. A cepa deletada ao gene *sir2* foi a que melhor reconheceu as terapias com ficocianina e restrição calórica, mostrando diferenças significativas no percentual de sobrevivência.

O envelhecimento cronológico da levedura serve como parâmetro para o entendimento do envelhecimento em células humanas. O tempo de vida cronológico é monitorado através do crescimento celular, quando as células entram em fase exponencial (LONGO et al., 1996; GUTIERREZ et al., 2010). No presente estudo buscamos analisar a longevidade através do percentual de sobrevivência das cepas submetidas ao envelhecimento celular.

Estudos buscando elucidar os mecanismos da longevidade têm avaliado os efeitos benéficos de compostos antioxidantes (OLAS et al., 2001; DAS et al., 2006; WANG et al., 2002; BAUR, 2010). O resveratrol tem sido identificado como sendo um imitador parcial da restrição calórica (KABERLEIN et al., 2005; BARGER et al., 2008). Porém, segundo Mukherjee et al. (2008), o resveratrol não é o único nutriente que aumenta o tempo de vida, ativando os genes da longevidade.

Para tal, utilizamos a ficocianina como composto antioxidante. Um dos nossos objetivos foi verificar se as propriedades da ficocianina podem ser semelhantes aos efeitos da restrição calórica, por meio do percentual de sobrevivência. A pesquisa

mostrou que, no processo de envelhecimento, as cepas tiveram maior sobrevivência quando expostas à ficocianina em relação às não expostas. No cenário clínico, estes achados indicam que a ficocianina pode ser útil para prevenir ou reduzir o risco de doenças crônicas e os efeitos do envelhecimento, podendo aumentar a longevidade (BELAY, 1993; BERTOLIN et al., 2009).

Queremos, desta forma, fazer um paralelo dos atributos já bastante estudados da RC com o uso da ficocianina. De acordo com Baur (2010) devido o estilo de vida sob RC ainda ser uma incerteza, se pensarmos no ser humano, a busca por terapias que mimetizem os efeitos benéficos da RC para a saúde e a longevidade tem sido evidenciada. Nesta revisão, Baur apresenta como exemplo o resveratrol como um promissor mimetizador da RC. Nesta mesma linha, Ristow e Zarse (2010), relatam como que o aumento do estresse oxidativo promove saúde metabólica e longevidade, resgatando o conceito de hormese. Os autores sugerem que o uso de antioxidantes apresentam um denominador comum metabólico quando comparado com RC. Isto é, aumentam o metabolismo mitocondrial e a formação de ERO, aumentando a resistência ao estresse oxidativo, as defesas antioxidantes e a longevidade (BAUR, 2010).

O estudo de Estrada, Bescós e Fresno (2001), analisou os componentes antioxidantes da *Spirulina platensis*, concluindo que a ficocianina é o principal componente responsável pela defesa antioxidante das células. Em outra pesquisa, os mesmos autores estudaram células de neuroblastoma humano. O estudo teve como objetivo estudar a possibilidade da ficocianina ser um agente de proteção da toxicidade, atuando na prevenção e/ou tratamento de doenças degenerativas. No estudo, o estresse oxidativo foi induzido pelo Ferro (Fe^{2+}). As células quando expostas ao extrato protéico, foram capazes de reduzir os efeitos induzidos com Fe^{2+} , aumentando significativamente os níveis celulares das enzimas com atividade antioxidante incluindo glutathione peroxidase (GPX), glutathione selênio-dependente (GPX-Se) e glutathione oxidase reductase (GR) (GSH, GR, GPx) (BESCÓS, ESTRADA e FRESNO, 2008).

A literatura mostra que a *Spirulina* e seus pigmentos antioxidantes podem prevenir ou inibir o câncer em seres humanos ou animais. Os estudos *in vitro* sugerem que os polissacarídeos da *Spirulina* aumentam a atividade enzimática do núcleo da

célula e reparo na síntese do DNA (PANG et al., 1998; ESTRADA, BESCÓS e FRESNO (2001)

Em contraste com os numerosos estudos pré-clínicos, um número de ensaios clínicos foi realizado para avaliar a atividade antioxidante e/ou atividade antiinflamatória de *Spirulina* em humanos (DENG e CHOW, 2010). Kim e Kim (2005) estudaram 26 mulheres idosas que consumiram 7,5 mg por dia de *Spirulina* durante 8 semanas. O estudo demonstrou atividade antiinflamatória, uma vez que reduziu significativamente os níveis de interleucina 6 (IL-6).

Os estudos com alimentos enriquecidos com *Spirulina* demonstram que mesmo em pequenas quantidades pode influenciar nos mecanismo da defesa imunológico. Henrikson (1994) afirma que o consumo de ficocianina torna-se importante uma vez que é um estimulante ao sistema imunológico, aumentando a contagem de leucócitos.

Um estudo duplo-cego, controlado com placebo, objetivou avaliar 78 idosos considerados saudáveis, administrando suplementação de *Spirulina*, sob uma dose de 8 g/dia durante 16 semanas. Os pesquisadores tiveram como resultado, em ambos os sexos, um aumento significativo da IL-2 no plasma sanguíneo. Porém, observou-se uma redução na concentração de IL-6 em indivíduos do sexo masculino e um aumento da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em indivíduos do sexo masculino (KIM e KIM, 2005).

Um artigo de revisão aponta que os potenciais impactos negativos de tais compostos antioxidantes na saúde humana são amplamente conhecidos. Tanto a ciência moderna e a utilização de medicamentos populares, vêm fornecendo produtos funcionais que envolvem alimentos, medicamentos e cosméticos. O consumo destes produtos contendo compostos antioxidantes, geralmente, tem a finalidade de aliviar o estresse celular decorrentes da produção de espécies reativas (CORNISH e GARBARY, 2010).

No presente estudo foi possível observar que cepas submetidas à restrição calórica, apresentaram maior longevidade celular em relação às não expostas. Estes resultados também foram maiores quando comparados às células expostas à ficocianina, em todas as cepas estudadas, com exceção da cepa deficiente em *sir3*. Este resultado

pode evidenciar o mimetismo da ficocianina na restrição calórica, e que este mecanismo depende de *sir3*.

Os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos benéficos da restrição calórica no prolongamento da vida vêm sendo amplamente discutidos evidenciando diferentes vias embora o mecanismo exato ainda seja desconhecido. (FONTANA, PATRIDGE e LONGO, 2010; KENYON, 2010). Estudos em ratos observaram os benefícios da restrição calórica em testes com 40 % de redução de calorias (COHEN, et al., 2004) e, em seres humanos, a redução de 25 % (CIVITARESE, et al., 2007).

Heilbronn et al. (2006) examinaram os efeitos de 6 meses de restrição calórica, em homens e mulheres. Os resultados sugeriram que dois biomarcadores de longevidade (nível de insulina em jejum e a temperatura do corpo) são reduzidos pela restrição calórica prolongada em seres humanos. explicar

Em recente revisão, Haigis e Guarente (2010) citam achados que demonstram o papel das sirtuínas em mamíferos como reguladores da fisiologia, restrição calórica e envelhecimento. Informações atuais facilitam o entendimento de como as sirtuínas podem atuar como potenciais alvos farmacológicos no tratamento as doenças graves do envelhecimento. Os autores sugerem que nos próximos anos as respostas a estas e outras perguntas poderão ser os agentes farmacológicos que atingem as sirtuínas com a ação mimética da restrição calórica. Este caminho de intervenção medicamentosa vem despertando o interesse dos pesquisadores, visto que a RC atua de forma benéfica nos efeitos de muitas doenças em roedores.

