



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
RENORBIO - REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BIOMARCADORES DA LONGEVIDADE HUMANA E BIOATIVIDADE DO
EXOPOLISSACARÍDEO BOTRIOSFERANA NO ENVELHECIMENTO

GERALDA GILLIAN SILVA SENA

VITÓRIA - ES

2016



RENORBIO - REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BIOMARCADORES DA LONGEVIDADE HUMANA E BIOATIVIDADE DO
EXOPOLISSACARÍDEO BOTRIOSFERANA NO ENVELHECIMENTO

GERALDA GILLIAN SILVA SENA

VITÓRIA - ES

2016

GERALDA GILLIAN SILVA SENA

BIOMARCADORES DA LONGEVIDADE HUMANA E BIOATIVIDADE DO
EXOPOLISSACARÍDEO BOTRIOSFERANA NO ENVELHECIMENTO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Ponto Focal Espírito Santo, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia (Saúde).

Orientadora: Dra Flavia de Paula.

Coorientadora: Dra Maria do Carmo P. Batitucci.

VITÓRIA
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

S474b Sena, Geralda Gillian Silva, 1981 -
Biomarcadores da longevidade humana e bioatividade do
exopolissacarídeo botriosferana no envelhecimento / Geralda Gillian
Silva Sena – 2016.
179 f. : il.

Orientador: Flavia de Paula.

Coorientador: Maria do Carmo Pimentel Batitucci.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Longevidade. 2. Biomarcadores. 3. Envelhecimento.
I. Paula, Flavia de. II. Batitucci, Maria do Carmo Pimentel.
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. IV. Título.

CDU: 61

GERALDA GILLIAN SILVA SENA

BIOMARCADORES DA LONGEVIDADE HUMANA E BIOATIVIDADE DO
EXOPOLISSACARÍDEO BOTRIOSFERANA NO ENVELHECIMENTO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Ponto Focal Espírito Santo, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia (Saúde).

Aprovada em 15 de julho de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Flavia de Paula
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Dra. Maria do Carmo Pimentel Batitucci
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-orientadora

Dra. Sandra Ventorin von Zeidler
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro interno

Dra. Maria Aparecida Marin-Morales
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Membro externo

Dra. Flávia Imbroisi Valle Errera
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de
Vitória
Membro externo

Dr. Renato Lírio Morelato
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de
Vitória
Membro externo

Aos meus amores, Marcelo e nossa filha, Laís, dedico.

*“Aquelas rugas que sulcam a fronte da velhinha;
aquele caminhar recurvo e tremulante,
aquelas palavras curtas, densas de experiência
e sabedoria; aquele doce olhar de menina
e mulher ao mesmo tempo, porém mais bondoso
que de uma e de outra,
é uma beleza que nós não conhecemos”*

Chiara Lubich.

*“Todo caminho da gente é resvalozo...
mas, também, cair não prejudica demais-
a gente levanta, a gente sobe, a gente volta!...
O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim:
esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.”*

Guimarães Rosa.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, que no seu silêncio, me acolheu nos momentos de dificuldade, me ajudou a superar os obstáculos e recomeçar...

À minha família, mesmo distante, pela torcida... àqueles mais próximos, meus primos Kélem e Fernando, Letícia e Gabriela, meus tios, Maria e Estevão, obrigada por me acolherem, pelo carinho e força...

À minha mãe, pelo exemplo de vida, garra e determinação! Muito obrigada, mãe, pelas inúmeras vezes que se fez presente, cuidando da nossa amada Laís, pelas orações e preocupação com os meus momentos de estudo... ao meu pai, por me guiar sempre pelos bons caminhos...

Ao meu irmão que, mesmo tão longe, teceu palavras de apoio e incentivo, vibrando com minhas conquistas...

Ao meu companheiro de todas as horas, Marcelo, pela sua presença constante durante todos esses anos... Obrigada por me amparar nas incertezas, expectativas, fracassos e por vibrar e torcer pelas minhas vitórias! Só nós dois sabemos o quão difícil foi para chegar até aqui... Minha gratidão por ter sido presente na vida da nossa preciosidade, Laís, de forma incansável enquanto eu estudava e durante os experimentos... Sem todo seu apoio, amor, carinho e compreensão eu não teria conseguido!! Meu amor e admiração por você crescem, sem medidas...

