

O metabolismo nos caminhos do envelhecimento

Henrique Almeida

Professor Associado da Faculdade de Medicina do Porto

Correspondência:

Prof. Henrique Almeida › Laboratório de Biologia Celular e Molecular › Faculdade de Medicina do Porto › Alameda Hernâni Monteiro 4200-319 Porto › Telefone: +351 22 551 3654 › Fax: +351 22 551 3655 › E-mail: almeidah@med.up.pt

RESUMO

Objectivos: O envelhecimento tornou-se num assunto de grande preocupação no seio da sociedade e por isso objecto de atenção progressiva. A busca dos fundamentos biológicos do envelhecimento e da fragilidade associada, motivou interesse crescente na esperança de, conhecidas as causas, se desenvolverem estratégias para atenuar os seus efeitos.

Após décadas de pesquisa das disfunções ligadas ao envelhecimento, o desenvolvimento científico do último quarto de século re-orientou o interesse para os diversos processos celulares, entre os quais se salienta o metabolismo. Uma revisão introdutória da modulação do envelhecimento por via do metabolismo é o objectivo do presente trabalho.

Métodos: Revisão de conhecimentos recolhidos de artigos de investigação original e artigos de revisão indexados.

Resultados e Conclusões: A contribuição do metabolismo para a atenuação do envelhecimento é indicada pela acção favorável da restrição calórica na longevidade e na saúde de animais de experiência, desde primatas, até seres unicelulares como as leveduras. Essa e outras acções experimentais mostraram a semelhança inter-espécies de alguns mecanismos subjacentes ao envelhecimento e à longevidade, apoiando a sua universalidade.

Além disso, a existência de estirpes de roedores ou outras espécies com fenótipos de envelhecimento acelerado ou retardado motivou a busca dos putativos genes envolvidos. Verificou-se que alguns codificam proteínas intervenientes na cascata transductiva, que é activada após a ligação da insulina ou do IGF-1 com os seus receptores. Algumas mutações, com perda de função, resultam em atraso ou bloqueio do processo de utilização intracelular da glicose.

O reconhecimento de vias metabólicas alteradas em organismos com longevidade aumentada, sugere que nesta se possa intervir com fármacos. Entre os compostos com elevado potencial, contam-se as sirtuinas, que são activadas durante os processos da restrição calórica, e cuja expressão também cresce em seres com longevidade aumentada por manipulação genética.

PALAVRAS-CHAVE

Envelhecimento; Metabolismo; Restrição calórica; Sirtuina.

SUMMARY

Objectives: Ageing became a topic of high concern within the society and therefore a subject of continued attention. The search of the biological foundations of ageing and associated frailty, is now a major task in the hope that being aware of the causes of ageing, appropriate strategies may be developed in order to slow down its effects.

After decades of research of age-related malfunctioning, the scientific progress of the last quarter of century, redirected the interest into the various cell processes, among which the metabolism is noteworthy. An introductory review of ageing modulation by metabolism is the purpose of the present paper.

Methods: Review of data collected from indexed original research and review papers on the subject.

Results and Conclusions: The contribution of metabolism to an ageing retardation is indicated by the favourable effect of calorie restriction in longevity and health of laboratory animals, as complex as primates, down to unicellular yeasts. This and other experiments are demonstrative of the inter-species similarity of some mechanisms underlying ageing and longevity, and thus its universality. Beyond that, the existence of strains of rodents and other species displaying phenotypes of accelerated or retarded ageing, caused a search of the putative genes involved. It was verified that some of these encode proteins which intervene in the transductive cascade that is activated after insulin or IGF-1 are bound to their receptors. Some mutations, having loss of function, result in a delay or blockade of the intracellular process of glucose utilization. The recognition of the affected metabolic pathways in organisms having an increased longevity suggests the possibility of a pharmacological intervention. Among the compounds having high potential, the sirtuins are noteworthy; they are activated in the course of calorie restriction and have an enhanced expression in genetically modified organisms with increased longevity.

KEY-WORDS

Ageing, Metabolism, Calorie Restriction, Sirtuin.