O estudo de Barger et al. (2008) cita que o resveratrol vem sendo demonstrado por estender o tempo de vida e na prevenção do envelhecimento precoce em camundongos alimentados com uma dieta rica em calorias. Diante disso, foi realizada uma pesquisa em ratos de meia idade e idade avançada. Os animais foram alimentados com uma baixa dose de resveratrol ou uma dieta com restrição de calorias. Os autores relataram a atuação da restrição calórica e do resveratrol no músculo cardíaco, esquelético e cérebro. O resveratrol também mimetizou os efeitos da restrição calórica na captação da glicose pela insulina e no retardo de efeitos do envelhecimento através

de alterações na cromatina. O estudo sugeriu ainda que o resveratrol pode ser um composto alimentar que mimetiza alguns aspectos da restrição calórica.

Baur (2010), resumiu trabalhos recentes envolvendo restrição calórica, resveratrol e sirtuínas. Ao descrever mecanismos estudados até a data, ressaltou a necessidade de esforços continuados para elucidar as vias de sinalização que mediar a resposta a restrição calórica em mamíferos, a fim de aproveitar o potencial desta terapia para melhorar a saúde humana e atrasar ou evitar as doenças relacionadas ao envelhecimento.

Em revisão, Herrans e Serrano (2010), descrevem que a família de proteínas deacetilases representados pela levedura *sir2* tem sido o foco de intensa investigação devido a atuação na longevidade em leveduras, vermes e moscas. Em mamíferos, o foco se deve a *sir1*, quando os estudos nesses modelos vem sugerindo que a *sir1* é um protetor de patologias associadas ao envelhecimentos. Os autores mostram que o resveratrol tem sido utilizado em grande escala como um ativador da *sir1*, entretanto, alguns estudos concluíram que este não é um ativador direto da *sir1*, não invalidando o conceito de que o resveratrol ativa a *sir1* através de mecanismos indiretos *in vivo*. Os resveratrol tem sido demonstrado na ativação da proteína quinase, aumentando os níveis de NAD⁺ e este, por sua vez, ativa a *sir1*.

Em nosso estudo, foram comparadas a atuação da ficocianina e os efeitos da restrição calórica. As cepas mutantes submetidas a restrição calórica, quando comparadas com a cepa controle, na qual não haviam mutações, observamos que a longevidade foi maior nas cepas mutantes, detectando que a cepa deletada para o gene *sir3* apresentou menor percentual de sobrevivência. Dentre as cepas tratadas com ficocianina, foi possível observar ao percentual de sobrevivência celular foi menor quando as cepas estavam deletadas aos genes *sir1* e *sir4*, sugerindo que estas pode ter um efeito protetor nos mecanismos do envelhecimento.

A *sir2* foi a primeira proteína sirtuína descrita por atuar no prolongamento da vida. Em leveduras, *sir2* é um dos principais determinantes da longevidade, tendo em vista que o aumento deste gene pode influenciar no prolongamento da vida. Sirtuínas são deacetilases NAD-dependentes altamente conservadas de bactérias a humanos.

(KABERLEIN, et al., 1999; IMAI et al, 2000). Lin et al. (2002) cita que a restrição calórica não pode estender o tempo de vida quando a *sir2* está ausente. Entretanto, esta afirmação é controversa, uma vez que células deletadas ao gene *sir2* acumulam alterações cromossômicas no DNA que podem encurtar a vida de forma independente. Em adição, Kaberlein (2004) afirmou que a restrição calórica pode ser independente da *sir2*, de forma que existem cepas de leveduras diferentes. Fadini et al. (2011) sugeriu a existência de vias múltiplas, embora semelhantes, que podem estender tempo de vida útil.

A hipótese de que a *sir2* contribui para a extensão da vida devido a restrição alimentar é controversa (KABERLEIN, 2010). O silenciamento da cromatina em *Saccharomyces cerevisiae* é estabelecido em um processo gradual que envolve a família das sirtuínas, evidenciando a histona deacetilase da *sir2* e os componentes estruturais da *sir3* e *sir4* (BUCHBERGER, 2008).

Lin, Defossez e Guarente (2000) citam que embora a restrição calórica possa funcionar reduzindo os níveis de espécies reativas ao oxigênio produzidas durante a respiração, o mecanismo pelo qual a restrição calórica retarda o envelhecimento ainda é incerto. Estes autores realizaram um estudo, no qual foi determinada a porcentagem de colônias, em meio YPD. A extensão da vida não foi observada em cepas deletadas ao gene *sir2* ou NPT1 (um gene de uma via na síntese de NAD, a forma oxidada da dinucleótido de nicotinamida adenina), sugerindo que o aumento da longevidade induzida pela restrição calórica requer a ativação da *sir* pelo NAD.

Um outro estudo examinou os efeitos da histona deacetilase nas proteínas Rpd3, Hda1 e *sir2* em leveduras. Essas proteínas apresentam funções globais de expressão gênica, na extensão de vida proporcionada pela restrição calórica. A exclusão de *sir2* reduziu o tempo de vida, mas não impediu a extensão da vida útil por restrição calórica (JIANG et al., 2002)

No presente estudo o percentual de sobrevivência aumentou quando a *sir2* não estava presente. Contudo, pode-se sugerir que esta sirtuína pode influenciar, de alguma forma, na longevidade ao observarmos que houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Lamming et al. (2005) afirmam que a hipótese de que a *sir2* media os efeitos da restrição calórica foi contestada pela observação de que a restrição calórica pode estender o tempo de vida na levedura, na ausência de *sir2*. No estudo foi mostrado que a extensão do tempo de vida é independente de *sir2*, sendo mediada por Hst2, um homólogo de *sir2* que promove a estabilidade do DNA ribossômico, o mesmo mecanismo pelo que a *sir2* pode estender o tempo de vida. Estas descobertas demonstram que a manutenção da estabilidade de do DNA é fundamental para a extensão do tempo de vida em leveduras sob restrição calórica e, em organismos superiores vários membros da família *sir2* podem atuar na regulação da vida em resposta a dieta.

Haigis e Sinclair (2010), em revisão da literatura, analisaram que até a data, foram mostrados que a *sir2* pode estender o tempo de vida. Desde então, tornou-se claro que *sir2* é apenas um exemplo de uma família de enzimas que controlam os principais processos celulares, tais como combustíveis para adaptações em condições para baixo consumo de nutrientes, funções mitocondriais em ambientes que incluem reparação de DNA, sobrevivência neuronal e manutenção de um padrão genético jovem. No entanto, ainda há a necessidade do mecanismo de sirtuínas ser elucidado.

Nosso estudo mostrou dados inversos a esses achados, quando as sirtuínas ausentes podem ter causados maior longevidade. Contudo, podemos sugerir que a cepa deletada para o gene *sir3* pôde influenciar na sobrevivência, partindo da análise estatística, onde as alterações não foram significativas.

Em revisão, Norris e Boeke (2010), comentaram os recentes trabalhos envolvendo a interação entre *sir3* e a cromatina. A *sir3* é necessária para o silenciamento e se distancia das proteínas iniciadoras de replicações. Vários estudos citados nesta mesma revisão indicam que o papel da *sir3* em ligar a perda do DNA ribossomal no silenciamento no nucleossomo são eficazes para o silenciamento dos telômeros. Os dados genéticos mais recentes fornecem novas idéias em relação às controvérsias resultantes de trabalhos *in vitro*. Essas idéias englobam o mecanismo da proteína *sir3* na formação da cromatina no silenciamento de leveduras. Ainda nesta revisão, dois trabalhos são citados sugerindo que a característica mais marcante da *sir3* é sua capacidade de condensar a cromatina, independentem do complexo *sir2/sir4*, o que

pode sugerir algumas propriedades intrínsecas da *sir3* que permite ligar-se aos nucleossomos (HECHT, STRAHL-BOLSINGER e GRUNSTEIN, 1996).

