



Inês Daniela Fernandes Gandarez Moreira

Estratégias e Mecanismos para Aumentar a Longevidade

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Cláudia Margarida Gonçalves Cavadas e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Inês Daniela Fernandes Gandarez Moreira

Estratégias e Mecanismos para Aumentar a Longevidade

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
Orientada pela Professora Doutora Cláudia Margarida Gonçalves Cavadas e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Inês Daniela Fernandes Gandarez Moreira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº2010131431, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 10 de Setembro de 2015

(Inês Daniela Fernandes Gandarez Moreira)

Agradecimentos

À minha família por todo o apoio incondicional,

Às minhas amigas de sempre, Cláudia, Inês e Nádia por me apoiarem e estarem presentes em todos os momentos importantes da minha vida,

À Sara, Diana e todos os meus amigos presentes neste meu percurso académico,

Ao Mica pela enorme paciência e incentivo,

À Professora Cláudia Cavadas por toda a orientação,

Muito obrigada!

Índice

Resumo	2
Abstract	2
Lista de abreviaturas	3
Introdução	5
Marcadores moleculares e celulares do envelhecimento.....	6
Ritmo circadiano	9
Mecanismo molecular do ritmo circadiano	10
Alterações no ritmo circadiano: consequências no envelhecimento	12
Restrição calórica	14
Mecanismos moleculares	14
Inter-relação entre restrição calórica, ritmo circadiano e longevidade.....	18
Parabiose	19
Perspetivas futuras: parabiose heterocrónica “aplicada” a humanos	21
Fármacos no aumento da longevidade	21
Rapamicina	22
Resveratrol.....	23
Metformina.....	23
Conclusão.....	24
Referências bibliográficas	26

Resumo

Nas últimas décadas observou-se um aumento considerável do número de pessoas com mais de 60 anos, com patologias crônicas associadas. A procura de estratégias que proporcionem um aumento da longevidade com qualidade de vida é de extrema importância. Neste sentido, o estudo de estratégias como a Restrição Calórica, a regulação do Ritmo Circadiano e a aplicação dos conhecimentos adquiridos do estudo da Parabiose têm revelado resultados na diminuição das patologias associadas ao envelhecimento. Os mecanismos exatos de atuação continuam em parte por esclarecer, contudo existem evidências de que: a restrição calórica protege contra a deterioração de certas funções biológicas e reduz o risco de desenvolvimento de muitas doenças características da idade; a expressão génica é influenciada pelo ritmo circadiano e a alteração do mesmo pode desencadear patologias relacionadas com o envelhecimento, como défice cognitivo, cancro e diabetes tipo 2; os roedores mais velhos em contacto com um meio sistémico de animais mais jovens apresentam um decréscimo de algumas características do envelhecimento. Assim, fármacos que proporcionem uma diminuição das “doenças do envelhecimento” e um aumento da longevidade podem ter, num futuro próximo, um papel fulcral na sociedade.

Palavras-chave: Restrição calórica; Ritmo circadiano; Parabiose; Envelhecimento; Longevidade.

Abstract

In the last few decades, it was observed a significant increase of the number of people with more than 60 years old, with chronic diseases. The search for strategies that provides longevity with quality of life is utmost important. The study of strategies such as Caloric Restriction, Circadian Rhythm regulation and the knowledge applied from the study of Parabiosis have shown results in the decrease of diseases related with aging. The mechanisms are not yet completely clarified, however there are evidences that: the caloric restriction without delays or prevent deterioration of some biological functions and decreases the risk of aging-related diseases; the gene expression is influenced by circadian rhythm and modifications thereof may initiate aging-related diseases such as cognitive decline, cancer or type 2 diabetes; older rodents in contact with a systemic environment of one younger animals exhibit a decrease of some aging characteristics.

Therefore, drugs that provide a decrease in aging-related diseases and an increase of longevity could play a crucial role in society, for the near future.

Keywords: Caloric Restriction; Circadian Rhythm; Parabiosis; Age-related; Longevity.

Lista de abreviaturas

- AMP** – Adenosina Monofosfato
- AMPK** – *Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase*
- ATP** – Adenosina Trifosfato
- BMAL1** – *Brain and Muscle ARNT-Like protein-1*
- CCGs** – *Circadian-Clock-Controlled genes*
- CCL11** – Eotaxina-1
- CLOCK** – *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*
- CRY** – *Cryptochrome*
- CRY1** – *Cryptochrome 1*
- CRY2** – *Cryptochrome 2*
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- FOXO** – *Forkhead transcription factor*
- GDF11** – *Growth Differentiation Factor 11*
- GH** – Hormona de crescimento
- IGF-1** – Fator de crescimento da Insulina tipo 1
- mRNA** – Ácido Ribonucleico mensageiro
- mTOR** – *mammalian Target Of Rapamycin*
- mTORC1** – *mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*
- mTORC2** – *mammalian Target Of Rapamycin Complex 2*
- NAD⁺** – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
- NF-κB** – *Nuclear Factor kappa B*
- NPAS2** – *Neuronal PAS Domain Protein 2*
- NRF2** – *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
- NSQ** – Núcleo Supraquiasmático

PER – *Period*

PER1 – *Period 1*

PER2 – *Period 2*

PER3 – *Period 3*

PGC-1 α – *Peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1 α*

PGE2 – *Prostaglandin E2*

PGI2 – *Prostaglandin I2*

PI3K/Akt/PDK-1 – *Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Phosphoinositide-Dependent Kinase-1*

PPAR α – *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α*

PPAR γ – *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ*

RC – *Restrição Calórica*

Rev-Erb α – *Reverse Erythroblastosis virus α*

ROR – *Recetor orfão relacionado com o ácido retinóico*

ROS – *Espécies Reativas de Oxigênio*

SIRT-1 – *Proteína reguladora silenciosa de informação 1*

SIRT-3 – *Proteína reguladora silenciosa de informação 3*

SIRT-4 – *Proteína reguladora silenciosa de informação 4*

SIRT-5 – *Proteína reguladora silenciosa de informação 5*

SIRT-6 – *Proteína reguladora silenciosa de informação 6*

SIRT-7 – *Proteína reguladora silenciosa de informação 7*

SNC – *Sistema Nervoso Central*

TERT – *Telomerase reverse transcriptase*

TGF- β – *Transforming Growth Factor β*

TNF- α – *Fator de necrose tumoral α*

TXA2 – *Tromboxano A2*

Introdução

Nas últimas décadas constatou-se um aumento significativo da esperança média de vida das populações, sobretudo nos países desenvolvidos. Atualmente, cerca de 901 milhões de pessoas têm mais de 60 anos, o equivalente a 12% da população mundial. O número de pessoas com mais de 60 anos cresce a uma taxa de 3,26% por ano, podendo atingir os 1400 milhões já em 2030 (United Nations, 2015). Em Portugal, 27,1% da população tem mais de 60 anos (United Nations, 2015), o que pode conduzir a uma grande mudança no paradigma social tendo em conta a diminuição do número de pessoas em idade ativa.

A diminuição do número de doenças associadas à idade é hoje um fator imperativo, para um envelhecimento saudável e consequente aumento da longevidade.

O conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de envelhecimento é um dos temas que tem interessado a comunidade científica. A investigação do processo de envelhecimento tem como objetivos principais a compreensão dos mecanismos moleculares que o causam e o desenvolvimento de estratégias para intervir nestes processos com a finalidade de retardar o aparecimento de doenças relacionadas com a idade e aumentar a longevidade (Kaeberlein, 2010).

Nos últimos anos têm sido propostos inúmeros mecanismos celulares e moleculares que contribuem para o envelhecimento, como por exemplo: mutações no DNA nuclear e mitocondrial, erros na maturação das proteínas e agregação destas, espécies reativas de oxigénio, entre outros. Em modelos laboratoriais como *Saccharomyces cerevisiae*, o *Caenorhabditis elegans*, a *Drosophila melanogaster*, o *Mus musculus* é possível retardar o envelhecimento e aumentar a longevidade através da manipulação genética ou ambiental (Kaeberlein, 2010).

O combate à progressão das doenças associadas ao envelhecimento com o consequente aumento da longevidade é hoje um dos principais objetivos da medicina moderna. A investigação científica está cada vez mais centrada na procura de estratégias e mecanismos para alcançar este objetivo. Assim, temas como a Restrição Calórica, Ritmo Circadiano e Parabiose têm tido cada vez mais atenção por parte da comunidade científica, uma vez que estes ajudam a compreender o processo de envelhecimento e em que medida este pode ser modulado no sentido do aumento da longevidade.

Marcadores moleculares e celulares do envelhecimento

O envelhecimento é caracterizado por uma perda gradual e irreversível da integridade fisiológica, que leva à perda de certas funções do organismo, aumentando desta forma a vulnerabilidade à morte. Esta deterioração é o principal fator de risco para as principais patologias humanas (López-Otín *et al.*, 2013).

A investigação nesta área tem evoluído exponencialmente nos últimos anos, particularmente com a descoberta de que o envelhecimento pode ser desacelerado, em certa medida, por vias genéticas e pelos processos bioquímicos conservados na evolução (López-Otín *et al.*, 2013).