À minha amada filha, Laís, pelo seu amor incondicional, carinho e palavras doces... Quantas vezes, enquanto eu estudava, estive ao meu lado, fazendo seus desenhos, com um sorriso no rosto e me pedindo para guardar todos... mesmo tão pequena, filha, você me faz aprender todos os dias e me tornou ricamente feliz, por ser mãe! Amo você de todo meu coração!

Às minhas orientadora e co-orientadora, Flavia de Paula e Maria do Carmo Pimentel Batitucci. Minha gratidão a vocês, pela oportunidade, por acreditarem que seria possível naquela primeira reunião, mesmo diante dos desafios que estavam postos; obrigada pela

amizade, ensinamentos, conversas, pelas inúmeras e infindáveis reuniões, por não medirem esforços para ajudar, pelos valores que, com certeza, serão levados para toda a vida...

Foram inúmeros dias, horas, de muita dedicação e esforço, destinados aos experimentos e à conclusão desse trabalho, mas não menos importantes, foram os laços de amizade construídos, que nos fortalecem e nos mostram como tudo se torna mais fácil e prazeroso se temos amigos no nosso entorno...

Aos amigos do Núcleo de Genética Humana e Molecular, àqueles que passaram por aqui: Luciano Belcavello, obrigada pelos auxílios no início de tudo, e Clara Barbirato, não tenho como agradecer todas as vezes que interrompia o que estava fazendo para sempre, com muita disposição, me ajudar!! Leila, obrigada pelas sugestões... Maíra, pela amizade e apoio indispensável... Lígia, muito obrigada, querida, por tudo! Por sempre estar disposta a ajudar... Ludmila e Hully, pelos desafios e descobertas iniciais; Aline, pela presença a tempo e a contento; Nathália, pelos auxílios em tudo que foi necessário; Dalila, pelo apoio no hospital, no preparo de amostras, pela amizade...

Meu agradecimento especial à amiga e parceira de todas as horas, Daniela Camporez! Dani, muito obrigada pela sua disponibilidade incessante!! Pelas horas intermináveis de experimentos, pela sua amizade, pela busca contínua de conhecimento, ensinamentos... como aprendi com você! Por ser ombro amigo nos momentos de dificuldade e de alegrias... por todo carinho dispensado à minha filha, Laís...

Aos amigos do Laboratório de Genética Vegetal e Toxicológica: Juliana, muito obrigada por tudo!! Jú, que eu possa me espelhar nas suas atitudes, na sua disponibilidade de sempre... agradeço pelos ensinamentos, pela companhia agradável durante os experimentos...Débora, pelos desafios iniciais, Suiany, obrigada pela parceria incessante, mesmo tão jovem, você abriga muita maturidade e sabedoria, Lorena, sempre presente nos momentos que precisava, Pati, querida, muito obrigada por tudo!! Anny e Irany, dupla infalível, agradeço pelo apoio de sempre e amizade, Tarsila, Filipe, Judá, pelos auxílios, Mainã, Monique... Jean, pela parceria indispensável e incessante, ao final desse trabalho...muito obrigada!!

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Translacional, em especial, ao Marcos e Ananda, por todo suporte, discussões e amizade!

À professora Aneli de Melo Barbosa e ao Dr. Robert Dekker, pela oportunidade de executar parte desse trabalho com a molécula botriosferana... foi enriquecedor! Obrigada pelas valiosas contribuições na revisão do manuscrito e apoio na concretização desse trabalho...

À professora Lúcia Sagrillo, por todo auxílio nas análises estatísticas, momentos únicos de aprendizado e amizade...

Aos funcionários do Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), obrigada pelo apoio e auxílio no que foi necessário.