Em estudo com humanos, o gene *sir3* tem sido associado a expectativa de vida. Essas descobertas precisam ser avaliados em amostras significativas com o intuito de encontrar o mecanismo da promoção da longevidade em humanos e da importância da vida útil quanto a realização de experimentos em camundongos que poder superexpressar ou suprimir a *sir3* (HAIGIS e GUARENTE, 2010).

Para Haigis e Sinclair (2010), apesar dos rápidos avanços na biologia das sirtuínas, ainda não há ferramentas para a precisão dos efeitos da atividade de sirtuínas *in vitro* e *in vivo*. Diferenças em dados encontrados nas pesquisas com ratos, revelam um cenário complicado trazendo a tona o fato de que há muitas informações desconhecidas quanto a função das sirtuínas. Parte desses conflitos incluem a interpretação de quando as sirtuínas estão ativadas. Existe a idéia pendente que é saber se a ativação da *sir1* é segura o suficiente para ser usada como uma terapia para doenças humanas, tais como diabetes ou doenças cardiovasculares.

A histona deacetilase *sir1* tem sido sugerida como um das principais enzimas que modulam os resultados benéficos da restrição calórica. Embora a superexpressão de *sir1* mimetiza certos efeitos fisiológicos da restrição calórica, a supressão pode anular a extensão da vida útil mediada pela restrição calórica. No entanto, verifica-se que *sir1* quando isolada pode ser insuficiente para provocar efeitos na longevidade. Achados relacionados entre *sir1* e restrição calórica precisam ser definidas para compreender os papéis desses dois processos (HAIGIS e GUARENTE, 2010)

Bordone et al. (2007) estudaram camundongos com superexpressão de *sir1*, submetidos a restrição calórica. Os resultados do estudo evidenciaram o aumento da expressão da *sir1* em ratos, sugerindo benefícios que possam ser relevantes para a saúde humana e na longevidade.

Haigis e Guarente (2010) descreveram a regulação da *sir4* durante a restrição calórica em células do fígado, contrariando a expectativa de que a atividade das

sirtuínas devem aumentar durante a restrição calórica. No entanto, é consistente com o observado em camundongos, quando acontece a redução da razão NAD/NADH no fígado em restrição calórica. Os autores sugerem que a restrição calórica, de hidratos de carbono para a redução de gordura, como fonte de energia pode auxiliar a reduzir a razão NAD/NADH nesses animais.

Nosso interesse em avaliar os níveis de peroxidação lipídica se deu pelos achados recentes, os quais mostram que a conversão oxidativa de ácidos graxos em peróxidos lipídicos pode danificar as membranas biológicas, levando ao dano tecidual, estando relacionada com o envelhecimento (BHAT e MADYASTHA, 2000). A quantificação das TBARS avalia a presença de peroxidação lipídica através dos níveis de MDA, os quais servem como marcadores de estresse oxidativo (POTTER, NEUN; STERN, 2011; GUSTAW-ROTHENBERG; KOWALCZUK; STRYJECKA-ZIMMER, 2010).

Romay, Ramirez e González (2001), investigaram a atividade antioxidantes da ficocianina frente a peroxidação lipídica microsomal, utilizando microsomas de fígado de ratas. No estudo foi observado que a ficocianina mostrou ser mais entre 6 e 7 vezes mais eficiente que outros dois antioxidantes (ácido ascórbico e trolox). Ao final do estudo, os autores consideraram, que a ficocianina reúne os requisitos para transformar-se em um candidato a fármaco.

Os estudos de Bescos et al., (2008) e Estrada et al., (2001), realizados em neuroblastomas humanos demonstram que a ficocianina é um potente eliminador de radicais hidroxila e peróxidos, tendo a capacidade de inibição da peroxidação lipídica microsomal.

Um artigo de revisão aponta estudos que comprovam o efeito benéfico da *Spirulina* na prevenção de toxicidade induzida em órgãos como fígado, rins, cérebro através da diminuição da peroxidação lipídica (DENG; CHOW, 2010). Um dos estudos citados nesta revisão observou que a *Spirulina* teve efeito positivo na redução da toxicidade pela peroxidação lipídica (PREMKUMAR et al, 2001).

Os resultados da pesquisa de Khan et al. (2005) sugeriram a prevenção do aumento do MDA no tecido cardíaco em camundongos tratados com *Spirulina*, quando

a cardiotoxicidade era induzida pela Doxorubicina, um fármaco amplamente utilizado no tratamento de cânceres. Ainda, os níveis séricos de MDA foram reduzidos em ratos jovens tratados com *Spirulina* no estudo de Sharma, Sharma, Sharma (2005). Outros autores verificaram que indivíduos jovens que receberam *Spirulina* diminuíram a peroxidação lipídica em análise sanguínea (LU et al, 2006).

Em nosso estudo, quando comparamos as cepas em restrição calórica, foi possível perceber que a peroxidação foi atenuada em todas as cepas quando comparadas às células crescidas em 2% de glicose (P).

No estudo de Reverter-Branchat et al. (2004), o autor evidenciou que o envelhecimento de leveduras pode ser explicado, em parte, por mudanças do dano oxidativo a proteínas específicas, produzidas por situações de estresse no interior da célula. Neste, a restrição calórica destacou-se por abrandar o envelhecimento, podendo ser atribuída a uma melhor preparação de células jovens a lidar com situações de estresse.

No presente estudo, o tratamento com restrição calórica nas cepas controle e deletadas aos genes *sir*, demonstraram valores semelhantes, contrariando a literatura, onde diversas pesquisas apresentam os mecanismos da restrição calórica envolvendo as sirtuínas (BISHOP e GUARENTE, 2007; JIANG et al., 2000; LIN, DEFOSSEZ e GUARENTE, 2000; KAEBERLEIN, McVEY e GUARENTE, 1999; SMITH, KENNEDY e KABERLEIN, 2005; RAHAT, NOAM e COHEN, 2010).

Os resultados do nosso estudo evidenciaram que a deficiência da cepa deletada ao gene *sir3* provocou maior quantidade de MDA quando relacionada com a controle. Para Kaberlein et al. (1999) e Fabrízio e Longo, (2003) as proteínas *sir2*, *sir3* e *sir4*, podem regular a produção de espécies reativas de oxigênio e o envelhecimento, por também controlar o silenciamento da cromatina em determinados locais do DNA.

Bell et al. (2011) detectaram que a *sir3* capacidade de redução de espécies reativas de oxigênio e regular a hipóxia induzida (HIF) em células tumorais, estabelecendo um novo papel da *sir3* na manutenção e progressão do câncer.

Recentemente foi descrito que a *sir3* pode atuar como supressor de tumores localizados na mitocôndria (KIM et al., 2010).

Para Guarente (2011), estudos em *Drosophila* e leveduras levaram à identificação de fatores que mediam o silenciamento da cromatina e que as proteínas sirtuínas são necessárias para o silenciamento de telômeros e sequências repetidas de DNA. Dentre as sirtuínas, a *sir2* foi citada para o silenciamento do DNA ribossomal.