Neste sentido, López-Otín *et al.* (2013) propuseram nove marcadores moleculares e celulares do envelhecimento:

a) Instabilidade genómica: A acumulação de alterações genéticas (a nível do DNA nuclear e mitocondrial) ao longo da vida é um denominador comum do envelhecimento. A integridade e a estabilidade do DNA são continuamente modificadas por agentes exógenos (físicos, químicos e biológicos) e endógenos (erros de replicação, reações espontâneas de hidrólise e espécies reativas de oxigénio), que dão origem a “lesões genéticas”. Estas “lesões genéticas” incluem mutações pontuais, translocações cromossómicas, encurtamento dos telómeros, entre outras. As células possuem mecanismos de reparação do DNA que minimizam estas “lesões”. A ocorrência de falhas nestes mecanismos acelera o envelhecimento (López-Otín *et al.*, 2013).

b) Deterioração dos telómeros: Durante a replicação a DNA polimerase não tem capacidade de replicar completamente as extremidades das moléculas de DNA. Esta tarefa é realizada por uma polimerase especializada, a telomerase. No entanto, a maioria das células somáticas dos mamíferos não expressam a telomerase e isso leva à perda progressiva e cumulativa das sequências dos telómeros e conseqüentemente à perda da proteção das extremidades dos cromossomas. Em murganhos e humanos ocorre encurtamento dos telómeros com o decorrer do envelhecimento. A deficiência da telomerase em humanos está associada ao desenvolvimento prematuro de várias doenças (fibrose quística, anemia aplásica, etc.), bem como a um risco aumentado de mortalidade (López-Otín *et al.*, 2013).

c) Alterações epigenéticas: Vários estudos indicam que o envelhecimento é acompanhado por várias mudanças epigenéticas, alterações essas que afetam todas as células

e tecidos ao longo da vida e envolvem alterações nos padrões de metilação do DNA, modificações pós-translacionais das histonas e remodelação da cromatina. O aumento da acetilação da histona H4K16, a trimetilação da H3K4 e da H4K20 ou a diminuição da metilação da H3K9 e da H3K27 constituem marcas epigenéticas associadas à idade (López-Otín *et al.*, 2013).

d) Perda da Proteostase: Todas as células têm uma variedade de mecanismos de controlo de qualidade para preservar a estabilidade e funcionalidade dos seus proteomas. A proteostase envolve mecanismos para a estabilização de proteínas (como as proteínas de choque térmico), mecanismos para a sua degradação (lisossomas) e reguladores de proteotoxicidade relacionada com a idade (atuam através de vias alternativas, a partir chaperonas moleculares e proteases). A perturbação da homeostase proteica precipita algumas patologias associadas à idade, o que evidencia a sua ligação ao envelhecimento. Além disso, muitos estudos têm demonstrado que a proteostase se altera com o envelhecimento (López-Otín *et al.*, 2013). A presença de proteínas com alterações conformacionais ou a formação de agregados de proteínas contribuem para o desenvolvimento de algumas patologias relacionadas com a idade, como é o caso das doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, etc.) (Balch *et al.*, 2008; Powers *et al.*, 2009).

e) Desregulação dos sensores de nutrientes: O eixo somatotrópico em mamíferos compreende a hormona do crescimento (GH), produzida pela hipófise anterior e o fator de crescimento da insulina tipo I (IGF-I), produzido em resposta à GH por diversos tipos de células, principalmente por hepatócitos. A via de sinalização intracelular do IGF-I é a mesma que a induzida pela insulina, que tem como função informar as células da presença de glucose. Por essa razão, esta via é conhecida como “via de sinalização Insulina/IGF-I”. A via de sinalização Insulina/IGF-I é a via mais bem conservada ao longo da evolução no controlo do envelhecimento, bem como os seus *targets*, como os fatores de transcrição FOXO e a cinase mTOR, que também estão envolvidos no envelhecimento (López-Otín *et al.*, 2013).

Os polimorfismos genéticos ou as mutações que reduzem as funções desta via têm sido associados a um aumento da longevidade, tanto em humanos como em organismos modelo (López-Otín *et al.*, 2013).

Para além desta via existem mais três vias de sensores de nutrientes: a mTOR, que deteta concentrações elevadas de aminoácidos; a AMPK, que deteta estados de baixa energia através da deteção de níveis elevados de AMP e as Sirtuínas, que detetam os estados de baixa energia através da deteção de altos níveis de NAD⁺ (López-Otín *et al.*, 2013).

A cinase mTOR regula praticamente todos os aspetos do metabolismo anabólico. Esta via, em conjunto com a via de sinalização Insulina/IGF-I, possui uma intensa atividade anabólica que acelera o envelhecimento. As outras duas vias, a AMPK e as Sirtuínas, agem na direção oposta a estas, sinalizando a escassez e o catabolismo de nutrientes em vez de abundância de nutrientes e o anabolismo. Por conseguinte, a sua sobre-regulação favorece o envelhecimento saudável (López-Otín *et al.*, 2013).

f) Alterações Mitocondriais: A eficácia da cadeia respiratória tende a diminuir com o envelhecimento, pois há um aumento da fuga de eletrões e uma consequente diminuição da produção de ATP. As disfunções mitocondriais têm um profundo impacto no processo de envelhecimento pois existe uma alteração da dinâmica mitocondrial e, consequentemente, um aumento da produção de espécies reativas de oxigénio e uma diminuição da biogénese mitocondrial e da mitofagia, o que favorece a aceleração do envelhecimento (López-Otín *et al.*, 2013).

g) Senescência Celular: Em organismos jovens a senescência celular evita a proliferação de células danificadas, o que impede a formação de tumores e contribui para a homeostase dos tecidos. Em organismos envelhecidos, as células senescentes acumulam-se, uma vez que há uma diminuição da capacidade de depuração e da reposição destas. Estes fatores contribuem para uma série de efeitos prejudiciais para a homeostase dos tecidos, o que contribui para o processo de envelhecimento (López-Otín *et al.*, 2013).

h) Exaustão das células estaminais: O declínio do potencial regenerativo dos tecidos é uma das características mais evidentes do envelhecimento. Este declínio tem consequências em vários tecidos, como por exemplo: o desenvolvimento de anemias e mielodisplasias devido à diminuição de células estaminais hematopoiéticas e a diminuição da reparação das fibras musculares devido à diminuição das células satélite (López-Otín *et al.*, 2013).

A diminuição da capacidade proliferativa das células estaminais constitui, provavelmente, um dos mecanismos mais relevantes do envelhecimento dos tecidos e do organismo (López-Otín *et al.*, 2013).

i) Alteração da comunicação intercelular: O envelhecimento também envolve alterações ao nível da comunicação intercelular, seja endócrina, neuroendócrina ou neuronal. Desta forma, a sinalização neuro-hormonal tende a ser desregulada durante o

envelhecimento, com aumento das reações inflamatórias, diminuição da imunovigilância contra agentes patogênicos e células pré-malignas e alteração da composição do ambiente extracelular, afetando assim as propriedades mecânicas e funcionais de todos os tecidos (López-Otín *et al.*, 2013).

Ritmo circadiano

Os seres vivos desenvolveram muitos sistemas que garantiram a adaptação adequada às constantes mudanças das condições ambientais. Assim, o ciclo de luz levou à criação endógena de um sistema de temporização que sincroniza vários processos biológicos com ambiente circundante. O ritmo circadiano - do latim *circa* (cerca de) + *diem* (dia) - é capaz de gerar 24 horas de periodicidade de vários processos biológicos, como a atividade locomotora, o ciclo do sono-vigília, o metabolismo do fígado, pressão arterial, temperatura corporal, secreção de hormonas e peptídeos, entre outros (Kondratov, 2007).

O ritmo circadiano é organizado por uma cascata hierárquica que começa no sistema nervoso central e acaba nos tecidos periféricos. A nível central, o relógio circadiano é regulado por um grupo de neurónios - *master pacemaker neurons* - localizados no núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo anterior (Popa-Wagner *et al.*, 2013). O *master pacemaker* (relógio central) origina um ritmo circadiano interno que influencia a expressão génica, a modificação de proteínas e a secreção de hormonas. Este também gera atividade elétrica rítmica e produz sinais de sincronismo, que controlam os chamados relógios periféricos, que estão localizados noutras áreas do cérebro, bem como nos tecidos/órgãos periféricos como o tecido adiposo, fígado, coração, músculos, entre outros (Figura 1). A atividade rítmica do NSQ é sincronizada pela presença de luz, através de sinais externos, via retina (Kondratova e Kondratov, 2012). Contudo, a estimulação por outros fatores, como as horas das refeições e a composição da dieta alimentar, também influenciam o relógio circadiano (Orozco-Solis e Sassone-Corsi, 2014).

Os tecidos periféricos geram processos fisiológicos rítmicos que são orquestradas pelo NSQ e sincronizados com o ambiente, proporcionando, deste modo, a atividade ou a resposta ideal às necessidades do organismo no momento específico do dia (Kondratova e Kondratov, 2012).