Às colaborações que tornaram esse trabalho possível: Laboratórios de Mutagênese Ambiental, Histologia Molecular e Imunohistoquímica, de Química de Proteínas, Fisiologia Translacional, Patologia Molecular, de Tuberculose, de Virologia e Gastrenterite da UFES; Laboratório de Análises Toxicológicas – Universidade Feevale, Biotério do Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, Laboratório de Fisiopatologia de Doenças Humanas e Animais da Universidade Vila Velha e Laboratório Bioclínico. Agradeço aos professores coordenadores desses laboratórios, Sílvia Tamie, Suely Figueiredo, Silvana Meyrelles, Sandra Zeidler, Moisés Palaci, Liliana Spano, Rafael Linden, Thiago Pereira, alunos e técnicos pela cessão de espaço, uso de equipamentos, infraestrutura e análises.

Às minhas amigas Maressa Malini e Juliana Carnielli, que a vida acadêmica me deu de presente, pelo apoio, sempre que necessário... Maressa, obrigada pelos incentivos que me encorajaram a “conhecer” a botriosferana. Jú, querida, conviver com você é muito gratificante!! Vocês são cientistas inigualáveis! Como é bom aprender com vocês!

Aos amigos, Anatália e Flaine, que por tantas vezes fizeram-se presentes, nas orações e alegrando os dias da minha pequena Laís, com a amiguinha Isabela...

Aos colegas do Curso de Nutrição, da Universidade Federal do Espírito Santo, pelo apoio. Em especial, às amigas Míriam C. R. Barbosa, Érika M. M. da Silva, Jackline F. B. de São José e Daniela A. Silva, que me apoiaram e deram condições para que esse trabalho se concretizasse...

Não poderia deixar de registrar aqui meus agradecimentos àqueles que estiveram comigo e contribuíram, de forma ímpar, na minha formação acadêmica: aos mestres Elísio Alberto Evangelista, Marcelo Eustáquio Silva, Margarete Santos, Margareth Corrêa (Universidade Federal de Ouro Preto), Suely Gomes de Figueiredo e Sílvia Tamie Matsumoto (UFES).

À toda equipe do Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Vitória e do Abrigo à Velhice Desamparada Auta Loureiro Machado (AVEDALMA), por nos acolher e estarem sempre prontos a ajudar...Em especial à Amábilis, Flávia, Érica, Lidiane, Débora, Taciana, Paula, Dr. Renato, Dra. Lívia, Dra. Alessandra. Obrigada pelo aprendizado e convivência agradável...

Aos idosos e seus familiares, pela participação nessa pesquisa... Foi uma experiência de vida única conviver com vocês!

Aos animais, parte fundamental desse trabalho...

À Secretaria do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (Renorbio). Kárita e Sara, muito obrigada por toda atenção e auxílio, sempre que necessários.

Aos professores membros da Banca Avaliadora, pela disponibilidade, participação e avaliação desse trabalho.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, ao Centro de Ciências da Saúde e Departamento de Educação Integrada em Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo, pelo afastamento, de dois anos, concedido para cursar o doutorado.

À secretaria do Departamento de Educação Integrada em Saúde, em especial, à Synthia e Josefa, muito obrigada por todo auxílio...

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação no Espírito Santo (FAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento parcial dessa pesquisa.