INTRODUÇÃO

Com o aumento progressivo da esperança de vida dos habitantes das sociedades ocidentais e do número de indivíduos idosos dentro da população, o interesse pelo envelhecimento cresceu de forma notável. Questões de ordem sociológica, psicológica e económica que o envelhecimento gera, têm sido objecto frequente de discussão e entraram até na agenda política. Não ignorando esses aspectos, relevantes sem dúvida, é o conhecimento da faceta biológica do problema que mais interesse suscita porque o envelhecimento é um importante factor de morbidade e fragilidade física em geral¹ e qualquer acção atenuadora dos seus efeitos na saúde terá de ser feita no âmbito biomédico.

A amplitude da morbidade é grande: enquanto que num único indivíduo idoso é frequente observar vários padecimentos, noutros indivíduos é possível encontrar um estado de saúde inesperadamente bom ou verificar que tiveram longas vidas sem doença clínica até próximo do fim². O reconhecimento de factores biológicos, nutricionais ou ambientais, em sentido lato, que condicionam o modo de envelhecer, seria um passo importante para aliviar alguns desses males.

Há perto de 60 anos, o envelhecimento era um problema biológico intrigante. «An unsolved problem» foi o título de uma lição inaugural do ano académico 1951 no University College de Londres, da autoria do influente biólogo

inglês e laureado Nobel, Sir Peter Medawar³. De então para cá não deixou de intrigar, mas foram dados passos muito importantes para o clarificar.

O primeiro problema a resolver é entender o que é o envelhecimento. O conceito mais comum é o funcional, a diminuição progressiva das capacidades funcionais de órgãos e sistemas, e foi analisado durante décadas. Porém, com as técnicas dos últimos 30 anos, a Gerontologia levou o estudo até à biologia das células e moléculas e procura mesmo genes moduladores da longevidade. Tal obrigou a um reajustamento do conceito.

No domínio biológico, não se trata apenas de observar o fenómeno e descrevê-lo, o que se tem feito desde há mais de um século, mas sobretudo compreendê-lo e procurar as suas causas no quadro das muitas teorias e hipóteses propostas. O processo tem sido de tal modo profícuo que alguns investigadores crêem que num intervalo de algumas décadas se poderá parar o fenómeno, senão mesmo revertê-lo⁴.

Não obstante as análises genéticas já feitas e os muitos genes de envelhecimento estudados, não há evidência de este seja geneticamente programado, do modo como o é o desenvolvimento embrionário. O assunto foi colocado num espaço próprio, fora do Desenvolvimento, e sob uma acção maior das influências ambientais, de que o tipo, a quantidade e o momento do aporte de nutrientes parecem ser determinantes. Porém, não se pode ignorar a contribuição

genética, até porque o ambiente é modulador da expressão dos genes e estes condicionam a taxa de utilização desses nutrientes.

Deve realçar-se que o termo longevidade muitas vezes se confunde com envelhecimento, mas apesar de relacionados, são entidades distintas. O envelhecimento, relembra-se, é a perda funcional progressiva, enquanto que a longevidade é a duração da vida. O envelhecimento impõe um limite à longevidade. Se ele for mais rápido, como sucede em diversos síndromas da patologia humana (Werner, Hutchinson-Gilford, entre outros), a longevidade encurta; se o envelhecimento for mais lento, qualquer que seja o motivo, a longevidade aumenta.

A longevidade é um dado muito usado em gerontologia porque é muito fácil de delimitar: é simplesmente a idade no momento da morte. Para mamíferos como os seres humanos, muitos deles com longevidades perto dos 100 anos, seria sempre problemático saber dos efeitos de determinada acção experimental; neles procuram-se activamente marcadores biológicos de envelhecimento. Todavia, nos ratos e ratinhos, que vivem até 3 anos, já é mais fácil; mas onde é verdadeiramente fácil estudar a longevidade, é em determinados invertebrados, de que há espécies com ciclos de vida muito bem conhecidos: a longevidade média de uma mosca como a *Drosophila melanogaster* é de 12-14 dias⁵, a de um nemátode como o *Caenorhabditis elegans* é de perto de 5 semanas⁶ e a de uma levedura como o *Saccharomyces Cerevisiae* é de alguns dias, dependendo do número de divisões que realizar⁷.