É importante considerar os estudos em organismos inferiores, os quais podem nos informar sobre a situação de mamíferos. Há evidências de que genes-chave que controlam a produção de energia e detecção e tempo de vida em leveduras também pode controlar um ou ambos os processos em invertebrados e mamíferos. A evidência recente para o importante papel das pequenas populações de neurônios no controle da longevidade nos invertebrados e possivelmente em mamíferos sugere que a RC pode reduzir significativamente os problemas relacionados a longevidade. Ao descobrirmos os mecanismos da RC em organismos inferiores, será possível considerarmos mais próximos de resolver estas situações em mamíferos (BISHOP e GUARENTE, 2010).

Sugerimos que estas proteínas podem ser influenciadas pela dieta ou pelo uso de antioxidantes, tornando-se interessantes alvos terapêuticos para doenças decorrentes do processo de envelhecimento. Contudo, questões importantes necessitam ser elucidadas para melhorar a compreensão dos mecanismos das sirtuínas e seu potencial terapêutico.

6. CONCLUSÃO

O uso das terapias restrição calórica e ficocianina mostrou benefício no percentual de sobrevivência celular e na peroxidação lipídica.

Ao concluir sobre a resposta das diferentes sirtuínas na longevidade celular, observamos que a *sir2* Δ mostrou maior sensibilidade aos tratamentos restrição calórica e ficocianina, mas o mesmo não foi observado em relação à peroxidação lipídica, onde a deleção da *sir3* mostrou os maiores níveis.

REFERÊNCIAS

- ADAMIS, A. D. B.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. A. **Vacuolar compartmentation of the cadmium-glutathione complex protects *Saccharomyces cerevisiae* from mutagenesis.** Toxicology Letters, v. 173, p. 1-7, 2007.
- AFANA'S EV, I. B. **Free radical mechanisms of aging processes under physiological conditions.** Biogerontology, v. 6, p. 283-290, 2005.
- ALMEIDA, H. **O metabolismo nos caminhos do Envelhecimento.** Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, v. 2, p. 39-46, 2007.
- AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. **Propriedades de saúde da *Spirulina* spp.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 29, n. 2, 2008.
- AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. **Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington DC., v. 90, n. 17, p. 7915-7922, 1993.
- ANDERSON, R. M.; BITTERMAN, K. B.; WOOD, J. G.; MEDVEDIK, O.; SINCLAIR, D. A. **Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*.** Nature, v. 423, p. 181-185, 2003.
- ANDERSON, R. M.; SHANMUGANAYAGAM, D.; WEINDRUCH, R. **Caloric Restriction and Aging: Studies in Mice and Monkeys.** Toxicologic Pathology, v. 37, p. 47-51, 2009.
- ANDRADE Jr, D. R.; SOUZA, R. B; SANTOS, S. A, ANDRADE, D. R. **Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares.** Jornal Brasileiro de Pneumologia, n. 31, p. 60-68, 2005.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. **Cultivo da microalga *spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes.** Ciência e Agrotecnologia, v. 32, n. 5, 2008.
- ANDREWS, S. R.; SAHU, N. P.; AK, P.; MUKHERJEE, S. C.; KUMAR, S. Yeast extract, brewer's yeast and spirulina in diets for *Labeo rohita* fingerlings affect haemato-immunological responses and survival following *Aeromonas hydrophila* challenge. Research in Veterinary Science, v. 91, n. 1, p. 103-109, 2011.

ANTUNES-NETO, J. M. F.; SILVA, L. P.; MACEDO, D. V. **Biomarcadores de estresse oxidativo**: novas possibilidades de monitoramento em treinamento físico. *Revista brasileira de Ciência e Movimento*, v. 13, n. 2, p. 7-15, 2005.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. VII Lista dos novos ingredientes aprovados. Disponível em: www.anvisa.gov.br. ANVISA, 2009.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3ª ed. Viçosa: UFV, 2004.

BARGER, J. L.; KAYO, T.; VANN, J. M.; ARIAS, E. B.; WANG, J.; HACKER, T. A.; WANG, K.; RAEDSTRFF, D.; MORROW, J. D.; ALLISON, D. B.; SAUPE, K. W.; CARTE, G. D.; WEINDRUCH, R.; PROLLA, T. A. **A Low Dose of Dietary Resveratrol Partially Mimics Caloric Restriction and Retards Aging Parameters in Mice**. *Plos One*, v. 3, n. 6, 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo**. *Quimica Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BAUR, J. A. **Resveratrol, sirtuins, and the promise of a DR mimetic**. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 131, p. 261–269, 2010.

BELAY, A. **The potential application of Spirulina (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic supplement in health management**. *Journal of the American Nutraceutical Association*, v. 5, n. 2, p. 27-48, p. 2002.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. **Current knowledge on potential health benefits of Spirulina**. *Journal of Applied Phycology*, v.5, 1993.

BELL, E. L.; EMERLING, B. M.; RICOULT, S. J.; GUARENTE, L. **Sirt3 suppresses hypoxia inducible factor 1 α and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production**. *Oncogene*, v. 30, n. 26, p. 2986-2996, 2011

BENNETT, A.; BOGORAD, L. **Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga**. *The Journal of Cell Biology*, v. 58, n. 419, 1973.

BERTOLIN, T. E.; PILATTI, D.; BAVARESCO, K.; GIACOMINI, A.C.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. **Effect of microalga *Spirulina platensis* (Arthrospira platensis) on hippocampus lipoperoxidation and lipid profile in rats with induced hypercholesterolemia**. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, p. 1253-1259, 2009.

BERTOLIN, T. E.; FARIAS, D.; GUARIENTI, C.; PETRY, F. T. S.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. **Antioxidant Effect of Phycocyanin on Oxidative Stress Induced with Monosodium Glutamate in Rats.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 54, p. 733-738, 2011.

BESCÓS, P. B.; ESTRADA, E. P.; FRESNO, A. M. V. **Neuroprotection by Spirulina platensis protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells.** Toxicology in Vitro, v. 22, n. 6, p. 1496-1502, 2008.

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. **Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from Spirulina platensis: protection against oxidative damage to DNA.** Biochemical and Biophysical Research Communication, v. 285, n. 2, p. 262-266, 2001.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta.** Revista de Nutrição, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BISHOP, N. A.; GUARENTE, L.; **Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans.** Genetics, v. 8, n. 11, p.835-844, 2007.

BONAWITZ, N. D.; RODEHEFFER, M. S.; SHADEL, G. S.; **Defective Mitochondrial Gene Expression Results in Reactive Oxygen Species-Mediated Inhibition of Respiration and Reduction of Yeast Life Span.** Molecular and Cellular Biology, v. 26, n. 13, p. 4818-4829, 2006.

BONSALL, M. **Longevity and ageing: appraising the evolutionary consequences of growing old.** Philosophical Transactions, v. 361, p. 119-135, 2006.

BORDONE L, GUARENTE L. **Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 6, p. 298–305, 2005.

BORDONE, L.; COHEN, D.; ROBINSON, A.; MOTTA, M. C.; VEEN, E. CZOPIK, A.; STEELE, A.; CROWE, H.; MARMOR, S.; LUO, J.; GU, W.; GUARENTE, L. **SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction.** Aging cell, v. 6, p. 759 –767, 2007.

BUCHBERGER, J. R.; ONISHI, M.; LI, G.; SEEBACHER, J.; RUDNER, A. D; GYGI, S. P.; MOAZED, D. **Sir3-Nucleosome Interactions in Spreading of Silent**

Chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, v. 28, n. 22, p. 6903-6918, 2008.