RESUMO

Nas últimas décadas, observou-se crescimento mundial da população idosa, associado ao aumento da longevidade. Múltiplos fatores, entre eles, ambientais, comportamentais e genéticos, podem influenciar na longevidade humana. Existe grande interesse no desenvolvimento de produtos naturais com propriedades funcionais e/ou de saúde. Exopolissacarídeos (EPS) fúngicos, como a (1→3;1→6)-β-D-glucana botriosferana, sintetizado por *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, são candidatos promissores por serem considerados modificadores da resposta biológica. O presente estudo visou: a) investigar em seres humanos possíveis biomarcadores da longevidade, por meio da avaliação da frequência de polimorfismos nos genes *FOXO3* (rs2802292), *SOD2* (rs4880), *APOE* (rs429358 e rs7412) e *SIRT1* (rs2273773) em amostra de idosos da Grande Vitória, ES, bem como seu estado de estresse oxidativo e o nível de integridade do DNA; b) avaliar antimutagenicidade, mutagenicidade e citotoxicidade da botriosferana, em camundongos *Swiss*, jovens e idosos, de ambos os sexos, bem como seus potenciais hipolipidêmico, hipoglicêmico e antiaterogênico em camundongos idosos knockout para receptor de LDL (*LDLr^{-/-}*), e seu *background* (C57BL/6). Para alcançar os objetivos: a) na amostra de idosos, foram caracterizados dados demográficos, sócioeconômicos, antropométricos, bioquímicos, clínicos e estilo de vida. Polimorfismos genéticos foram analisados pela reação em cadeia da polimerase em tempo real; malondialdeído, por cromatografia líquida de alta eficiência e danos genômicos, pelo Ensaio do Cometa em grupos de longevos e controles (≥ 85 anos e 70-75 anos); b) com animais - botriosferana, foi administrada, via gavagem (doses 7,5, 15 e 30 mg/kg p.c./dia), em protocolo de pré-tratamento de 30 dias (camundongos jovens) e 15 dias (camundongos idosos) para investigar seus potenciais mutagênico e anticitogenotóxico contra danos induzidos pela ciclofosfamida. O teste do Micronúcleo foi realizado em eritrócitos de sangue periférico e medula óssea dos camundongos. Efeitos glicolipidêmico e ateroprotetor do EPS (30 mg/kg p.c./dia, por gavagem) entre animais *LDLr^{-/-}*, que receberam dieta aterogênica, foram verificados por meio das medidas de glicose plasmática e perfil lipídico, após tratamento de 15 dias, com kits colorimétricos comerciais. A lesão aterosclerótica foi quantificada por meio da análise da deposição lipídica aórtica (*en face*), com *Oil-Red-O*. A análise estatística foi realizada por meio dos testes χ^2 , exato de Fisher, Tukey, *t* Student, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) ($p < 0,05$). Entre os idosos longevos e controles, os níveis plasmáticos de malondialdeído e dano ao DNA apresentaram valores semelhantes. Observou-se associação positiva entre o rs2802292 *FOXO3* e longevidade. Características

bioquímicas e antropométricas, relacionadas ao envelhecimento saudável, mostraram resultados significativos. Nos ensaios *in vivo*, botriosferana, nas três doses, não foi mutagênica, nem citotóxica, exerceu efeito antimutagênico e ainda reduziu o percentual de danos entre animais jovens e idosos (*Swiss*, C57BL/6 e LDLr^{-/-}). Houve redução nos níveis plasmáticos de glicose (36%), melhora no perfil lipídico (reduções de 53,8-84,3%) e diminuição da deposição lipídica aórtica (32,8%) de LDLr^{-/-} ateroscleróticos tratados com esse EPS. Nossos resultados constituem informações inéditas acerca da longevidade humana, na população brasileira, e contribuem para o futuro promissor da geriatria genômica e da medicina personalizada. Além disso, indicam que botriosferana possui efeitos biológicos relevantes, sendo candidato promissor no desenvolvimento de novos produtos terapêuticos.

Palavras-chave: longevidade humana • gene *FOXO3* • botriosferana • citogenotoxicidade • efeito glicolipidêmico.