A breve esperança de vida destas espécies é pois uma vantagem. Mas uma razão adicional para o seu uso, é a semelhança funcional interespécies de muitos dos processos essenciais à vida: a síntese de proteínas, a resposta ao stress, a replicação do ADN, o ciclo celular e a apoptose, são processos complexos, que seguem determinadas cascatas sequenciadas de reacções e utilizam moléculas muito semelhantes entre si, por vezes mesmo iguais. Por estas razões, se compreende que a busca do conhecimento acerca do envelhecimento nesses seres mais primitivos seja hoje muito activa, por se admitir que seja aplicável aos seres humanos.

Nos parágrafos seguintes, procurar-se-á mostrar como a extracção e o uso da energia dos nutrientes (o metabolismo, numa palavra)

se tornaram factores importantes no estudo do envelhecimento, justamente por a sua taxa de utilização parecer condicionar a longevidade. O seu papel na modulação do processo apoia-se em trabalho experimental que se pode dividir em dois tipos de intervenções: os modelos de restrição calórica e os que envolvem modificações genéticas.

RESTRIÇÃO CALÓRICA

O modelo da restrição calórica (RC) não emprega seres geneticamente modificados. Basicamente, trata-se de submeter animais de experiência a uma restrição de calorias, que varia entre 30% a 65%, comparativamente com os sujeitos controlo que as ingerem sem restrição.

O modelo de RC é antigo. Em 1935, McCay e cols.⁸ publicaram os resultados de um estudo que mostrava que ratinhos submetidos a RC tinham longevidade maior em comparação com os que ingeriam dieta *ad libitum*. Este achado constituiu o primeiro trabalho experimental bem controlado que interligava a longevidade com o metabolismo.

O aumento da longevidade não é o único efeito benéfico reconhecido no modelo de RC. Os roedores, que são os mamíferos melhor estudados, apresentam menores taxas de morbidade⁹, menos tumores¹⁰, melhor adaptação a condições de stress, redução do colesterol plasmático¹¹, da tensão arterial, da glicemia e da insulinemia¹², entre muitos outros parâmetros.

Há alguma controvérsia quanto ao melhor momento para introduzir a RC na vida de um roedor, por forma a obter-se o efeito máximo na longevidade, mas a generalidade dos estudos sugere que quanto mais prolongada for a acção (a RC), mais prolongado é o efeito na longevidade e na esperança média de vida⁹. Alguns estudos mostraram que, nos mamíferos, em contraste com outras espécies, o início tardio ou a suspensão da RC em tempos intermédios da vida, ainda se traduz em prolongamentos intermédios da longevidade, menores quando comparados com a RC toda a vida, o que sugere a existência de uma memória do efeito da RC no organismo dos mamíferos e admite-se que tal se deva aos seus complexos sistemas endócrinos, inexistentes nos invertebrados. Este modelo é muito robusto porque além dos mamíferos

(os roedores da espécie *Rattus norvegicus* e *Mus musculus* e primatas não humanos), já foram submetidos à RC experimental diversas espécies, além dos invertebrados antes referidos e em todos eles a acção foi eficaz no aumento da longevidade¹³.

A redução da ingestão calórica sugere que o metabolismo esteja reduzido, mas os estudos mostraram que no tempo, de facto, a taxa metabólica (número de calorias/Kg/hora) dos animais em RC é superior à dos animais em ingestão *ad libitum*^{14,15}. Este facto contraria a percepção comum, de que o efeito da RC se deve a um abrandamento do metabolismo, mas é inquestionável que em cada unidade de tempo se usa menos energia, provavelmente devido à activação de um processo optimizador da sua utilização.

Muito debatido é o mecanismo subjacente. Originalmente, pensou-se que tal se devia a um retardamento da maturidade do animal (o que fazia sentido se o envelhecimento fosse um processo geneticamente programado) e também se julgou que resultava da redução da taxa metabólica. Actualmente, essas explicações não gozam de suporte experimental consistente.