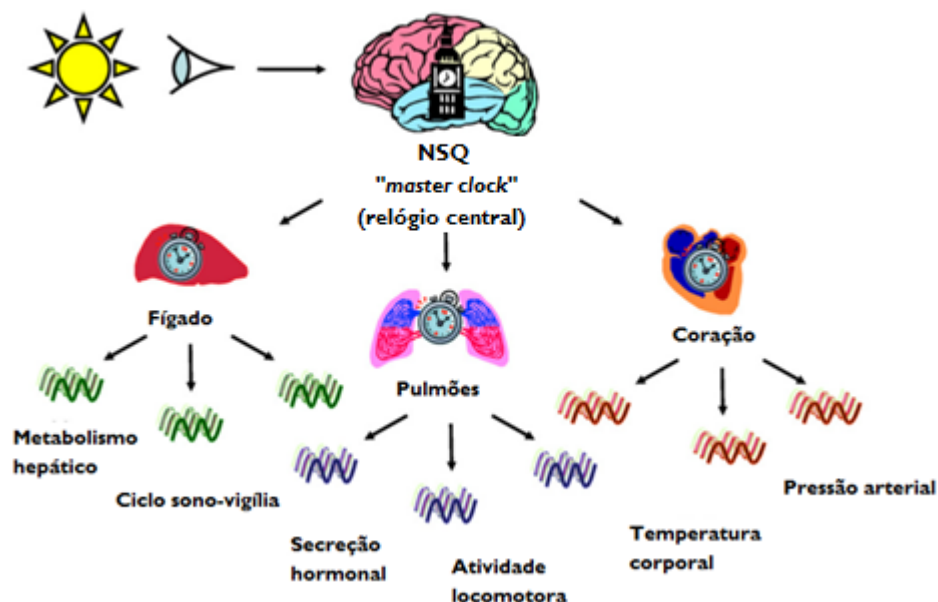


Figura 1- Organização hierárquica do relógio circadiano nos mamíferos. O “master clock” (relógio central) está localizado no núcleo supraquiasmático (NSQ). O relógio central é influenciado pela luz e sincroniza os relógios circadianos nos órgãos periféricos (adaptado de Kondratov, 2007).

Mecanismo molecular do ritmo circadiano

O ritmo circadiano é produzido por uma série de genes específicos, os *clock genes*, que cooperam entre si e se auto-regulam, gerando ritmos que oscilam com o período circadiano (Reppert e Weaver, 2002). Os *clock genes* incluem: o *circadian locomotor output cycles kaput* (Clock), *brain and muscle Arnt-like protein-1* (Bmal1), *Period 1* (Per1), *Period 2* (Per2), *Period 3* (Per3), *Cryptochrome 1* (Cry1) e *Cryptochrome 2* (Cry2). Muitos produtos derivados dos *clock genes* funcionam como fatores de transcrição, possuindo um domínio PAS (*Per-Arnt-Single-minded*) e bHLH (*basic helix-loop-helix*) que estão envolvidos nas interações proteína-proteína e proteína-DNA, respectivamente (Froy e Miskin, 2010). Estes fatores de transcrição têm a capacidade de ativar ou reprimir a sua própria expressão, constituindo uma rede interligada e auto-sustentada de *loops* de feedbacks de transcrição e tradução (Froy e Miskin, 2010; Orozco-Solis e Sassone-Corsi, 2014). A sua regulação é realizada através de alterações na concentração das proteínas, modificações pós-traducionais (fosforilação, acetilação, desacetilação, SUMOilação - *small ubiquitin-like modifier*) e atrasos entre a transcrição e tradução (Froy e Miskin, 2010).

A expressão dos *clock genes* pode dar origem a reguladores positivos (BMAL1, CLOCK, NPAS2, RORs) ou negativos (CRYs, PERs, Rev-Erb α) da transcrição (Kondratova e Kondratov, 2012).

No murganho, o primeiro produto identificado derivado de um *clock gene* foi o fator de transcrição CLOCK, que dimeriza com o BMAL1 para ativar a transcrição (Froy, 2007). O heterodímero BMAL1-CLOCK liga-se à sequência E-box (localizada na região promotora dos genes *Per* e *Cry*) e ativa a transcrição dos genes *Period* e *Cryptochrome*. Este heterodímero regula igualmente a expressão dos CCGs, que codificam diversas substâncias como a vasopressina, neuropeptídeos, neurotransmissores, hormonas, fatores de transcrição, moléculas de sinalização intracelular, etc. (Duffield, 2003). O BMAL1 também consegue dimerizar com outro homólogo do CLOCK, o NPAS2, ativando a transcrição e assegurando a ritmicidade de igual modo. A expressão e posterior tradução dos genes *Cry* e *Per* origina a formação do complexo PER-CRY que, ao atingir uma determinada concentração, inibe a atividade do BMAL1-CLOCK e, conseqüentemente, a sua própria expressão (Froy e Miskin, 2007; Froy, 2011; Kondratova e Kondratov, 2012). Assim, os níveis de mRNA e de suas respectivas proteínas, PERs e CRYs, vão decrescendo até a sua concentração se tornar insuficiente para reprimir a atividade do heterodímero BMAL1-CLOCK, que desta forma volta a ativar a transcrição, reiniciando um novo ciclo (Lima e Vargas, 2014). O Rev-Erb α e o RORs (regulador negativo e positivo do gene *Bmal1*, respetivamente) representam um *loop* adicional, tendo como função estabilizar o *loop* principal (Figura 2) (Kondratova e Kondratov, 2012).

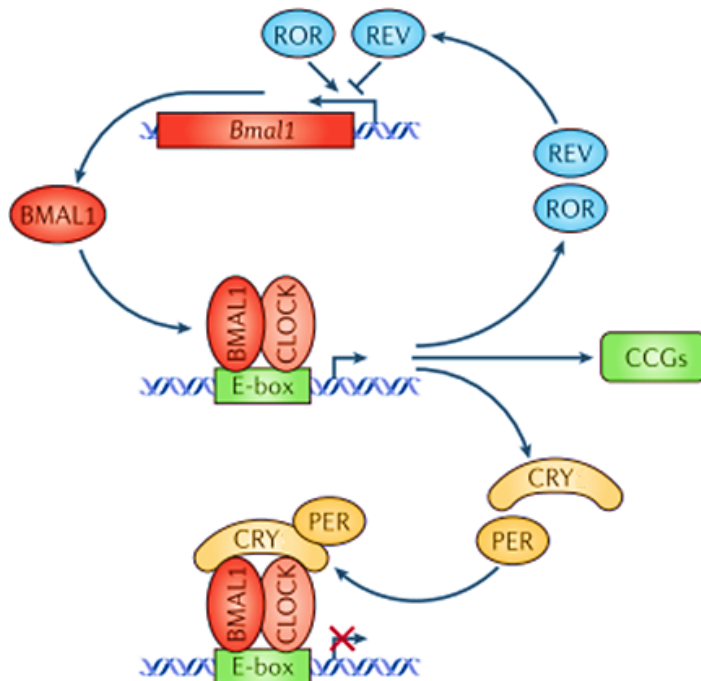


Figura 2 - Mecanismo molecular do ritmo circadiano. Os reguladores positivos e negativos estão representados a vermelho e amarelo. Os estabilizadores do ritmo circadiano estão representados a azul.

O fator de transcrição BMAL1 ao dimerizar com o CLOCK ativa a expressão dos genes *Period* e *Cryptochrome*. As proteínas PER e CRY formam um complexo, que inibe a atividade do heterodímero BMAL1-CLOCK e, conseqüentemente, a sua própria expressão. O Rev-Erb α (regulador negativo do *Bmal1*) e RORs (regulador positivo do *Bmal1*) representam um *loop* adicional, que tem como função estabilizar o *loop* principal. O heterodímero BMAL1-CLOCK regula de igual modo a expressão dos CCGs (adaptado de Kondratova e Kondratov, 2012).

Alterações no ritmo circadiano: consequências no envelhecimento

Muitos processos fisiológicos e moleculares são regulados pelo ritmo circadiano (Moller-Levet *et al.*, 2013).

A alteração do ritmo circadiano está associada a problemas de saúde como a obesidade, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, défice cognitivo, aumento da carcinogénese, distúrbios do sono e envelhecimento precoce. Contudo, os mecanismos envolvidos permanecem em grande parte inexplorados (Buxton *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014).

Estudos de *Microarrays* demonstram que 5-10% da transcrição génica é realizada com 24h de periodicidade (Yu e Weaver, 2011). Embora o ciclo sono-vigília seja gerado pelo cérebro, os efeitos da restrição do sono não estão limitados a este órgão. O transcriptoma do fígado é afetado numa maior escala do que o transcriptoma cerebral (Moller-Levet *et al.*, 2013). A análise do transcriptoma revela que a expressão de cerca 711 genes é influenciada pela restrição do sono. Estes genes estão associados com a regulação do ritmo circadiano, homeostase do sono, *stress* oxidativo e metabolismo. Assim, são afetados processos como: a modificação da cromatina, regulação e expressão de genes, metabolismo macro-molecular e a resposta inflamatória e imune (Moller-Levet *et al.*, 2013).