ABSTRACT

In the last decades it has been observed a world grow in elderly population associated with the increase of longevity. Multiple factors, among them, environmental, behavioral and genetic can influence human longevity. There is a great interest in improvement of natural products with functional and/or health proprieties. Fungal exopolysaccharides (EPS) as (1→3;1→6)- β -D-glucan botryosphaeran, secreted by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, are promising candidates for being considered modifiers of biological response. The present study aimed: a) to investigate in human possible longevity biomarkers through the frequency of polymorphisms at the genes *FOXO3* (rs2802292), *SOD2* (rs4880), *APOE* (rs429358 and rs7412) and *SIRT1* (rs2273773) in a sample of elders of Grande Vitória, ES, as well as its state of oxidative stress and DNA integrity level; b) asses antimutagenic, mutagenic and cytotoxic of botryosphaeran in young and aged *Swiss* mice, from both gender, as well as its hypolipidemic, hypoglycemic and antiatherogenic potential in older male LDL receptor knockout (LDLr^{-/-}) animals and its *background* (C57BL/6). To achieve the objectives: a) in elderly sample, it was characterized demographic, socioeconomic, anthropometrics, biochemical, clinics and life style data. Genetic polymorphisms were analyzed through real time polymerase chain reaction; the malondialdehyde, by high performance liquid chromatography and genomic damage, by alkaline comet assay in groups of long-lived individuals and controls (≥ 85 years and 70-75 years); b) with animals - botryosphaeran, was administrated, by gavage (doses of 7.5, 15 and 30 mg/kg b.w. per day) in a 30-day pre-treatment in 30-day protocol (young mice) and 15-day protocol (older mice) to investigate its mutagenic and anticytogenotoxic potential against damages induced by cyclophosphamide. The micronucleus assay was carried through erythrocytes of peripheral blood and bone marrow from mice. Glucolipidemic and atheroprotective effects of EPS (30 mg/kg b.w. per day, by gavage) among LDLr^{-/-} animals, that received atherogenic diet, were verified by plasmatic glucose measure and lipidic profile after 15 days of treatment, with commercial colorimetric kits. The atherosclerotic lesion was quantified by aortic lipidic deposition analysis (*en face*), with *Oil-Red-O*. The statistical analysis was performed by χ^2 test, Fisher exact test, Tukey test, *t* Student, Mann-Whitney and Hardy-Weinberg Equilibrium (H-WE) ($p < 0.05$). Among oldest-old individuals and controls, the plasmatic levels of malondialdehyde and DNA damage had similar values. It was observed a positive association between rs2802292 *FOXO3* and longevity. Biochemical and anthropometric characteristics, related to successful aging, showed significant results. In *in vivo* assay, botryosphaeran, in the 3 doses,

it was not mutagenic and still reduced the percentage of damage between young and older animals (*Swiss*, C57BL/6 e LDLr^{-/-}). There was reduction in glucose plasmatic levels (36%), improved in lipidic profile (reductions of 53.8-84.3%) and decreased of aortic lipidic deposition (32.8%) in the LDLr^{-/-} atherosclerotic mice treated with EPS. Our results provide new insights of human longevity, in Brazilian population, and contribute to a promising future of genomic geriatric and personalized medicine. Moreover, it does indicate that botryosphaeran has relevant biologic effect, making it a promising candidate for new therapeutic products development.

Keywords: human longevity • *FOXO3* gene • botryosphaeran • cytogenotoxicity • glucolipidemic effect.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Estrutura etária relativa, por idade e sexo, em milhões de pessoas, no Brasil – 1940 a 2050.....	23
Figura 2 – Mudanças nas frequências genótípicas em função da idade.....	32
Figura 3 – Via de sinalização <i>Insulin/Igf1-like</i> e suas implicações na longevidade.....	39
Figura 4 – Representação esquemática da localização dos SNPs rs429358 e rs7412, no exon 4, do gene <i>APOE</i> e suas possíveis isoformas, de alelos e proteína, de acordo com as mudanças nos resíduos dos aminoácidos 112 e 158.....	43
Figura 5 – Papéis metabólicos de SIRT1 nos tecidos periféricos e no sistema nervoso central.....	45
Figura 6 - Etapas da Peroxidação Lipídica.....	48
Figura 7 - Classes de Cometa que podem ser encontradas na análise.....	51
Figura 8 - Estrutura química da (1→3;1→6)-β-D-glucana do exopolissacarídeo botriosferana.....	56
Figura 9 – Formação de micronúcleos em células expostas a agentes genotóxicos.....	61
Tabela 1 – Estudos desenvolvidos no Brasil sobre Longevidade Humana e Variantes genéticas.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C. – antes de Cristo

ApoE – apolipoproteína E

Arg- arginina

Cis – cisteína

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CL-P1 – receptor colectina placentária-1