Melhor apoiada é a hipótese dos radicais livres de oxigénio ou espécimes reactivos de oxigénio (ROS), cuja acção fundamenta a teoria do envelhecimento a radicais livres, proposta por Denham Harman¹⁶. Não se irá aqui debater as bases químicas dos ROS, mas lembra-se que de todo o oxigénio utilizado pelas células na respiração, cerca de 2% dos átomos ficarão apenas parcialmente reduzidos, por aceitarem um só electrão. O anião superóxido resultante é muito reactivo e por isso depressa oxida parcialmente outras moléculas que se encontrem próximo tais como lípidos, proteínas ou ácidos nucleicos. Apesar de as células possuírem diversos meios de neutralização da reactividade, como a dismutase do anião superóxido (a SOD, com várias isoformas), a peroxidase da glutationa e a catalase, entre outros, há sempre alguns radicais livres que acabam mesmo por oxidar outras moléculas que se tornam funcionalmente menos capazes (para uma revisão, consultar¹⁷).

Os efeitos dos ROS sobre as biomoléculas evidenciam-se mais em células ou tecidos de animais envelhecidos; há aumento dos níveis de oxidação lipídica, de «cross-links» das pro-

teínas e da sua oxidação, há glicoxidação e mutações no ADN genómico, sobretudo mitocondrial^{18,19}.

MODIFICAÇÕES GENÉTICAS

Além de ser possível prolongar a longevidade em roedores restringindo a quantidade de calorias que ingerem, pode observar-se o mesmo efeito sem RC em estirpes de ratinhos, ou outras espécies, com determinadas mutações espontâneas ou com inactivação selectiva de certos genes (estirpes «knock out») directamente envolvidos em processos metabólicos.

No primeiro grupo, de mutações espontâneas, contam-se três estirpes de ratinhos: a «Ames dwarf», ADw, a «Snell dwarf», SDw, e a GHRHR («growth hormone releasing hormone receptor»), mutante incapaz de produzir o factor libertador da hormona de crescimento. Em todas estas estirpes mutantes, os animais são mais pequenos que os seus homólogos selvagens porque em todas há deficiência da hormona do crescimento (GH, de «Growth Hormone»). O mutante GHRHR tem mesmo cerca de metade do tamanho!

Os animais ADw são homocigotos para uma mutação inactivadora do gene *Prop-1* (são os *Prop-1^{dw/dw}*). Além da deficiência em GH, são ainda deficitários em outras hormonas hipofisárias, como a TSH e a prolactina, manifestam fertilidade reduzida, exibem aumento da actividade da isoforma CuZn da SOD e diminuição dos níveis circulantes de insulina, IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) e glicose²⁰. A proteína codificada pelo gene *Prop-1* é necessária para a activação de um outro gene, o *Pit-1*. Mutações deste gene em ambos os alelos, *Pit-1^{dw/dw}*, encontram-se na estirpe «Snell dwarf» já referida e o resultado fenotípico é análogo, em especial a deficiência em hormona do crescimento, e com esta também a redução da cascata de sinalização do receptor da insulina/IGF-1^{21,22}. Os ADw e os SDw exibem longevidade aumentada, da ordem dos 50%, e uma redução do peso para cerca de 30%, em comparação com as estirpes selvagens. Os GHRHR, *Ghrh^{lit/lit}*, têm longevidade aumentada de 25% e exibem também redução da massa corporal, menos marcada.

O segundo grupo de animais, estes já com inactivações selectivas, é composto por duas

estirpes diferentes. Numa delas, os animais são «knock out» homozigotos para o receptor da GH e por isso têm uma redução marcada em IGF-1 circulante em comparação com os controles²³.

A outra estirpe é de heterozigotos para o receptor de IGF-1 (os homozigóticos são inviáveis), o que não impedindo níveis circulantes normais de IGF-1, obsta ao seu efeito integral por perda parcial de função do seu receptor. Neste grupo, o ganho em longevidade é pequeno, 16-30%, comparado com os mutantes espontâneos antes referidos²⁴.

Merecem menção os animais «knock-out» para o receptor da insulina, de que há vários tipos conforme o local onde o receptor fica inativado. O mais interessante é o FIRKO («Fat-Specific Insulin Receptor Knock-Out») no qual o receptor da insulina está ausente apenas do tecido adiposo. Contrariamente a «knock-outs» com inactivação do receptor em outros tecidos, os FIRKO têm prolongamento da longevidade (cerca de 18%) sugerindo um papel modulador do tecido adiposo no acentuar da taxa de envelhecimento²⁵.