Vários estudos têm demonstrado que as pessoas que trabalham por turnos têm um risco mais elevado de sofrer de síndrome metabólica, obesidade e diabetes, devido à alteração do ritmo circadiano (Popa-Wagner *et al.*, 2013). O trabalho por turnos desregula o ciclo circadiano natural e expõe o organismo humano à luz solar a horas biologicamente atípicas, alterando as horas das refeições e a rotina social. Este facto gera uma dessincronização entre o relógio central e os osciladores periféricos, levando à adaptação a um novo “horário interno”. A adaptação não é imediata, existindo primeiro uma série de ciclos de transição que podem durar várias semanas. Esta fase de transição pode influenciar o metabolismo e promover o aumento da proliferação celular (Haus e Smolensky, 2006). Na última década tem sido reportado um aumento do cancro da mama e do cancro colo-retal em mulheres com uma longa dessincronização do ritmo circadiano devido ao trabalho por turnos. A supressão da melatonina pela luz (durante a noite de trabalho) tem sido apontada como fator desencadeante, uma vez que a melatonina possui atividade oncostática (Haus e Smolensky, 2006). A melatonina, para além das atividades cronobiológicas, também possui atividade antioxidante, imunomoduladora e neuroendócrina, o que faz com que tenha uma ação anti-envelhecimento (Orozco-Solis e Sassone-Corsi, 2014).

Estudos realizados com animais geneticamente modificados têm confirmado o papel do ritmo circadiano no processo de envelhecimento. Murganhos com deleção do gene *Bmal1* têm o comportamento circadiano alterado, perda de ritmicidade na expressão dos genes, redução da vida média e vários sintomas de envelhecimento prematuro (sarcopenia; cataratas; perda de gordura sub-cutânea; redução do tamanho dos órgãos, entre outros). O fenótipo de envelhecimento acelerado também está correlacionado com o aumento das espécies reativas de oxigênio em alguns tecidos destes animais (Kondratov *et al.*, 2006). Desta forma tem sido proposto que o ritmo circadiano tem influência na proteção do organismo contra o *stress* oxidativo. Por exemplo, o dímero *BMALI-CLOCK* regula a expressão do fator de transcrição *NRF2* nos pulmões e este, por sua vez, promove a transcrição de genes antioxidantes (Orozco-Solis e Sassone-Corsi, 2014).

A deleção do gene *Clock* em murganhos também tem efeitos na longevidade, na medida em que a esperança média de vida destes animais é menor 15% e a esperança máxima de vida é menor 20% quando comparado com animais controlo. Estes animais apresentam ainda uma taxa mais elevada de duas patologias associadas à idade – cataratas e dermatites (Dubrovsky *et al.*, 2010).

Os genes *Per1* e *Per2* também têm sido descritos como supressores de tumores. Murganhos com deficiência em *PER2* têm mais suscetibilidade de desenvolver cancro devido a anomalias genéticas ou induzido por radiações. A sobre-expressão de *Per1* e *Per2* reduz o crescimento tumoral *in vivo* e promove a apoptose *in vitro*, enquanto que a subregulação da *PER* promove o crescimento das células cancerígenas (Yu e Weaver, 2011).

O ritmo circadiano também tem um papel importante no controlo da atividade da telomerase em humanos e murganhos. Murganhos com deleção do gene *Clock* demonstraram ter perda da ritmicidade da atividade da telomerase, variação do mRNA *TERT* e encurtamento do comprimento dos telómeros. Em pessoas que trabalham por turnos verifica-se também a perda da ritmicidade da atividade da telomerase. O ritmo circadiano da atividade da telomerase tem um papel fulcral do ponto de vista clínico, pois a expressão desta é essencial na maioria das células cancerígenas. É por isso, teoricamente, um importante alvo na terapia oncológica (Chen *et al.*, 2014).

Restrição calórica

A restrição calórica (RC) aumenta a vida média de várias espécies, nomeadamente *C.elegans*, *Drosophila*, roedores e macacos rhesus (Colman *et al.*, 2009; Froy e Miskin, 2010).

A restrição calórica é definida como uma redução da ingestão calórica abaixo do *ad libitum*, sem desnutrição (isto é, ingestão de pelo menos 100% da dose diária recomendada de cada nutriente essencial) (Fontana e Partridge, 2015). Esta é uma das formas de intervenção nutricional mais discutida para se aumentar o tempo de vida em inúmeras espécies. Estudos em modelos animais associam a RC a uma menor incidência de doenças relacionadas à idade, tais como, doenças cardiovasculares, cancro, diabetes, atrofia muscular e doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer e a doença de Parkinson) (Anderson e Weindruch, 2010; Genaro *et al.*, 2009; Testa *et al.*, 2014). A RC melhora ainda alguns marcadores do envelhecimento, como: instabilidade genómica; erosão dos telómeros; alterações epigenéticas; desequilíbrio da proteostase; disfunções mitocondriais; senescência celular; comunicação intercelular anormal; alteração das vias de sensores de nutrientes e diminuição da capacidade proliferação e diferenciação das células estaminais em diversos tecidos (Mazzocchi *et al.*, 2014; Michan, 2014).

Mecanismos moleculares

Nos últimos 77 anos foram propostos diversos mecanismos que explicam como a RC poderá promover o aumento da longevidade (Testa *et al.*, 2014). Entra as hipóteses e as vias de sinalização celular apresentadas estão:

- **Redução da gordura corporal** - A RC diminui as concentrações séricas de glicose (Testa *et al.*, 2014), originando uma diminuição da produção de insulina pelas células β do pâncreas e, conseqüentemente, uma diminuição de tecido adiposo branco. O tecido adiposo é também um órgão endócrino e a sua alteração pode modificar a secreção de TNF- α , resistina, adiponectina e leptina. A diminuição de produção de TNF- α e o aumento de adiponectina melhoram a sensibilidade à insulina em diversos tecidos (Genaro *et al.*, 2009). Para além destas mudanças metabólicas e endócrinas, a RC aumenta os níveis de hormonas anti-inflamatórias (ex: corticosterona e grelina) e diminui a concentração de hormonas anabólicas (ex: testosterona, estradiol, leptina) e de hormonas que regulam a termogénese e o metabolismo basal (Testa *et al.*, 2014);

- Redução de espécies reativas de oxigênio e atenuação dos danos oxidativos- A RC diminui a produção de espécies reativas de oxigênio que são formadas pela respiração celular. As ROS oxidam moléculas, tais como proteínas ou ácidos nucleicos (Genaro *et al.*, 2009), danificando o genoma mitocondrial. Desta forma, as mitocôndrias deixam de conseguir gerar energia eficazmente produzindo grandes quantidades de ROS, havendo assim um declínio da mitofagia (Testa *et al.*, 2014). Para além disso, as ROS ativam um fator transcricional pró-inflamatório denominado NF- κ B, responsável pela transcrição de proteínas pró-inflamatórias como TNF- α e interleucinas 1, 2 e 6 (Genaro *et al.*, 2009);
- Diminuição da inflamação sistêmica crônica - A RC reduz a concentração de citocinas no plasma e tecidos, bem como a produção de outros mediadores químicos da inflamação (ex: PGE2, PGI2 e TXA2). Para além do referido, a RC também modifica e diminui a expressão de genes envolvidos na inflamação (Testa *et al.*, 2014);
- Aumento da autofagia - A RC estimula a autofagia, promovendo um aumento da renovação das proteínas celulares, membranas e organelos. Este mecanismo é particularmente importante em células não-proliferativas, como é o caso dos neurónios, em que a agregação intracelular de proteínas com alterações conformacionais é comum a algumas doenças neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer, de Parkinson e de Huntington (Testa *et al.*, 2014);
- Hormesis - A RC representa um “stress biológico” de baixa intensidade sobre o organismo, provocando sobre este uma resposta defensiva que o ajuda a proteger posteriormente. A exposição repetida e moderada a um stress de baixa intensidade, estimula os processos de manutenção e reparação celular (Masoro, 2006; Testa *et al.*, 2014);
- Outros mecanismos moleculares envolvidos no aumento da longevidade pela restrição calórica são a modelação da atividade das Sirtuínas, do PGC-1 α , da AMPK, da via de sinalização Insulina/IGF-1 e do mTOR (Figura 3):
 - Nos mamíferos existem sete sirtuínas (SIRT-1 a SIRT-7) e a SIRT-1 é a mais semelhante com a *Sir2* das leveduras. O gene *Sir2* das leveduras codifica uma histona desacetilase dependente de NAD⁺, a qual demonstrou ter um papel determinante na longevidade. Na presença de RC ocorre a ativação da NAMPT que catalisa a síntese de NAD⁺ que, por sua vez, tem um efeito protetor contra o stress oxidativo. A RC aumenta as concentrações de SIRT-1 e a sua expressão parece mediar a atividade de reguladores do metabolismo, como FOXO, PPAR α ,

PPAR γ , PGC-1 α . No fígado, a SIRT-1 desacetila e ativa o PGC-1 α que interage com o FOXO, o qual induz a ativação da neoglucogénese e diminui a glicólise. No tecido muscular, a SIRT-1 ativa PGC-1 α induzindo a biogénese mitocondrial e o aumento dos ácidos gordos. No tecido adiposo branco, a SIRT-1 suprime a atividade transcricional do PPAR γ , levando ao aumento da mobilização de gordura e à diminuição da adipogénese (Genaro *et al.*, 2009). A SIRT-1 também influencia o processo de autofagia pois a sua sobre-expressão ativa as proteínas envolvidas neste processo. Este facto é corroborado por evidências em murganhos *knockout* para a SIRT-1, uma vez que estes apresentam um decréscimo acentuado da autofagia. As sirtuínas nucleares (SIRT-6 e SIRT-7) e a sirtuínas mitocondriais (SIRT-3, SIRT-4 e SIRT-5), que modulam várias respostas metabólicas, são também sensíveis à RC (Testa *et al.*, 2014);