DAD - detector espectrofotométrico com arranjo de diodos

DCDs – Doenças Crônico-Degenerativas

DCV – Doenças Cardiovasculares

d-Glcp - D-glicopiranosídeos

DNA - ácido desoxirribonucléico

DNPH - 2,4-dinitrofenilhidrazina

DRI – doenças relacionadas à idade

EPS – exopolissacarídeo

EROs – espécies reativas de oxigênio

FOXO - Forkhead box O

FOXO3 – Forkhead box O3

g - gramas

GH - hormônio do crescimento

GWAS - Genome-Wide Association Studies

IDL – lipoproteína de densidade intermediária

IGF-1 - fator de crescimento 1 da via *IIS*

IIS - insulin/Igf1-like signaling

iNOS – enzima sintase do óxido nítrico induzível

HDL-c – lipoproteína de alta densidade

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

Kg - quilogramas

L· - radicais livres de ácidos graxos

LDL-c – lipoproteína de baixa densidade

LDLr^{-/-} - camundongos com deleção gênica para o receptor de LDL, gerados no *background*

C57BL/6.

LH - ácidos graxos poliinsaturados
LOO· - peróxiradical do ácido graxo
LOOH - hidroperóxidos de lipídeo
mg - miligramas
MN – micronúcleos
MRB - modificador da resposta biológica
MDA – malondialdeído
NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH – hidreto de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NCE - Eritrócitos normocromáticos
NO – óxido nítrico
O₂⁻ - ânion superóxido
OH· - radical hidroxila
OMS – Organização Mundial de Saúde
PCE - eritrócitos policromáticos anucleados
PUFAs - ácidos graxos poliinsaturados
RC – restrição calórica
RNA – ácido ribonucléico
SB – sais biliares
SCGE - *Assay Single Cell Gel Eletrophoresis*
SIR2 – *Silent Information Regulator 2*
SIRT1 – *Silent Information Regulator Type 1*
SIRT1 - sirtuína
Sirt-1tg – linhagem transgênica do gene SIRT1
SNP – *single nucleotide polymorphism*
SOD – superóxido dismutase
SOD2 –Superoxide dismutase 2
TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TE – Teorias estocásticas
TP – Teorias Programadas
VLDL-c – lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	Envelhecimento: novo cenário mundial e brasileiro.....	23
2.2	Envelhecimento Humano e Teorias Postuladas.....	26
2.3	Longevidade Humana: conceito, fenótipos e fatores determinantes	30
2.4	Biomarcadores da Longevidade Humana	37
2.5	Genes associados à Longevidade Humana.....	38
2.5.1	<i>FOXO3</i>	38
2.5.2	<i>SOD2</i>	41
2.5.3	<i>APOE</i>	43
2.5.4	<i>SIRT1</i>	45
2.6	Estresse oxidativo, Malondialdeído e o Tempo de vida humano	48
2.7	Integridade genômica, Envelhecimento e Longevidade	51
2.8	Estratégias de Promoção do Envelhecimento Saudável.....	53
2.8.1	Glucanas.....	54
2.8.2	Exopolissacarídeo Botriosferana.....	57
2.9	Ensaio com Animais.....	59
2.9.1	Avaliação de antimutagenicidade e mutagenicidade.....	60
2.9.2	Modelo Animal para Aterosclerose.....	65
2.9.3	Efeitos de β -glucanas sobre glicemia, perfil lipídico e ateroproteção.....	68
3.	OBJETIVOS.....	75
3.1	Objetivo geral.....	75
3.2	Objetivos específicos.....	75
4	ARTIGOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DA TESE	77
4.1	Manuscrito 1-Longevity-associated <i>FOXO3</i> variant in a Brazilian population.....	em embargo

4.2 Manuscrito 2 – Botryosphaeran bioactivity in young, aged and LDLr ^{-/-} mice: DNA, glycemia, lipoproteins and lipid deposition.....	em embargo
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP).....	106
ANEXO B – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA).....	107
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	108
APÊNDICE B – Questionário de Saúde Pessoal.....	110

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, observou-se o crescimento mundial da população idosa devido à redução nas taxas de fecundidade e mortalidade. Esse aumento da expectativa de vida, tanto em países desenvolvidos, quanto naqueles em desenvolvimento, relaciona-se com as melhorias no saneamento básico, condições socioeconômicas, estilo de vida, bem como aos avanços das pesquisas em saúde (KINSELLA; HE, 2009).