A diminuição da acção do IGF-1 e a sua associação ao envelhecimento nos mamíferos, permite estabelecer um paralelismo com o que se passa em outras espécies. Já se referiu a importância para o estudo do envelhecimento de que gozam certas espécies com ciclos de vida curtos, mas lembra-se que foi em 1983, que se identificou o primeiro gene do envelhecimento, designado *age-1*, numa estirpe mutante do *C. elegans*²⁶, que se caracteriza por possuir uma longevidade 65% superior à das estirpes selvagens²⁷. O estudo funcional mostrou que o ortólogo do mutante *age-1* codifica uma cínase (a cínase do 3-fosfatidilinositol) que é interveniente essencial da cascata de transdução que se processa após ligação do receptor IGF-1 com o seu ligando nos nemátodes (característico dessas espécies, mas similar ao dos mamíferos); a facilidade de manipulação do nemátode permitiu reconhecer muitos outros mutantes longevos, de que se destacam o *daf-2* e o *daf-16*²⁸. A proteína *daf-16*, funciona a jusante da *age-1*, na mesma cascata já referida. Quanto à *daf-2*, nos nemátodes ela é o próprio homólogo do receptor IGF-1 mamífero. Notoriamente, a diminuição da utilização de fontes energéticas comuns, retarda o envelhecimento.

Nos artrópodes, e nas leveduras encontraram-se cascatas similares compostas por moléculas exibindo elevada homologia com as agora descritas, de cuja mutação resulta também prolongamento da longevidade. Curiosamente, as mesmas cascatas são activadas quando os organismos são submetidos a acções stressantes como a radiação UV, a temperatura elevada, a privação de nutrientes, etc.. Estes factos permitem reconhecer que no curso da evolução, os mecanismos de longevidade se conservaram usando moléculas e vias de transdução semelhantes, o que apoia o uso de diversas espécies como modelos de estudo da fisiologia ou da patologia humanas. Não menos, os estudos indicam que o envelhecimento e a longevidade são processos exteriores aos programas de Desenvolvimento e reenquadram-se num novo paradigma: os mecanismos profundos de prolongamento tardio da vida são, antes disso, os mecanismos de sobrevivência e resposta ao *stress*, usados pelos seres vivos e células em cada instante.

INTERVENÇÃO NOS SERES HUMANOS?

A intervenção no curso do envelhecimento humano, para atenuar os sintomas e melhorar a saúde, é o objectivo final da investigação biogerontológica. Se se excluirmos os seres geneticamente manipulados, por razões óbvias, o modelo de RC é o único teoricamente possível.

Deve referir-se que a RC já foi testada em primatas não humanos. Os macacos Rhesus em RC têm menor susceptibilidade às infecções, às doenças cardiovasculares e à diabetes mellitus²⁹. Há ainda redução da tensão arterial, da insulina circulante, do colesterol total, do colesterol LDL (em contraste com o aumento do colesterol HDL) e dos triglicérides. Ao longo do envelhecimento há também uma menor redução da hormona DHEA-S. Portanto, a RC no macaco Rhesus acompanha-se de diminuição de morbilidade e apenas o pouco tempo de duração dos estudos ainda não permitiu confirmar se também aumenta a longevidade.

Em relação aos seres humanos, para além de alguns episódios anedóticos ao longo da História, há estudos com indivíduos em RC por períodos de vários meses ou anos, com resul-

tados próximos dos conhecidos para os outros primatas: redução da glicemia e insulinemia, redução de lípidos plasmáticos e dos leucócitos circulantes, diminuição da tensão arterial e em alguns casos, redução da espessura da parede de algumas artérias³⁰⁻³². Não obstante estes achados, seria sempre controversa uma proposta dietética equivalente à da RC já referida (em princípio, para toda a vida), assim como é de prever que a decisão para tal seria assumida por apenas um número limitado de seres humanos voluntários.

Em alternativa, outros achados sugerem a possibilidade de no futuro se fazer uma intervenção farmacológica.

Uma delas é com a hormona «Klotho». Originalmente, foi descrita numa estirpe de ratinhos com um gene mutado, que por isso se apresentava com um fenótipo de envelhecimento acelerado³³. Sabe-se hoje que o gene *Klotho* codifica uma proteína transmembranar, cujo domínio extracelular é lisado, entra na circulação e, nas células alvo, é capaz de inibir o processo transdutivo do receptor da insulina ou do IGF-1. Quando se criaram estirpes de ratinho com sobre-expressão do gene *Klotho*, observou-se longevidade aumentada, de cerca de 30%, em comparação com estirpes selvagens³⁴. É compreensível que um péptido com estas características tenha despertado notável interesse, pese embora ainda desconhecer-se as funções que o seu precursor transmembranar exerce nas células.