- O PGC-1 α é um regulador importante dos genes envolvidos no metabolismo mitocondrial e na biogénese. A RC induz a expressão dos genes envolvidos no sistema de transporte de eletrões na mitocôndria e aumenta a biogénese mitocondrial através da ativação do PGC-1 α via SIRT-1. A sua atividade protege o organismo de vários efeitos nefastos como: o declínio da função mitocondrial no músculo esquelético; as mudanças metabólicas no tecido cardíaco e as alterações da distribuição e atividade do tecido adiposo, características do processo de envelhecimento (Testa *et al.*, 2014);

- A AMPK é um regulador chave na resposta adaptativa à privação de energia e na biogénese mitocondrial, sendo um sensor altamente sensível às variações de energia celular (Testa *et al.*, 2014). A AMPK é ativada quando há uma diminuição da concentração de glucose (Anderson e Weindruch, 2010), ou seja, quando há um aumento da razão AMP/ATP (Testa *et al.*, 2014). O mecanismo que liga a AMPK e o aumento da longevidade continua em parte por esclarecer, contudo existem evidências que esta proteína fosforila certos fatores de transcrição como o PGC-1 α e o FOXO (Testa *et al.*, 2014);

- A regulação da via de sinalização Insulina/IGF-I influencia a vida-média de espécies de invertebrados e mamíferos (incluindo humanos). Esta via de sinalização controla a via PI3K/Akt/PDK-1, resultando na inibição da atividade do fator de transcrição FOXO através da fosforilação e consequente fixação do FOXO no citoplasma (Testa *et al.*, 2014). As mutações que levam à diminuição das funções desta via, incluindo as que resultam na diminuição da atividade dos componentes da cascata de sinalização, têm demonstrado aumentar a longevidade, dado que

retardam o aparecimento de doenças relacionadas com a idade e aumentam a resistência ao stress oxidativo (Testa *et al.*, 2014). Em *C. elegans*, mutações que diminuem a atividade de *daf-2* (que codifica um recetor hormonal semelhante aos recetores de insulina e IGF-1) duplicam o tempo de vida deste (Kenyon, 2010).

- O mTOR pertence a uma família de cinases que atuam como sensores ao stress, nutrientes e fatores de crescimento. A mTOR faz parte de dois complexos multiproteicos, denominados mTORC1 e mTORC2 (Froy e Miskin, 2010; Testa *et al.*, 2014). A inibição da mTORC1 aumenta a autofagia, melhora a proteostase e a função das células estaminais (Fontana e Partridge, 2015; Johnson *et al.*, 2013). A RC em invertebrados e murganhos reduz a atividade da mTOR, aumentando a vida média destes. (Orozco-Solis e Sassone-Corsi, 2014; Testa *et al.*, 2014).

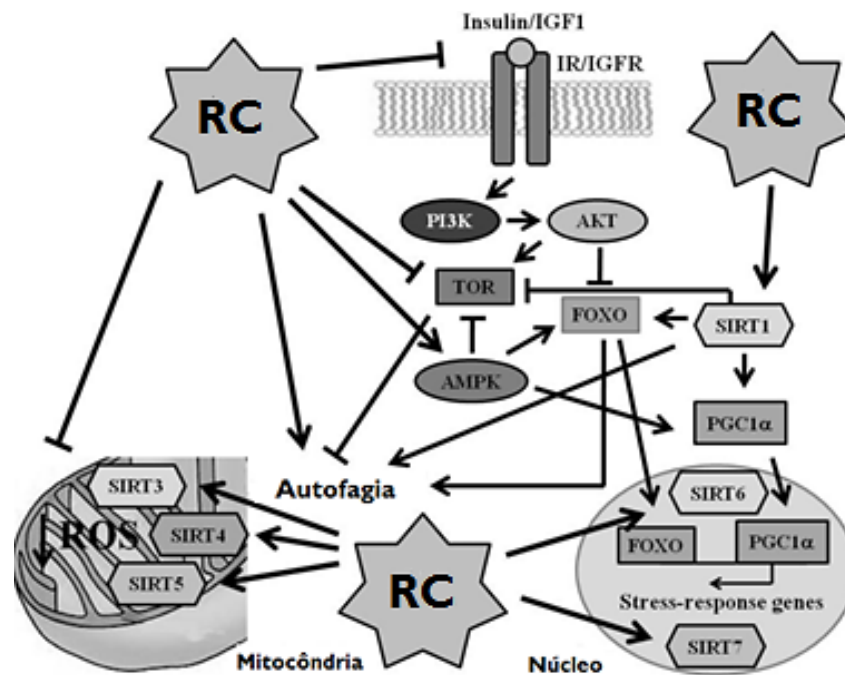


Figura 3 - Mecanismos moleculares envolvidos no aumento da longevidade pela Restrição Calórica (RC).

A RC inibe a via de sinalização IGF-1 e ativa a SIRT-1, o que induz a ativação do fator de transcrição FOXO. Uma vez ativado, o FOXO induz a transcrição de genes antioxidantes no núcleo. A ativação da SIRT-1 pela RC conduz à modulação do PGC-1α, o que provoca uma melhoria da biogénese e função mitocondrial, levando assim, a uma maior redução do stress oxidativo. O PGC-1α e o FOXO podem ser ativados diretamente, através da AMPK. Além disso, a privação de nutrientes e a remoção de fatores de crescimento podem estimular a autofagia diretamente, através da SIRT-1 ou através da indução SIRT-1-dependente de FOXO, ou então por inibição da atividade do TOR ou da via de sinalização IGF-1 (adaptado de Testa *et al.*, 2014).

Inter-relação entre restrição calórica, ritmo circadiano e longevidade

O relógio circadiano tem um papel fulcral na regulação do metabolismo e da homeostase dos tecidos periféricos. O *master clock* (relógio central) regula a expressão e a atividade de certas enzimas e sistemas de transporte envolvidos nas vias metabólicas. Um grande número de recetores nucleares envolvidos no metabolismo dos lípidos e da glucose demonstraram ter uma expressão circadiana. Para além destes, algumas hormonas como a insulina, glucagon, adiponectina, corticosterona, leptina e grelina também demonstraram serem regidas por oscilações circadianas (Froy e Miskin, 2010; Froy, 2007).

Da mesma maneira que o ciclo circadiano regula o metabolismo, a alimentação também regula o ciclo circadiano, sendo um potente sincronizador dos relógios periféricos (Froy, 2007).

Estudos *in vitro* demonstraram que os estados de redução/oxidação provocados pela RC modulam a dimerização das proteínas CLOCK e BMAL1 (Froy, 2011). No mesmo sentido, murganhos sujeitos a RC durante o dia demonstraram ter uma correlação entre a RC e a organização temporal do *master clock* (relógio central), uma vez que a RC sincroniza os relógios periféricos e os *outputs* circadianos (os animais sobre este regime consomem todo ou parte dos alimentos dentro de um curto período de tempo, existindo assim uma componente temporal da ingestão de alimentos). A RC também sincroniza o relógio circadiano central, uma vez que altera a expressão génica e afeta a resposta fótica do sistema circadiano. Estes resultados sugerem que a sincronização dos relógios periféricos durante RC pode ser realizada diretamente, devido à componente temporal da ingestão de alimentos, ou pela sincronização do relógio central que, por sua vez, através de sinais humorais ou neuronais, modula a resposta dos tecidos periféricos (Froy, 2007, 2011). A alteração de fase do relógio(s) central e periféricos durante a RC pode levar à sincronização de uma variedade de funções hormonais, bioquímicos, fisiológicos, que assim conduzem a atenuação de envelhecimento e a um aumento da longevidade (Froy, 2011).

Parabiose

A Parabiose (do grego *para* “ao lado de” e *bios* “vida”) é uma técnica cirúrgica com cerca de 150 anos, que consiste na união de dois seres vivos (sobretudo roedores) pelos seus sistemas circulatórios, passando a terem assim, um sistema circulatório partilhado (Conboy *et al.*, 2013; Scudellari, 2015). A parabiose pode ser mantida por um período variável de tempo e tem sido utilizada para responder um conjunto diverso de questões, como por exemplo, a etiologia das cáries dentárias e o papel do sistema imunitário no combate ao cancro (Conboy *et al.*, 2012). É por isso um modelo muito importante para descobrir a influência dos fatores circulantes sobre as funções dos tecidos (Loffredo *et al.*, 2013).

Paul Bert foi o primeiro a publicar a descrição desta técnica cirúrgica em 1864 (“De la Greffe Animale”), descrevendo a união de dois ratos (Conboy *et al.*, 2012). Em 1908, os cirurgiões Sauerbruch e Heyde introduziram o termo “Parabiose” para o estabelecimento de uma simbiose artificial entre dois seres vivos (Eggel e Wyss-Coray, 2014). Em 1969, Coleman descobriu o “fator da saciedade”, que mais tarde se veio a designar por Leptina. Coleman fez esta descoberta ao unir um murgancho controlo a um murgancho com a mutação *db/db* (*diabetes gene*) no cromossoma 4, que o tornava propenso à obesidade e a desenvolver diabetes tipo II. A hipótese inicial considerada foi a de que o murgancho obeso perderia peso por estar exposto ao ambiente sistémico do murgancho controlo, mas tal não se verificou – o murgancho controlo diminuiu o consumo de comida e perdeu peso e o murgancho mutante continuou a engordar. Coleman concluiu assim a existência de um “fator da saciedade” ao qual o murgancho mutante não responderia (Coleman, 2010; Eggel e Wyss-Coray, 2014). Mais tarde verificou-se que o gene *db* codifica o recetor da leptina (Lee *et al.*, 1996).