BUHLER, M.; GASSER, S. M. **Silent chromatin at the middle and ends: lessons from yeasts.** *The Embo Journal*, v. 28, p. 2149-2161, 2009.

CHEN, F.; ZHANG, Y. **High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fedbatch system.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 20, n. 3, p. 221-224, 1997.

CIVITARESE, A. E.; CARLING, S.; HEILBRONN, L. K.; HULVER, M. H.; UKROPCOVA, B.; DEUTSCH, W. A.; SMITH, S. R.; RAVUSSIN, E. **Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans.** *Plos Medicine*, v.4, n. 76; 2007.

COHEN, H. Y.; MILLER, C.; BITTERMAN, K. J.; WALL, N.; KEKKING, B.; BENEDIKT, K.; HOWITZ, K.; GOROSPE, M.; CABO, R.; SINCLAIR, D. **Calorie Restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase.** *Science*, v. 305, jul., 2004.

COLLA, L. M.; BAISH, A. L. M.; COSTA, J. A. V. ***Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 51, p. 405-411, 2008.

COLMAN, R. J. ANDERSON, R. M.; JOHNSON, S. C.; KASTMAN, E. K.; KOSMATKA, K. J.; BEASLEY, T. M.; ALLISON, D. B.; CRUZEN, C.; SIMMONS, H. A.; KEMNITZ, J. W.; WEINDRUCH, R. **Caloric restriction delays disease onset and mortality in Rhesus monkey.** *Science*, v. 325, n. 10, 2009.

CORNISH, M. L.; GARBARY, D. J. **Antioxidants from macroalgae: potential applications in humans health and nutrition.** *Algae*, v. 25, n. 4, p. 155-171, 2010.

COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; GUARIENTI, C. **Restrição calórica e ficocianina no processo do envelhecimento de ratos.** *Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano*, v. 6, p. 88-94, 2011.

DANG, W., STEFFEN, K. K.; PERRY, R.; DORSEY, J. A.; JOHNSON, F. B.; SHILATIFARD, A.; KAEBERLEIN, M.; KENNEDY, B. K.; BERGER, S. L. **Histone H4 lysine-16 acetylation regulates cellular lifespan.** *Nature*, v. 459, n. 7248, 2009.

- DANI, C.; BONATTO, D., SALVADOR, M.; PEREIRA, M.; HENRIQUES, J. A. P.; ELEUTHERIO, E. **Antioxidant Protection of Resveratrol and Catequin in *Sacharomyces cerevisiae***. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, p. 4268-4272, 2008.
- DENG, R.; CHOW, T. J.; **Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina***. Cardiovascular Therapeutics, v. 28, p. 33-45, 2010.
- DRAPER, H. H.; SQUIRES, E. J.; MAHMOODI, H.; WU, J.; AGARWAL, S.; HADLEY, M. **A comparative evaluation of Thiobarbituric acid methods for the determination of Malondialdehyde in biological materials**. Free Radical Biology and Medicine, v. 15, 1993.
- DRÖGE, W., **Free radicals in the physiological control of cell function**. Physiological Reviews, v. 82, p. 47-95, 2002.
- ESTRADA, J. E. P.; BESCÓS, P.; FRESNO, A. M. **Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract**. Farmaco, v. 56, p. 497-500, 2001.
- EVANS, C.; BOGAN, K. L.; SONG, P.; BURANT, C.; KENNEDY, R. T.; BRENNER, C. **NAD⁺ metabolite levels as a function of vitamins and calorie restriction: evidence for different mechanisms of longevity**. Chemical Biology, v. 10, n. 2, 2010.
- FABRIZIO, P.; LONGO, V. **The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae***. Aging Cell, v. 2, p. 73-81, 2003.
- FADINI, G. P.; CEOLOTTO, G.; PAGNIN, E.; KREUTZENBERG, S.; AVOGARO, A. **At the crossroads of longevity and metabolism: the metabolic syndrome and lifespan determinant pathways**. Aging Cell, v. 10, p. 10–17, 2011.
- FARINATTI, P. T. V. **Teorias biológicas do envelhecimento do genético ao estocástico**. Revista Brasileira de Medicina e Esporte, v. 8, n. 4, p. 129-132, 2002.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S., **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo**. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FERREIRA, T. A. A.; RODRIGUES, H. G.; PAIVA, L. R. **Efeitos do envelhecimento sobre o encéfalo**. Revista Brasileira de ciências do Envelhecimento Humano, v. 5, n. 2, p. 46-64, 2008.

FILIPPSEN, E. K.; SANTOS, M. D. B.; MORETO, F.; NUNES, H. R. C.; BURINI, R. C. **Associações do estado nutricional, homocisteinemia e suplementação de folato com a disfunção cognitiva de mulheres idosas.** Revista Brasileira de Nutrição Clínica v. 23, n. 4, p. 243-249, 2008.

FONTANA, L.; PARTRIDGE, L.; LONGO, V. **Extending Healthy Life Span - From Yeast to Humans.** Science, v. 328, n. 16, abr., 2010.

GASCH, A. P., SPELLMAN, P. T., KAO, C. M., CARMEL-HAREL, O., EISEN, M. B., STORZ, G., BOTSTEIN, D. E.; BROWN, P. O. **Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes.** Molecular Biology of the Cell, v. 11, p. 4241-4257, 2000.

GENARO, P. S.; SARKIS, K. S.; MARTINI, L. A. **O efeito da restrição calórica na longevidade.** Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia, v. 53, n. 5, 2009.

GILGUN-SHERKI, Y.; ROSENBAUM, Z.; MELAMED, E.; OFFEN, D., **Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state.** Pharmacological Reviews, v. 54, n. 2, p. 271-284, 2002.

GUARENTE, L. **Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging.** Genes Development, v. 14, p. 1021-1026, 2000.

GUARENTE, L. **Sirtuins, Aging, and Medicine.** The New England Journal of Medicine, v. 364, p. 2235-234, 2011.

GUARIENTI, C.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. **Capacidade antioxidante da microalga Spirulina platensis em células da levedura Saccharomyces cerevisiae submetidas ao estressor Paraquat.** Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 69, n. 1, 2010.

GUSTAW-ROTHENBERG, K.; KOWALCZUK, K.; STRYJECKA-ZIMMER, M. **Lipids' peroxidation markers in Alzheimer's disease and vascular dementia.** Geriatrics and Gerontology International, v. 10, n. 2, p. 161-166, 2010.

GUTIERREZ, D. C.; EISENBERG, T.; BUTTNER, S.; MEISINGER, C.; KROEMER, G.; MADEO, F. **Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines.** Cell Death and Differentiation, v. 17, p. 763-773, 2010.

HAIGIS, M. C.; GUARENTE, L. P. **Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction.** Genes and Development, v. 20, p. 2913-2921, 2006.

HAIGIS, M. C.; SINCLAIR, D. A. **Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance.** Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, v. 5, p. 253-295, 2010.

HALLIWELL, B. **Biochemistry of oxidative stress.** Biochemical Society Transactions, v. 35, n. 5, 2007.

HALLIWELL, B. E.; GUTTERIDGE J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine.** Clarendon Press. Oxford, UK, 1989.

HALLIWELL, B. E.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine. 3 ed,** Oxford University Press, New York, 1999.

HARMAN, D. **The Aging Process.** Medical Sciences, v. 78, n.11, p 7124-7128, 1981.

HECHT, A.; STRAHL-BOLSINGER, S.; GRUNSTEIN, M. **Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin.** Nature, v. 383, p. 92-96, 1996.