No entanto, no Brasil e em outros países em desenvolvimento, o aumento da população idosa ocorreu sem a implantação adequada de políticas sociais, econômicas e de saúde, num contexto de fragilidade das instituições e dos serviços prestados a esse grupo vulnerável (NOGUEIRA et al., 2008). Dessa forma, existe a necessidade de adequação dessas políticas, assim como da inclusão dos idosos em pesquisas e incremento nos estudos sobre envelhecimento, longevidade e qualidade de vida.

O envelhecimento compromete a capacidade de resposta dos indivíduos ao estresse ambiental e à manutenção da homeostasia (ANSELMINI et al., 2009). Em decorrência das mudanças peculiares, com frequência, observa-se o surgimento de Doenças Crônico-Degenerativas (DCDs) como hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, dislipidemias, câncer, doenças reumatológicas e neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson.

Assim, os estudos sobre o envelhecimento, nas duas últimas décadas, buscaram estabelecer modelos que expliquem a relação entre o surgimento de doenças com a idade, mas também aqueles referentes a fenótipos positivos como a longevidade e o envelhecimento saudável (DAVINELLI; WILCOXX; SCAPAGNINI, 2012; FALLIN; MATTEINI, 2009).

A longevidade humana é um fenômeno complexo que pode ser influenciado pela interação de múltiplos fatores, ambientais, comportamentais e genéticos (BROOKS-WILSON, 2013). O estudo de seus possíveis preditores ou marcadores apresenta-se como uma das necessidades/prioridades mais cadentes, já que pode possibilitar o avanço de pesquisas relativas à prevenção e redução de doenças que acompanham o decorrer do tempo de vida.

O modo pelo qual a genética pode ser um fator determinante na longevidade tem provocado grande interesse de pesquisadores, sendo que, aproximadamente, 25% na variação da expectativa de vida em um adulto são atribuídos a diferenças genéticas. Adicionalmente, essa influência parece aumentar após sessenta anos de idade, tornando-se mais acentuada aos oitenta e cinco anos de vida ou mais (HERSKIND et al., 1996; HJELMBORG et al., 2006; PERLS et al., 1998).

Genes como *FOXO3* (*Forkhead box O3*), *SOD2* (*Superoxide dismutase 2*), *APOE* (*Apolipoprotein E*) e *SIRT1* (*Silent Information Regulator Type 1*) têm sido descritos como moduladores do tempo de vida e estão envolvidos em vias do metabolismo de lipídeos e carboidratos, com a resposta ao estresse oxidativo e com a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças que acompanham o envelhecimento (BARZILAI et al., 2012; DATO et al., 2013).

O decréscimo na atividade de agentes antioxidantes, acompanhado por uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), que caracteriza o processo de estresse oxidativo, também tem sido relacionado com o envelhecimento e suas morbidades. As EROs, extremamente instáveis, podem reagir com proteínas, ácido desoxirribonucléico (DNA) e lipídeos, alterando a homeostase celular (HARMAN, 1991; MATÉS et al., 1999). Os lipídeos são alvos endógenos facilmente acessíveis e rapidamente afetados pelos seus efeitos, o que favorece a formação de compostos secundários como malondialdeído, amplamente utilizado como marcador do processo (DE ZWART et al., 1999; ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLER, 1991).

Os danos oxidativos ao DNA também parecem ter um papel importante tanto no processo de senescência e no surgimento das doenças crônico-degenerativas, quanto no envelhecimento saudável, e seus níveis em fluidos biológicos, como plasma, e tecidos têm sido considerados biomarcadores confiáveis. Dentre as diversas propostas, o Ensaio do Cometa apresenta-se como uma das técnicas mais simples e difundidas para estudos genotoxicológicos em organismos superiores (NERI et al., 2015).