Outra intervenção potencial foi desenhada depois da realização de estudos com uma estirpe de *S. cerevisiae* possuidora de um mutante do gene designado *Sir2* (de «silencing information regulator 2») e exibindo envelhecimento acelerado. Esse gene mutante, com perda de função, permite a acumulação de um refugo de ARNr circular e propicia o fenótipo de envelhecimento acelerado já referido; porém, quando normal, o *Sir2* codifica uma desacetilase, num processo dependente do dinucleotídeo de nicotinamida (NAD), e quando o seu substrato são histonas, há condensação da cromatina e silenciamento da transcrição. O facto notável é que da sua sobre-expressão resulta alongamento da longevidade³⁵. O gene *Sir2* possui homólogos em outras espécies incluindo os mamíferos, *Sir2a* no ratinho e *SIRT1* no Homem. Os produtos dos genes *Sir2* compõem uma extensa família de

proteínas, as sirtuínas, cuja expressão aumenta no curso da RC em roedores³⁶, julgando-se até que essas proteínas são os mediadores dos efeitos fisiológicos da RC³⁷. Interessante é a sua expressão aumentar também por acção de polifenóis de origem vegetal, de que se salienta o resveratrol, abundante nas uvas tintas e por isso no vinho tinto. Em culturas de células, observou-se que o resveratrol melhora as suas respostas ao *stress* e proporciona uma boa capacidade de reparação do ADN, propriedades importantes para o aumento da longevidade. No caso de organismos, o resveratrol mostrou-se capaz de aumentar a longevidade de leveduras, nemátodes e artrópodes^{38,39} e a de ratinhos obesos em dieta hipercalórica⁴⁰, razão porque actualmente, os polifenóis são objecto de intensa pesquisa.

É de esperar que nos próximos anos sejam divulgados os resultados da utilização humana do resveratrol e muitos outros polifenóis.

CONCLUSÃO

Não obstante os grandes passos já dados para melhor se conhecer o fenómeno do envelhecimento, presentemente, estamos apenas a ultrapassar o princípio do fim⁴¹.

Nem todos os modelos experimentais em uso concordam em dar ao metabolismo o papel principal na causa ou curso do envelhecimento. Grandes processos celulares ou tecidulares como a apoptose, o ciclo celular, a reparação do ADN, a inflamação e o controlo de qualidade das proteínas, têm também evidência experimental a seu favor.

Porém, a saída do envelhecimento para fora do processo desenvolvimentista e toda a evidência acumulada ao longo de décadas acerca do uso das fontes energéticas e da sua interferência no envelhecimento, recolocam o metabolismo como seu condicionador inelutável e permitem antever a possibilidade de por esse meio o modular.