HEILBRONN, L. K.; JONGE, L.; FRISARD, M. I.; DELANY, J. P.; LARSON-MEYER, E.; ROOD, J.; NGUYEN, T.; MARTIN, C. K.; VOLAUFOVA, J.; MOST, M. M.; GREENWAY, F. L.; SMITH, S. R.; DEUTSCH, W. A.; WILLIAMSON, D. A.; RAVUSSIN, E. **Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial.** The journal of the American Medical Association, v. 295, n. 13, p. 539-548, 2006.

HENRIKSON, R. **Microalga Spirulina: superalimento del futuro.** Barcelona: Ediciones Urano S. A., 1994.

HENRIQUES, J. A. P. DAFRÉ, A. L.; PICADA, J. N.; MARISA, A. F.; SALVADOR, M. **Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidante em sistemas biológicos.** In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria. Agropecuária, v. 1, p. 227-252, 2001.

HERRANZ, D.; SERRANO, M. **SIRT1: Recent lessons from mouse models.** Cancer, v. 10, p. 819-823, 2010.

HICKMAN, M. A.; RUSCHEL, L. N. **The Sir2-Sum1 Complex Represses Transcription Using Both Promoter-Specific and Long-Range Mechanisms to**

Regulate Cell Identity and Sexual Cycle in the Yeast *Kluyveromyces lactis*. Plos Development v. 5, n. 11, nov., 2009.

HIRAHASHI, T.; MATSUMOTO, M.; HAZEKI, K.; SAEKI, Y.; UI, M.; SEYA, T. **Activation of the human innate immune system by Spirulina: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*.** International Immunopharmacology, v. 2, p. 423-434, 2002.

HOLLOSZY, J. O.; FONTANA, L. **Caloric Restriction in Humans.** Experimental Gerontology, v. 42, n. 8, p. 709- 712, 2007.

HOWITZ, K. T.; BITTERMAN, K. J.; COHEN, H. Y.; LAMMING, D. W; LAVU, S.; WOOD, J. G.; ZIPKIN, R. E.; CHUNG, P. KISIELEWSKI, A.; ZHANG, L. L., SCHERER, B.; SINCLAIR, D. A. **Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan.** Nature, v. 425, n, 11, set., 2003.

IMAI, S.; ARMSTRONG, C. M.; KAEBERLEIN, M.; GUARENTE, L. **Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase.** Nature, v. 403, p. 795-800, 2000.

IZAWA, S.; INOUE Y.; KIMURA, A. **Oxidative stress in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*.** FEBS Letters, v. 368, 73-76, 1995.

JIANG, J. C.; JARUGA, E.; REPNEVSKAYA, M. V.; JASZINSKI, S. M. **An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast.** FASEB Journal, v. 14, p. 2135–37, 2000

JIANG, J. C.; WAWRYN, J.; KUMARA, S.; JAZWINSKI, S. M. **Distinct roles of processes modulated by histone deacetylases Rpd3p, Hda1p, and Sir2p in life extension by caloric restriction in yeast.** Experimental Gerontology, 2002.

KAEBERLEIN, M. **Lessons on longevity from budding yeast.** Nature, v. 464, mar., 2010.

KAEBERLEIN, M., MCVEY, M., GUARENTE, L. **The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms.** Genes Development, v. 13, p. 2570–2580, 1999.

KAEBERLEIN, M.; BURTNER, C. R.; KENNEDY, B. K. **Recent Developments in Yeast Aging.** Plos Genet, v. 3, n. 5, 2007.

KAEBERLEIN, M.; KENNEDY, B. K. **Large-scale identification in yeast of conserved ageing genes.** Mechanisms of Ageing and Development, v. 126, p. 17–21, 2005.

KAEBERLEIN, M.; KIRKLAND, K. T.; FIELDS, S.; KENNEDY, B. K.; **Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast.** Plos Biology, v. 2, n. 9, p. 1381-1387, 2004.

KENYON, C. J. **The genetics of ageing.** Nature, v. 464, p. 504-512. 2010.

KHAN, M.; SHOBHA, J. C.; MOHAN, I. K.; NAIDU, M. U. R.; SUNDARAM, C.; SINGH, S.; KUPPUSAMY, P.; KUTALA, V. K. **Protective effect of Spirulina against doxorubicin-induced cardiotoxicity.** Phytotherapy Research, v. 19, n. 12, p. 1030-1037, 2005.

KIM, H. J.; PARK, K. G.; YOO, E. K.; KIM, Y. H.; KIM, Y. N.; KIM, H. S, KIM H. T; PARK, J. Y.; LEE, K. U.; JANG, W. G.; KIM, J. G.; KIM, B. W.; LEE, I. K.; **Effects of PGC-1alpha on TNF-alpha-induced MCP-1 and VCAM-1 expression and NF-kappaB activation in human aortic smooth muscle and endothelial cells.** Antioxidant Redox Signal, v. 9, n. 3, p. 301-307, 2007.

KIM, M. H.; KIM, W. Y. **The change of lipid metabolism and immune function Korea.** Korean Journal Nutrition, v. 38, p. 67-75, 2005.

KOUBOVA, J.; GUARENTE, L. **How does calorie restriction work?** Genes Development, v. 17, n. 3, p. 313-321, 2003.

LAMMING, D. W.; LATORRE-ESTEVEZ, M.; MEDVEDIK, O.; WONG, S.; TSANG, F. A.; WANG, C.; LIN, S. L.; SINCLAIR, D. A. **Restriction HST2 Mediates SIR2-Independent Life-Span Extension by Calorie Restriction.** Science, v. 309, 2005.

LEADSHAN, J. E.; KOTIADIS, V. N.; TARRANT, C. W. **Apoptosis and the yeast actin cytoskeleton.** Nature Cell Death and Differentiation, v. 17, p. 754–762, 2010.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de Bioquímica.** 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

- LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. **Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 37, n. 3, 2001.
- LIN, S. J.; DEFOSSEZ, P.A.; GUARENTE, L. **Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*,** Science, n. 289, p. 2126-2128, 2000.
- LIN, S. J.; FORD, E.; HAIGIS, M.; LISZT, G.; GUARENTE, L. **Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH.** Genes & Development, v. 18, n.1, p. 12-16, 2004.
- LIN, S. J.; KAEBERLEIN, M., ANDALIS, A. A., STURTZ, L. A., DEFOSSEZ, P. A., CULOTTA, V. C., FINK, G. R., GUARENTE, L. **Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration.** Nature, n. 418, p. 344–348, 2002.
- LIU, Y.; XU, L.; CHENG, N.; LIN, L.; ZHANG, C. **Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia K562 cells.** Journal of Applied Phycology, v. 12, p. 125–130, 2000.
- LONGO, V. D., GRALLA, E. B., VALENTINE, J. S. **Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*.** The Journal of Biological Chemistry, v. 271, n. 21, p. 12275-12280, 1996.
- LOPES, J. P.; OLIVEIRA, S. M.; FORTUNATO, J. S. **Stress oxidativo e seus efeitos na insulino-resistência e disfunção das células pancreáticas: relação com as complicações da Diabetes *Mellitus* Tipo 2.** Acta Médica Portuguesa, v. 21, p. 293-302, 2008.
- LOPEZ-LLUCH G.; HUNT, N.; JONES, B.; ZHU, M.; JAMIESON, H.; HILMER, S.; CASCAJO, M. V.; ALLARD, J.; INGRAM, D. K.; NAVAS, P.; CABO, R. **Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency.** National Academy of Sciences, v. 103, 1768-1773, 2006.
- LU, H. K. et al. **Preventive effects of *Spirulina platensis* on skeletal muscle damage under exercise-induced oxidative stress.** European Journal of Applied Physiology, v. 98, n. 2, p. 220-226, 2006.