A Parabiose, para além de possibilitar a descoberta e o estudo de vários fatores humorais circulantes, também permite estudar as consequências da exposição de um organismo a um meio sistémico diferente (Eggel e Wyss-Coray, 2014), como acontece na parabiose heterocrónica.

Na parabiose heterocrónica os animais parabiontes têm idades diferentes, enquanto na parabiose isocrónica o par parabionte tem a mesma idade (Loffredo *et al.*, 2013).

O primeiro estudo com animais em parabiose heterocrónica ocorreu nos anos 50 do século passado e foi desenvolvido por Clive McCay e pela sua equipa. McCay estudou a hipótese do envelhecimento ter uma componente sistémica e testou a hipótese de o sangue dos ratos jovens poder prolongar a vida dos ratos mais velhos (Conboy *et al.*, 2012). Em 1972, Ludwig *et al.* publicaram um estudo em que demonstraram que os ratos em parabiose

heterocrônica viviam cerca de 120 a 160 dias a mais do que os ratos em parabiose isocrônica (Ludwig e Elashoff, 1972).

O fervor por esta técnica diminuiu depois da década de 70 (Scudellari, 2015), no entanto, na última década o interesse da comunidade científica por esta técnica voltou a despertar.

Em 2005, Conboy *et al.* demonstraram através da parabiose heterocrônica que os fatores presentes no soro de um murgancho jovem influenciavam positivamente as vias de sinalização molecular nas células estaminais do músculo esquelético (células satélite) e nos hepatócitos, levando a um aumento da proliferação e à regeneração dos tecidos no murgancho mais velho (Conboy *et al.*, 2005; Eggel e Wyss-Coray, 2014). Estes resultados foram posteriormente confirmados *ex vivo*, em culturas de células satélites provenientes do murgancho mais velho, num meio contendo soro do murgancho jovem. Desta forma os autores provaram que o declínio da regeneração dos tecidos com a idade pode ser reversível através da modulação dos fatores sistêmicos, sugerindo que as células estaminais e as células progenitoras de cada tecido mantêm o seu potencial proliferativo intrínseco mesmo com a idade (Conboy *et al.*, 2005).

Outro estudo em parabiontes heterocrônicos revelou um aumento da neurogênese nos cérebros dos murganchos mais velhos quando sujeitos ao meio sistêmico do murgancho jovem. No entanto, a exposição do murgancho jovem ao meio sistêmico/plasma do murgancho mais velho diminuiu a plasticidade sináptica, aprendizagem e memória deste (Villeda *et al.*, 2011). Villeda *et al.* identificaram vários fatores solúveis (Eggel e Wyss-Coray, 2014), nomeadamente a quimiocina CCL11, cujos níveis plasmáticos aumentados se correlacionam com a diminuição da neurogênese nos ratos mais velhos (os níveis de CCL11 também se encontram aumentados no plasma e no líquido cefalorraquidiano de seres humanos idosos) (Villeda *et al.*, 2011). Em 2012, Ruckh *et al.* demonstraram a existência de um aumento da mielinização do SNC em murganchos mais velhos quando sujeitos ao meio sistêmico dos murganchos jovens (Ruckh *et al.*, 2012). Mais recentemente, Loffredo *et al.* e Katsimpardi *et al.* mostraram que o fator GDF11 (da superfamília dos *transforming growth factor beta* - TGF- β), presente no sangue dos parabiontes jovens, é responsável pela diminuição da hipertrofia cardíaca/tamanho dos miócitos cardíacos e pela remodelação vascular, que culmina num aumento da neurogênese e da discriminação olfativa nos murganchos mais velhos (Katsimpardi *et al.*, 2014; Loffredo *et al.*, 2013).

As últimas evidências publicadas sobre a parabiose heterocrônica revelaram um aumento da densidade da arborização terminal em neurónios envelhecidos e uma melhoria da plasticidade sináptica no hipocampo dos murganchos mais velhos quando estes ficam

envolvidos por um meio “sistémico jovem”. A nível cognitivo, a administração sistémica de plasma de murganhos jovens em murganhos mais velhos melhorou as deficiências cognitivas relacionadas com a idade, bem como a memória e a aprendizagem espacial (Villeda *et al.*, 2014).

Perspetivas futuras: parabiose heterocrónica “aplicada” a humanos

A publicação de Villeda *et al.* em maio de 2014 veio levantar de novo a pergunta: “*Até que ponto as doenças relacionadas com a idade podem ser revertidas através de transfusões sanguíneas de pessoas jovens para pessoas idosas?*”.

Para responder a esta questão encontra-se a decorrer, desde setembro de 2014, um ensaio clínico em que pessoas com mais de 50 anos com a doença de Alzheimer irão receber transfusões de plasma de pessoas com idade, inferior ou igual, a 30 anos. Este estudo pretende monitorizar os sintomas da doença, bem como as mudanças nas estruturas do cérebro e os biomarcadores sanguíneos desta (Scudellari, 2015).

Por outro lado, os animais em parabiose podem replicar muitos aspetos de doenças crónicas humanas e verificar se o ambiente sistémico envolvente tem alguma influência na progressão destas. A parabiose é assim uma técnica relevante para investigar as alterações ocorridas no organismo durante o envelhecimento e descobrir se estas ocorrem em resultado das modificações dos fatores circulatórios (Eggel e Wyss-Coray, 2014)

Fármacos no aumento da longevidade

O envelhecimento pode ser definido como o aumento da probabilidade de vir a desenvolver um determinado número de doenças. Assim sendo, a longevidade humana é fortemente condicionada pelo início tardio de doenças (envelhecimento saudável). As pessoas centenárias mostram um atraso significativo no aparecimento de doenças relacionadas com a idade, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, cancro e doença de Alzheimer. Pode-se desta forma afirmar que as pessoas que vivem mais tempo são por norma mais saudáveis (e vice-versa) e, por essa razão, a procura de um fármaco

“anti-envelhecimento” tem, de certa forma, que atrasar as doenças relacionadas com a idade (Blagosklonny, 2009).

As intervenções que visam interferir nos processos moleculares subjacentes ao envelhecimento podem assim fornecer novos pontos de entrada para o desenvolvimento de terapias preventivas ou inovadoras para as doenças relacionadas com a idade (Ehninger *et al.*, 2014).

Como referido anteriormente, a restrição calórica aumenta a longevidade desde o Reino *Fungi* até ao Reino *Animalia*. Desta forma, compostos como a Rapamicina, Resveratrol e a Metformina (compostos que mimetizam a restrição calórica) têm revelado ter algum impacto no atraso do envelhecimento/aumento da longevidade.

Rapamicina

A rapamicina diminui a senescência em células humanas e aumenta a vida-média de leveduras (Testa *et al.*, 2014), moscas da fruta (Blagosklonny, 2010; Kenyon, 2010), nemátodos (Kenyon, 2010) e em murganhos. (Blagosklonny, 2010).

A rapamicina e os seus derivados são usados na prática clínica como imunossuppressores (na prevenção da rejeição de órgãos, especialmente nos transplantes renais) e em *stents* farmacológicos (para prevenirem a obstrução de artérias) (Ehninger *et al.*, 2014).

A rapamicina inibe a mTOR e tem um impacto direto na disponibilidade de nutrientes, na estimulação dos fatores de crescimento e na proliferação celular (Ehninger *et al.*, 2014; Fontana e Kennedy, 2014), tendo assim uma ação anti-proliferativa/ anti-cancerígena e estimulante da autofagia (Testa *et al.*, 2014).

A rapamicina tem demonstrado um papel importante na prevenção e na regressão de tumores pré-existentes em pessoas sujeitas a transplantes renais (Blagosklonny, 2009). Para além do seu uso como imunossupressor, a rapamicina mostrou ter uma atividade promissora em ensaios pré-clínicos, no âmbito da obesidade, aterosclerose, hipertrofia cardíaca, aneurisma da aorta, osteoporose, fibrose hepática, fibrose renal, fibrose cardíaca, neurodegeneração, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, psoríase, esclerose múltipla e artrite (Blagosklonny, 2009).

No entanto, o efeito deste fármaco “anti-envelhecimento” pode ser delimitado pelos seus efeitos colaterais - resistência à insulina, cetogénese, hiperlipidémia, entre outros. Em teoria, esses efeitos secundários podem ser evitados existindo uma administração

intermitente. Por exemplo, a administração crónica de rapamicina pode desencadear o desenvolvimento de diabetes, enquanto uma administração intermitente pode reverter a resistência à insulina (Blagosklonny, 2009).

Resveratrol

O resveratrol é um polifenol, comumente encontrado na *Vitis vinifera* (Testa et al., 2014). Este composto é um potente ativador da SIRT-1 e prolonga a vida-média de diversas espécies. Vários estudos demonstraram que este polifenol tem um papel importante na prevenção do cancro, aterosclerose, neurodegenerescência e na resistência à insulina (Blagosklonny, 2009). Em murganhos utilizados como modelo da doença de Huntington, o resveratrol, através da indução da SIRT-1, revelou ter uma atividade protetora dos neurónios afetados (Testa et al., 2014).