BIBLIOGRAFIA

1. Freedman VA, Martin LG, Schoeni RF. Recent trends in disability and functioning among older adults in the United States: a systematic review. *JAMA* 2002; 288: 3137-3146.
2. Hitt R, Young-Xu Y, Silver M, Perls T. Centenarians: the older you get, the healthier you have been. *Lancet* 1999; 354: 652-652.
3. Medawar PB. *An Unsolved Problem of Biology*. H.K. Lewis, 1952; London.
4. de Grey AD, Campbell FC, Dokal I, Fairbairn LJ, et al. Graham GJ, Jahoda CA, Porterg AC. Total deletion of in vivo telomere elongation capacity: an ambitious but possibly ultimate cure for all age-related human cancers. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1019: 147-170.
5. Curtsinger, J W, Gavrilova NS, Gavrilov LA. Biodemography of aging and age-specific mortality in *Drosophila melanogaster*. In *Handbook of the Biology of Aging*, 6th, Edts, E. Masoro and S. Austad, 2006; 267-281.
6. Henderson ST, Rea SL, Johnson TE. dissecting the processes of aging using the nematode *Caenorhabditis elegans*. In *Handbook of the Biology of Aging*, Sixth Edition. Austad, SN and Masoro, EJ (Eds.), Academic Press, New York, 2006; 360-399.
7. Bitterman KJ, Medvedik O, Sinclair DA. Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 67(3): 376-399.
8. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. Citado em Sinclair DA e Howitz KT, presente lista.
9. Weindruch R, Walford R. *The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction*. Charles C. Thomas, 1988; St. Louis, MO.
10. Hursting SD, Lavigne JA, Berrigan D, Perkins SN, et al. Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans. *Annu Rev Med* 2003; 54: 131-152.
11. Liepa GU, Masoro EJ, Bertrand HA, Yu BP. Food restriction as a modulator of age-related changes in serum lipids. *Am J Physiol* 1980; 238(3): E253-7.
12. Masoro EJ, McCarter RJ, Katz MS, McMahan CA. Dietary restriction alters characteristics of glucose fuel use. *J Gerontol* 1992; 47(6): B202-8.
13. Sinclair DA, Howitz, KT. Dietary restriction, hormesis and small molecule mimetics. In Masoro, EJ, Austad, S, *Handbook of the Biology of Aging*, 6th edition, Academic Press, 2006; 63-104.
14. Will, LC, McCay, CM. Ageing, basal metabolism and retarded growth. *Arch Biochem Biophys* 1941; 2: 481.
15. McCarter RJ, Palmer J. Energy metabolism and aging: a lifelong study of Fischer 344 rats. *Am J Physiol* 1992; 263: E448-52.
16. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11 (3): 298-300.
17. Beckman KB, Ames B. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78(2): 547-581.
18. Dufour E, Larsson NG. Understanding aging: revealing order out of chaos. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1658: 122-132.
19. Almeida, H, Magalhães, MC, Magalhães, MM. Age-related changes in lipid peroxidation products in rat adrenal gland. *AGE* 1998; 18: 194-195.
20. Bartke A, Brown-Borg H, Mattison J, Kinney B, et al. Prolonged longevity of hypopituitary dwarf mice. *Exp Gerontol* 2001; 36(1): 21-28.
21. Li S, Crenshaw EB 3rd, Rawson EJ, et al. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene *pit-1*. *Nature* 1990; 347: 528-533.
22. Flurkey K, Papaconstantinou J, Miller RA, Harrison DE. Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(12): 6736-6741.
23. Coschigano KT, Holland AN, Riders ME, List EO, et al. Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. *Endocrinology* 2003; 144(9): 3799-3810.
24. Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, et al. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 2003; 421(6919): 182-7.
25. Bluhner M, Kahn BB, Kahn CR. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 2003; 299(5606): 572-574.
26. Klass MR. A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results. *Mech Ageing Dev* 1983; 22(3-4): 279-286.
27. Johnson TE. Increased life-span of age-1 mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging. *Science* 1990; 249(4971): 908-912.

28. Hekimi S, Guarente L. Genetics and the specificity of the aging process. *Science* 2003; 299: 1351-1354.
29. Roth GS, Ingram DK, Lane MA. Caloric restriction in primates and relevance to humans. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 928: 305-315.
30. Walford RL, Harris SB, Gunion MW. The calorically restricted low-fat nutrient-dense diet in Biosphere 2 significantly lowers blood glucose, total leukocyte count, cholesterol, and blood pressure in humans. *PNAS USA* 1992; 89(23): 11533-11537.
31. Fontana L, Meyer TE, Klein S, Holloszy JO. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *PNAS USA* 2004; 101: 6659-6663.
32. Heilbronn LK, de Jonge L, Frisard MI, DeLany JP, et al. Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006; 295: 1539-1548.
33. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, et al. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390(6655): 45-51.
34. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, et al. Suppression of aging in mice by the hormone *Klotho*. *Science* 2005; 309(5742): 1829-1833.
35. Kaeberlein M, McVey M, Guarente L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 1999; 13(19): 2570-2580.
36. Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004; 305(5682): 390-392.
37. Guarente L, Picard F. Calorie restriction – the SIR2 connection. *Cell* 2005; 120(4): 473-482.
38. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003; 425(6954): 191-196.
39. Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 2004; 430(7000): 686-689.
40. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006; 444: 337-342.
41. Martin G, LaMarco K, Strauss E, Kelner K. Research on ageing. The end of the beginning. *Science* 2003; 299: 1399-1340.