MANNARINO, S. C. **O papel do glutatíão no envelhecimento cronológico em *Saccharomyces cerevisiae***. 2005. 104f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MANNARINO, S. C.; AMORIM, M. A.; PEREIRA, M. D.; FERREIRA M. P.; PANEK, A. D., COSTA, V., ELEUTHERIO, E. C. A. **Glutathione is necessary to ensure benefits of caloric restriction during ageing in *Saccharomyces cerevisiae***. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 129, p. 700-705, 2008.

MANNARINO, S. C.; VILELA, L. F.; BRASIL, A. A.; ARANHA, J. N.; PEREIRA, M. D.; FERREIRA M. P.; ELEUTHERIO, E. C. **Requirement of glutathione for Sod I activation during lifespan extension**. *Yeast*, v. 28. p. 9 – 25, 2011.

MASWOOD, N.; YOUNG, J.; TILMONT, E.; ZHANG, Z.; GASH, D. M., GERHARDT, G. A.; GRONDIN, R.; ROTH, G. S.; MATTISON, J.; LANE, M. A.; CARSON, R. E.; COHEN, R. M.; MOUTON, P. R.; QUIGLEY, C.; MATTSON, M. P.; INGRAM, D. K. **Caloric restriction increases neurotrophic factor levels and attenuates neurochemical and behavioral deficits in a primate model of Parkinson's disease**. *National Academy of Sciences*, v. 101, n.52, p. 18171–18176, dez., 2004.

MATHIAS, C. J. **Estudo da função da proteína Alr1 de *Saccharomyces cerevisiae* na desintoxicação de metais**. 2008. 89f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

McCAY, C. M.; CROWEL, M. P.; MAYNARD, L. A. **The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the Ultimate body size**. *The Journal of Nutrition*, v. 10, n. 1, 1935.

MICHISCHITA, E.; McCORD, R. A.; BERBER, E.; KIOI, M.; NASCH, H. P.; DAMIAN, M.; CHEUNG, P.; KUSUMOTO, R.; KAWAHARA, T. L. A.; BARRETT, J. C.; CHANG, H. C.; BOHR, V. A.; RIED, T.; GOZANI, O.; CHUAL, K. F. **SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin**. *Nature*, v. 452, n. 7186, p. 492-496, 2008.

MICHISHITA, E.; PARK, J. Y.; BURNESKIS, J. M.; BARRETT, J. C.; HORIKAWA, I. **Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins**. *Molecular Biology of the cell*, v. 16, p. 4623–4635, 2005.

- MIN, K. J.; FLATT, T.; KULAOTS, I.; TATAR, M. **Counting Calories in Drosophila Diet Restriction.** *Experimental Gerontology*, v. 42, n. 3, p. 247-251, 2007.
- MIN, K. J.; TATAR, M. **Drosophila diet restriction in practice: Do flies consume fewer nutrients? Mechanisms of Ageing and Development**, v. 127, p. 93-96, 2006.
- MONTAGNER, S.; COSTA, A. **Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento.** *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 84, n. 3, p. 263-269, 2009.
- MOREIRA, A. V. B; MANCINI-FILHO, J. **Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos.** *Revista de Nutrição*, v. 17, p. 411-424, 2004.
- MOTA, M. P.; FIGUEIREDO, P. A; DUARTE, J. A. **Teorias biológicas do envelhecimento.** *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, v. 4, n. 1, p. 81-110, 2004.
- MOTA, S. M. Q.; PORTO, D. B.; FREITAS, M. V. C.; NOGUEIRA, J. A. Q. **Imunossenescência: alterações imunológicas no idoso.** *Revista Brasileira de Medicina*, v. 67, n. 6, p. 183-188, jun., 2009.
- NAKAGAWA, T.; GUARENTE, L. **Sirtuins at a glance.** *Journal of Cell Science*, v. 124, p. 833-838, 2011.
- NISOLI, E.; TONELLI, C.; CARDILE, A.; COZZI, V.; BRACALE, R.; TEDESCO, L.; FALCONE, S.; VALÉRIO, A.; CANTONI, O.; CLEMENTI, E.; MONCADA, S.; CARRUBA, M. **Calorie Restriction Promotes Mitochondrial Biogenesis by Inducing the Expression of Enos.** *Science*, v. 310, 2005.
- NORRIS, A.; BOEKE, J. B. **Silent information regulator 3: the Goldilocks of the silencing complex.** *Genes Development*, v. 24, p. 115-122, 2010.
- NOVAES, M. R. C. G.; ITO, M. K.; ARRUDA, S. F.; RODRIGUES, P.; LISBOA, A. Q. **Suplementação de micronutrientes na senescência: implicações nos mecanismos imunológicos.** *Revista de Nutrição*, v. 18, n. 3, p. 367-376, 2005.
- OZDEMIR, G.; KARABAY, N. U.; DALAY, M. C.; PAZARBASI. **Antibacterial Activity of Volatile Component and Various Extracts of Spirulina platensis.** *Phytotherapy Research*, v. 18, p. 754-757, 2004.

- PÁDULA, M.; BOITEUX, S. **Photodynamic DNA damage induced by phycocyanin and its repair in *Saccharomyces cerevisiae***. Brazilian Journal of Medical and Biological, v. 32, p. 1063-1071. 1999.
- PALLÁS, M.; JUNYENT, F.; VERDAGUER, E.; BEAS-ZARATE, C.; CAMINS, A. **Aging control with resveratrol**. Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies, v. 30, n. 10, 2011.
- PANG, Q. S.; GUO, B. J.; RUAN, GUO, J. H. **Enhancement of endonuclease activity and repair DNA synthesis by polysaccharide of *Spirulina platensis***. I Chuan Hsuch Pao, v. 15, p. 374-381, 1998.
- PARISI, A. S.; YOUNES, S.; REINEHR, C. O.; COLLA, L. M. **Avaliação da atividade antibacteriana da microalga *Spirulina platensis***. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 30, n. 3, p. 297-301, 2009.
- PATEL, A.; MISHRA, S.; GHOSH, P. K. **Antioxidant potential of C-phycocyanin isolated from cyanobacterial species *Lyngbya*, *Phormidium* and *Spirulina* spp.** Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, v. 43, p. 25-32, 2006.
- PEREIRA, M.D. **Possíveis sensores envolvidos na aquisição de tolerância ao estresse oxidativo em *Saccharomyces cerevisiae***. 2003. 83f. Dissertação (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro
- PIPER, P. W. **Long-lived yeast as a model for ageing research**. Yeast, v. 23, p. 215-226, 2006.
- PLETCHER, S. D., MACDONALD, S. J., MARGUERIE, R., CERTA, U., STEARNS, S. C., GOLDSTEIN, D. B. PARTRIDGE, L. **Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster***. Current Biology, v. 12, p. 311-312, 2002.
- POTTER, T. M.; NEUN, B. W.; STERN, S. T. **Assay to detect lipid peroxidation upon exposure to nanoparticles**. Methods in Molecular Biology, v. 697, n. 181-189, 2011.
- POULSEN, H. E.; PRIEME, H.; LOFT, S. **Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion**. European Journal of Cancer Prevention, Oxford, n. 1, v. 7, p. 9-16, 1998.