Este composto, para além de ativar a SIRT-1, também ativa outras 15 enzimas, como por exemplo, a AMPK. O resveratrol, através da ativação da AMPK, aumenta a vida-média em nemátodos e protege os murganhos do desenvolvimento de obesidade (Kaeberlein, 2010).

Metformina

A metformina tem como finalidade melhorar a sensibilidade à insulina, que é a causa subjacente aos diabetes tipo 2 (Blagosklonny, 2009). Este fármaco diminui a absorção de glucose no trato gastrointestinal e reduz neoglucogénese hepática. Ao melhorar a sensibilidade à insulina faz com que haja uma melhor captação de glucose, o que resulta num decréscimo da glicémia (Testa et al., 2014). O aumento da sensibilização à insulina pode dever-se à ativação da AMPK que, por sua vez, leva à inibição mTOR (Blagosklonny, 2009).

A metformina tem sido associada a um aumento da longevidade em certas espécies (murganhos, ratos) e a uma diminuição da incidência de tumores (principalmente, cancro da mama), bem como de doenças relacionadas com a idade, como as doenças cardiovasculares e doenças renais crónicas. Em murganhos, para além da redução do risco de aparecimento de tumores, também tem demonstrado resultados na inibição da aterosclerose (Blagosklonny, 2009; Testa et al., 2014).

Conclusão

A procura da longevidade eterna foi sempre um enorme fator de interesse para a Humanidade. Surgiram diversas lendas em redor deste tema, sendo a “Fonte da Juventude” a mais famosa. Hoje em dia a comunidade científica já não procura uma fonte da juventude, no verdadeiro sentido da palavra, mas sim estratégias e mecanismos que possam conduzir a um aumento da longevidade com qualidade de vida nos seres humanos. Neste sentido, surgiram várias evidências ao longo dos últimos anos que um ritmo circadiano regulado, a redução da ingestão de calorias e a aplicação dos conhecimentos da parabiose heterocrónica poderiam de alguma forma aumentar a longevidade humana.

O ritmo circadiano controla muitos processos a nível metabólico e fisiológico. A desregulação do ritmo circadiano tem várias implicações para a saúde, nomeadamente o desenvolvimento precoce de doenças relacionadas com o envelhecimento, como doenças cardiovasculares, diabetes e cancro. Por outro lado, a desregulação contínua do ritmo circadiano também pode influenciar a farmacocinética e farmacodinâmica de diversas classes de fármacos, quando tomados em diferentes horários no ciclo de 24 horas (Haus e Smolensky, 2006), bem como a expressão génica. Assim sendo, parece existir uma correlação entre a manutenção do ritmo circadiano regulado e o aumento da longevidade, como consequência do desenvolvimento tardio de certas doenças.

Um regime alimentar baseado na restrição calórica sem desnutrição também tem demonstrado boas evidências no aumento da longevidade de várias espécies pois, segundo dados experimentais, este regime protege contra a deterioração das funções biológicas e reduz o risco do aparecimento de muitas doenças características do envelhecimento. No entanto, a restrição calórica em humanos é um regime alimentar de difícil implantação a longo prazo, sendo poucas as pessoas que aderem a este estilo de vida. Desta forma, torna-se difícil estudar os efeitos/benefícios da restrição calórica a longo prazo. Por outro lado, têm surgido várias moléculas (como a rapamicina, o resveratrol e a metformina) que mimetizam alguns efeitos benéficos da restrição calórica. Neste sentido, as expectativas futuras recaem sobre a possibilidade da descoberta de um fármaco que mimetize totalmente os efeitos benéficos da restrição calórica sem a necessidade de aderir a este regime, aumentando assim a longevidade.

A parabiose, na última década, voltou a despertar o interesse da comunidade científica no campo do envelhecimento. Esta técnica, ao contrário da regulação do ritmo circadiano e da restrição calórica, não só atrasa o envelhecimento como o pode reverter, de certa forma, aumentando assim a longevidade. A parabiose, principalmente a parabiose heterocrónica,

revolucionou o modo de pensar no processo de envelhecimento até então, pois abriu a possibilidade do envelhecimento não ser um acontecimento inevitável e irreversível, intrínseco dos tecidos *per si*, mas sim um processo que pode ser modulado pelos fatores do meio sistêmico que os rodeiam.

Desta forma, pode-se afirmar que a investigação na área da longevidade tem evoluído no sentido de encontrar estratégias, que diminuam a incidência das doenças associadas à idade, para com isso conseguir um envelhecimento saudável e um aumento da longevidade com qualidade de vida.

Referências bibliográficas:

ANDERSON, R. M.; WEINDRUCH, R. - **Metabolic reprogramming, caloric restriction and aging.** Trends in endocrinology and metabolism: TEM. . ISSN 1879-3061. 21:3 (2010) 134–41. doi: 10.1016/j.tem.2009.11.005.

BALCH, W.; MORIMOTO, R.; DILLIN, A.; KELLY, J. - **Adapting proteostasis for disease intervention.** Science (New York, N.Y.). . ISSN 1095-9203. 319:5865 (2008) 916–9. doi: 10.1126/science.1141448.

BLAGOSKLONNY, M. V - **Validation of anti-aging drugs by treating age-related diseases.** Aging. . ISSN 1945-4589. 1:3 (2009) 281–8.

BLAGOSKLONNY, M. V - **Rapamycin and quasi-programmed aging: four years later.** Cell cycle (Georgetown, Tex.). . ISSN 1551-4005. 9:10 (2010) 1859–62.

BUXTON, O. M.; CAIN, S.; O'CONNOR, S.; PORTER, J.; DUFFY, J.; WANG, W.; CZEISLER, C.; SHEA, S. - **Metabolic consequences in humans of prolonged sleep restriction combined with circadian disruption.** Science translational medicine. . ISSN 1946-6242. 4:129 (2012) 129ra43. doi: 10.1126/scitranslmed.3003200.

CHEN, W.-D.; WEN, M.; SHIE, S.; LO, Y.; WO, H.; WANG, C.; HSIEH, I.; LEE, T.; WANG, C. - **The circadian rhythm controls telomeres and telomerase activity.** Biochemical and biophysical research communications. . ISSN 1090-2104. 451:3 (2014) 408–14. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.138.

COLEMAN, D. L. - **A historical perspective on leptin.** Nature medicine. . ISSN 1546-170X. 16:10 (2010) 1097–1099. doi: 10.1038/nm1010-1097.

COLMAN, R. J.; ANDERSON, R.; JOHNSON, S.; KASTMAN, E.; KOSMATKA, K.; BEASLEY, T.; ALLISON, D.; CRUZEN, C.; SIMMONS, H.; KEMNITZ, J.; WEINDRUCH, R. - **Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys.** Science (New York, N.Y.). . ISSN 1095-9203. 325:5937 (2009) 201–4. doi: 10.1126/science.1173635.

CONBOY, I. M.; CONBOY, M.; WAGERS, A.; GIRMA, E.; WEISSMAN, I.; RANDO, T. - **Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment.** Nature. . ISSN 1476-4687. 433:7027 (2005) 760–764. doi: 10.1038/nature03260.

CONBOY, I. M.; RANDO, T. A. - **Heterochronic parabiosis for the study of the effects of aging on stem cells and their niches.** Cell Cycle. . ISSN 15384101. 11:12 (2012) 2260–2267. doi: 10.4161/cc.20437.

CONBOY, M. J.; CONBOY, I. M.; RANDO, T. A. - **Heterochronic parabiosis: historical perspective and methodological considerations for studies of aging and longevity.** Aging cell. . ISSN 1474-9726. 12:3 (2013) 525–30. doi: 10.1111/accel.12065.

DUBROVSKY, Y. V; SAMSA, W. E.; KONDRATOV, R. V - **Deficiency of circadian protein CLOCK reduces lifespan and increases age-related cataract development in mice.** Aging. . ISSN 1945-4589. 2:12 (2010) 936–44.

DUFFIELD, G. E. - **DNA Microarray Analyses of Circadian Timing: The Genomic Basis of Biological Time.** Journal of Neuroendocrinology. . ISSN 09538194. 15:10 (2003) 991–1002. doi: 10.1046/j.1365-2826.2003.01082.x.

EGGEL, A.; WYSS-CORAY, T. - **Parabiosis for the study of age-related chronic disease.** Swiss medical weekly. . ISSN 1424-3997. 144:2014) w13914. doi: 10.4414/smw.2014.13914.

EHNINGER, D.; NEFF, F.; XIE, K. - **Longevity, aging and rapamycin.** Cellular and molecular life sciences: CMLS. . ISSN 1420-9071. 71:22 (2014) 4325–46. doi: 10.1007/s00018-014-1677-1.

FONTANA, L.; KENNEDY, B. K. - **Treat ageing.** Nature. . ISSN 0028-0836. 511:2014) 405–7. doi: 10.1038/511405a.

FONTANA, L.; PARTRIDGE, L. - **Promoting Health and Longevity through Diet: From Model Organisms to Humans.** Cell. . ISSN 00928674. 161:1 (2015) 106–118. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.020.

FROY, O. - **The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals.** Frontiers in neuroendocrinology. . ISSN 0091-3022. 28:2-3 (2007) 61–71. doi: 10.1016/j.yfrne.2007.03.001.