PREMKUMAR, K.; PACHIAPPAN, A.; ABRAHAM, S. K.; SANTHIYA, S. T.; GOPINATH, P. M.; RAMESH, A. **Effect of Spirulina fusiformis on cyclophosphamide and mitomycin-C induced genotoxicity and oxidative stress in mice.** Fitoterapia, v. 72, p. 906-911, 2001

RAHAT, O.; NOAM M.; COHEN H. **Multiple Pathways Regulating the Calorie Restriction Response in Yeast.** The Journal of Gerontology, v. 66, n. 2, p. 163-169, 2010.

REBELATTO, J. R.; JIMENEZ, R.; DELGADO, M.; MURGUEZA, B.; MUNOZ, M.; GALAN, A.; SANCHEZ, R. M.; AENILLAS, J. I. C. **Antioxidantes, Atividade Física e Estresse Oxidativo em Mulheres Idosas.** Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v. 14, n. 1, 2008.

REIS, J. S.; VELOSO, C. A.; MATTOS, R. T.; PURISH, S.; MACHADO, J. A. N. **Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1.** Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia, v. 52, n. 7, 2008.

REVERTER-BRANCHAT, G., CABISCOL, E., TAMARIT, J.; ROS, J. **Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: common targets and prevention by calorie restriction.** Journal of biological chemistry, v. 279, p. 31983–31989, 2004.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture.** Boston: CRC Press; 1990.

RISS, J.; DÉCORDÉ, K.; SUTRA, T.; DELAGE, M. BACCOU, C.; JOUY, N.; BRUNELL, J.P.; OREAL III, H.; CRISTOL, J. P.; ROUANET, J. M. **Phycobiliprotein C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* Is Powerfully Responsible for Reducing Oxidative Stress and NADPH Oxidase Expression Induced by an Atherogenic Diet in Hamsters.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 55, n. 19, p. 7962–7967, 2007.

ROMAY, L. C.; REMIREZ, D.; GONZÁLEZ, R. L. **Actividad antioxidante de la ficocianina frente a radicales peroxílicos y la peroxidación lipídica microsomal.** Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, v. 20, n.1, p. 38-41, 2001.

ROY, P.; KULKARNI, A. P. **Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: effect of selected chemicals.** Food Chemical Toxicology, Oxford, v. 34, n. 6, p. 563-570, 1996.

SAMPAIO, R. C.; MORAES, C. **Estresse oxidativo e envelhecimento: papel do exercício físico.** Motriz, v. 16, n. 2, p. 506- 515, 2010

SCAZUFCA, M.; CERQUEIRA, A. T. A. R.; MENEZES, P. R.; PRINCE, M.; VALLADA, H. P.; MIYAZAKI, M. C. O. S.; DOMINGOS, N. A. M.; ANTUNES, E. H.; MACEDO, G. C.; ALMEIDA, S. A.; MATSUDA, C. M. C. B. **Investigações epidemiológicas sobre demência nos países em desenvolvimento.** Revista Saúde Pública, v. 36, n. 6, 2002.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. **Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico.** Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.

SCHOEFTNER, S.; BLASCO, M. A. **A 'higher order' of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs.** The Embo Journal, v. 28, p. 2323–2336, 2009.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. **Licopeno como agente antioxidante.** Revista de Nutrição, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SHARMA, S.; SHARMA, S.; SHARMA, K. P. **Protective role of Spirulina feed in a freshwater fish (Poecilia reticulata Peters) exposed to an azo dye-methyl red.** Indian Journal of Experimental Biology, v. 43, n. 12, p. 1165-1169, 2005.

SHARMAN, I. M.; DOWN, M. G.; SEN, R. N. **The effects of vitamin E and training on physiological function and athletic performance in adolescent swimmers.** The British Journal of Nutrition, n. 26, v. 2, p. 265-276, 1971.

SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M.; AMES, B. N., **Oxidative damage and mitochondrial decay in aging.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 91, n. 23, p. 10771-10778, 1994.

SHIH, C. M.; CHENG, S. N.; WONG, C. S.; KUO, Y. L.; CHOU, T. C. **Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycoyanin.** Anesthesia and Analgesia, v. 108, p. 1303-1310, 2009.

SIES, H. **Glutathione and its role in cellular functions.** American Journal of Medicine, v. 30, n. 91, p. 31-38, 1991.

SILVA, D. G.; RIGER, C. J.; PINTO, M. L. C.; PANEK, A. D. ELEUTHERIO, E. C. A. **Evaluation of the role of Ace1 and Yap1 in cadmium absorption using the**

eukaryotic cell model *Saccharomyces cerevisiae*. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 20, p. 383-389, 2005.

SINCLAIR, D. A.; GUARENTE, L. **Extrachromosomal rDNA circles - a cause of aging in yeast.** Cell, v. 91, p. 1-20, 1997.

SIXABELA, P. S. S.; CHIVANDI, E.; BADENHORST, M.; ERLWANGER, K. H. **The Effects of Dietary Supplementation with *Spirulina platensis* in Growing Rats.** Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, v. 6, n. 6, p. 609-617.

SMITH, D. L.; McCLURE, J. M.; MATECIC, M.; SMITH, J. S. **Calorie restriction extends the chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae* independently of the Sirtuins.** Aging Cell, v. 6, p. 649-662, 2007.

SMITH, E. D.; KENNEDY, B. K.; KAEBERLEIN, M. **Genome-wide identification of conserved longevity genes in yeast and worms.** Mechanisms Ageing Development, v. 128, p. 106–111, 2007.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, C. A.; SALVADOR, M., **Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.** Revista Brasileira de Farmacologia, v. 41, n. 1, jan/mar., 2005.

SOARES, S. E. **Ácidos fenólicos como antioxidantes.** Revista de Nutrição, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOHAL, R. S.; WEINDRUCH, R. **Oxidative stress, caloric restriction, and aging.** Science, v. 273, p. 59–63, 1996.

STEELS, E. L.; LEARMONTH, R. P.; WATSON, K. **Stress tolerance and membrane lipid insaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically.** Microbiology. 140:569-76, 1994.

STELLA, F.; GOBBI, S.; CORAZZA, D. I.; COSTA, J. L. R. **Depressão no Idoso: Diagnóstico, Tratamento e Benefícios da Atividade Física.** Motriz, v. 8, n. 3, p. 91-98, 2002.

THAAKUR, S.; SRAVANTHI, R. **Neuroprotective effect of *Spirulina* in cerebral ischemia-reperfusion injury in rats.** Journal of Neural Transmission, v. 117, n. 9, p. 1083-1091, 2010.

UNNIKRISHNAN, A.; GAFKEN, P. R.; TSUKIYAMA, T. **Dynamic changes in**

histone acetylation regulate origins of DNA replication. Nature Structural e Molecular Biology, v. 17, n. 4, 2010.

VASCONCELOS, S., M., L.; GOULART, M., O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. **Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação.** Química Nova, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VOET, D.; VOET, J.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica.** Porto Alegre: ArtMed, 2000.

WEINDRUCH, R. **The Retardation of Aging by Caloric Restriction: Studies in Rodents and Primates.** Toxicologic Pathology, v. 24, n. 6, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Envelhecimento Ativo: uma política de saúde. Brasília (DF): Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The World Health Report. World Health Organization, 2000

YAMAMOTO H, SCHOONJANS K, AUWERX J. **Sirtuin functions in health and disease.** Molecular and Cellular Biology, v. 21, n. 8, p. 1745-55, 2007.

YILDIRIM, A.; KOTAN, D.; YILDIRIN, S.; AYGUL, R.; AKÇAY, F. **Increased lipid peroxidation and decreased antioxidant response in serum and cerebrospinal fluid in acute ischemic stroke.** Turkey Journal Medicine Science. v. 37, n. 2, 2007.