FROY, O. - **Circadian rhythms, aging, and life span in mammals.** Physiology (Bethesda, Md.). . ISSN 1548-9213. 26:2011) 225–235. doi: 10.1152/physiol.00012.2011.

FROY, O.; MISKIN, R. - **The interrelations among feeding, circadian rhythms and ageing.** Progress in neurobiology. . ISSN 0301-0082. 82:3 (2007) 142–50. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.03.002.

FROY, O.; MISKIN, R. - **Effect of feeding regimens on circadian rhythms: implications for aging and longevity.** Aging. . ISSN 1945-4589. 2:1 (2010) 7–27.

GENARO, P. De S.; SARKIS, K. S.; MARTINI, L. A. - **O efeito da restrição calórica na longevidade.** Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. . ISSN 0004-2730. 53:5 (2009) 667–672. doi: 10.1590/S0004-27302009000500019.

HAUS, E.; SMOLENSKY, M. - **Biological clocks and shift work: Circadian dysregulation and potential long-term effects.** Cancer Causes and Control. . ISSN 09575243. 17:2006) 489–500. doi: 10.1007/s10552-005-9015-4.

JOHNSON, S. C.; RABINOVITCH, P. S.; KAEBERLEIN, M. - **mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease.** Nature. . ISSN 1476-4687. 493:7432 (2013) 338–45. doi: 10.1038/nature11861.

KAEBERLEIN, M. - **Resveratrol and rapamycin: Are they anti-aging drugs?** BioEssays. . ISSN 02659247. 32:5 (2010) 96–99. doi: 10.1002/bies.200900171.

KATSIMPARDI, L.; LITTERMAN, N.; SCHELIN, P.; MILLER, C.; LOFFREDO, F.; WOJTKIEWICZ, G.; CHEN, J.; LEE, R.; WAGERS, A.; RUBIN, L. - **Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors.** Science (New York, N.Y.). . ISSN 1095-9203. 344:6184 (2014) 630–4. doi: 10.1126/science.1251141.

KENYON, C. J. - **The genetics of ageing.** Nature. . ISSN 1476-4687. 464:7288 (2010) 504–12. doi: 10.1038/nature08980.

KONDRATOV, R. V.; KONDRATOVA, A.; GORBACHEVA, V.; VYKHOVANETS, O.; ANTOCH, M. - **Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock.** Genes & development. . ISSN 0890-9369. 20:14 (2006) 1868–73. doi: 10.1101/gad.1432206.

KONDRATOV, R. V - **A role of the circadian system and circadian proteins in aging.** Ageing research reviews. . ISSN 1568-1637. 6:1 (2007) 12–27. doi: 10.1016/j.arr.2007.02.003.

KONDRATOVA, A. A.; KONDRATOV, R. V - **The circadian clock and pathology of the ageing brain.** Nature reviews. Neuroscience. . ISSN 1471-0048. 13:5 (2012) 325–35. doi: 10.1038/nrn3208.

LEE, G. H.; PROENCA, R.; MONTEZ, J.; CARROL, K.; DARVISHZADEH, J.; LEE, J.; FRIEDMAN, J. - **Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice.** Nature. . ISSN 0028-0836. 379:6566 (1996) 632–635. doi: 10.1038/379632a0.

LIMA, L.; VARGAS, N. - **O Relógio Biológico e os ritmos circadianos de mamíferos: uma contextualização histórica.** Revista da Biologia. . ISSN 19845154. 12:2 (2014) 1–7. doi: 10.7594/revbio.12.02.01.

LOFFREDO, F. S.; STEINHAUSER, M.; JAY, S.; GANNON, J.; PANCOAST, J.; YALAMANCHI, P.; SINHA, M.; DALL'OSSO, C.; KHONG, D.; SHADRACH, J.; MILLER, C.; SINGER, B.; STEWART, A.; PSYCHOGIOS, N.; GERSZTEN, R.; HARTIGAN, A.; KIM, M.; SERWOLD, T.; WAGERS, A.; LEE, R. - **Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy.** Cell. . ISSN 1097-4172. 153:4 (2013) 828–39. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.015.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M. - **The Hallmarks of Aging.** . ISSN 00928674. 153:6 (2013) 1194–1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.The.

LUDWIG, F. C.; ELASHOFF, R. M. - **Mortality in syngeneic rat parabionts of different chronological age.** Transactions of the New York Academy of Sciences. . ISSN 00287113. 34:7 Series II (1972) 582–587. doi: 10.1111/j.2164-0947.1972.tb02712.x.

MASORO, E. J. - **Dietary restriction-induced life extension: A broadly based biological phenomenon.** Biogerontology. . ISSN 13895729. 7:2006) 153–155. doi: 10.1007/s10522-006-9015-0.

MAZZOCCOLI, G.; TEVY, M.; BORGHEZAN, M.; VERGINI, M.; VINCIGUERRA, M. - **Caloric restriction and aging stem cells: The stick and the carrot?** Experimental Gerontology. . ISSN 05315565. 50:2014) 137–148. doi: 10.1016/j.exger.2013.10.014.

MICHAN, S. - **Calorie restriction and NAD⁺/sirtuin counteract the hallmarks of aging.** Frontiers in bioscience (Landmark edition). . ISSN 1093-4715. 19:2014) 1300–19.

MOLLER-LEVET, C. S.; ARCHER, S.; BUCCA, G.; LAING E.; SLAK, A.; KABILJO, R.; LO, J.; SANTHI, N.; VON SCHANTZ, M.; SMITH, C.; DIJK, D. - **Effects of insufficient sleep on circadian rhythmicity and expression amplitude of the human blood transcriptome.** Proceedings of the National Academy of Sciences. . ISSN 0027-8424. 110:12 (2013) E1132–E1141. doi: 10.1073/pnas.1217154110.

OROZCO-SOLIS, R.; SASSONE-CORSI, P. - **Circadian clock: Linking epigenetics to aging.** Current Opinion in Genetics and Development. . ISSN 18790380. 26:2014) 66–72. doi: 10.1016/j.gde.2014.06.003.

POPA-WAGNER, A.; CATALIN, B.; BUGA, A.-M. - **Novel putative mechanisms to link circadian clocks to healthy aging.** *Journal of Neural Transmission.* . ISSN 0300-9564. 2013) 1–8. doi: 10.1007/s00702-013-1128-4.

POWERS, E. T.; MORIMOTO, R.; DILLIN, A.; KELLY, J.; BALCH, W. - **Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency.** *Annual review of biochemistry.* . ISSN 1545-4509. 78:2009) 959–91. doi: 10.1146/annurev.biochem.052308.114844.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R. - **Coordination of circadian timing in mammals.** *Nature.* . ISSN 0028-0836. 418:6901 (2002) 935–41. doi: 10.1038/nature00965.

RUCKH, J. M.; ZHAO, J.; SHADRACH, J.; VAN WIJNGAARDEN, P.; RAO, T.; WAGERS, A.; FRANKLIN, R.; - **Rejuvenation of regeneration in the aging central nervous system.** *Cell stem cell.* . ISSN 1875-9777. 10:1 (2012) 96–103. doi: 10.1016/j.stem.2011.11.019.

SCUDELLARI, M. - **Blood to blood.** *Nature.* . ISSN 1476-4687. 517:7535 (2015) 426–429. doi: 10.1038/517426a.

TESTA, G.; BIASI, F.; POLI, G.; CHIARPOTTO, E. - **Calorie restriction and dietary restriction mimetics: a strategy for improving healthy aging and longevity.** *Current pharmaceutical design.* . ISSN 1873-4286. 20:2014) 2950–77. doi: 10.2174/13816128113196660699.

UNITED NATIONS - **World Population Prospects** [Em linha], atual. 2015. [Consult. 17 ago. 2015]. Disponível em WWW:URL:http://esa.un.org/unpd/wpp/Publications/Files/Key_Findings_WPP_2015.pdf.

VILLEDA, S. A.; LUO, J.; MOSHER, K.; ZOU, B.; BRITSCHGI, M.; BIERI, G.; STAN, T.; FAINBERG, N.; DING, Z.; EGGEL, A.; LUCIN, K.; CZIRR, E.; PARK, J.; COUILLARD-DESPRES, S.; AIGNER, L.; LI, G.; PESKIND, E.; KAYE, J.; QUINN, J.; GALASKO, D.; XIE, X.; WISS-CORAY, T. - **The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function.** *Nature.* . ISSN 1476-4687. 477:7362 (2011) 90–94. doi: 10.1038/nature10357.

VILLEDA, S. A.; PLAMBECK, K.; MIDDELDORP, J.; CASTELLANO, J.; MOSHER, K.; LUO, J.; SMITH, L.; BIERI, G.; LIN, K.; BERDNIK, D.; WABL, R.; UDEOCHU, J.; WHEATLEY, E.; ZOU, B.; SIMMONS, D.; XIE, X.; LONGO, F.; WYSS-CORAY, T. - **Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice.** *Nature medicine.* . ISSN 1546-170X. 20:6 (2014) 659–663. doi: 10.1038/nm.3569.

YU, E. A.; WEAVER, D. R. - **Disrupting the circadian clock: Gene-specific effects on aging, cancer, and other phenotypes.** *Aging.* . ISSN 19454589. 3:5 (2011) 479–493. doi: 100323 [pii].