Investigar esses determinantes críticos do tempo de vida em populações ainda não estudadas pode aprimorar o conhecimento científico e auxiliar no desenvolvimento de estratégias relacionadas à

biogerontologia. A prevenção e controle das DCDs são também fundamentais para evitar consequências nefastas para a qualidade de vida e perdas nos anos de vida economicamente ativos em países em desenvolvimento (BRASIL, 2011).

Nesse sentido, em consonância com o Pacto pela Saúde e com a Política Nacional de Saúde da Pessoa Idosa, o Ministério da Saúde promulgou o Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônico-Degenerativas no Brasil, de 2011 a 2022. Esse plano visa preparar o Brasil para enfrentar e deter essas doenças, por meio de ações integradas, sustentáveis e baseadas em evidências, considerando como diretrizes a promoção da saúde, cuidado integral ao idoso e a alimentação um fator de risco modificável para as DCDs (BRASIL, 2011; BRASIL, 2006a;b).

Davinelli, Wilcox e Scapagnini (2012) descreveram também que o estudo dos mecanismos do envelhecimento nos mais variados grupos de seres vivos aponta a dieta como um importante modulador do processo, tanto no envelhecimento *per si*, quanto na própria longevidade, estendendo-a ou reduzindo-a.

Como ações de promoção da saúde, a utilização de glucanas, biopolímeros com potencial aplicação biotecnológica, tem se destacado porque podem auxiliar na prevenção e controle das DCDs (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Exopolissacarídeos fúngicos, como a (1→3;1→6)-β-D-glucana botriosferana, têm sido extensivamente explorados quanto aos seus possíveis benefícios na prevenção e tratamento de doenças que acompanham o envelhecimento, bem como na longevidade (KAGIMURA et al., 2015).

Diante do exposto, a investigação de fatores genéticos e sua associação com a longevidade humana, bem como a influência de características ambientais, danos oxidativos e genômicos sobre o tempo de vida, conduzidas em populações idosas ainda não estudadas, podem aprimorar o conhecimento científico e estabelecer estratégias públicas de acompanhamento/cuidado mais efetivas, sejam preventiva ou diagnóstica, de acordo com o perfil genético de cada paciente.

E ainda, estudos que busquem avaliar o potencial de aplicação biotecnológico da botriosferana podem auxiliar no estabelecimento de intervenções terapêuticas e preventivas para diversas

doenças relacionadas ao envelhecimento que acarretam taxas de mortalidade e morbidade significativas e oneram o sistema público de saúde.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Envelhecimento: novo cenário mundial e brasileiro

O envelhecimento populacional, mudança demográfica mais notável do século XXI, tem sido amplamente reconhecido como um fenômeno mundial, com um campo de discussões relevantes.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), do ponto de vista cronológico, idoso seria o indivíduo com idade igual ou superior a 65 anos, residente em países desenvolvidos e com 60 anos ou mais, para países em desenvolvimento. Essa classificação considera fatores econômicos, sociais, políticos, culturais, ambientais e qualidade de vida, os quais determinam os padrões etários citados acima (CAMARANO; KANSO; LEITÃO E MELLO, 2004).

A população de idosos já ultrapassa 900 milhões de indivíduos, o que corresponde a 12,3% da população mundial, sendo estimados valores próximos aos 22,0% em 2050 (OMS, 2015). Isso se deve à redução nas taxas de mortalidade e natalidade, devido a melhorias no saneamento básico, condições socioeconômicas, estilo de vida, bem como aos avanços da pesquisa em saúde, mais evidentes nos países em desenvolvimento (KINSELLA; HE, 2009).

No Brasil, é possível observar a substituição, na pirâmide populacional, da base alargada por um cume que se amplia de forma rápida e considerável, indicando, proporcionalmente, mais idosos e menos crianças e jovens na população (Figura 1) (IBGE, 2008).

Esse contingente populacional perfaz 12,6% da população atual, com projeções de 16,2% até 2025. A expectativa de vida ao nascer do brasileiro passou de 69,8 para 73,8 anos, entre os anos de 2000 e 2010. Além disso, em 2050, nosso país estará na sexta posição mundial em número de idosos, alcançando mais de 13 milhões desses com idade acima de 80 anos (IBGE, 2008; IBGE, 2013a).

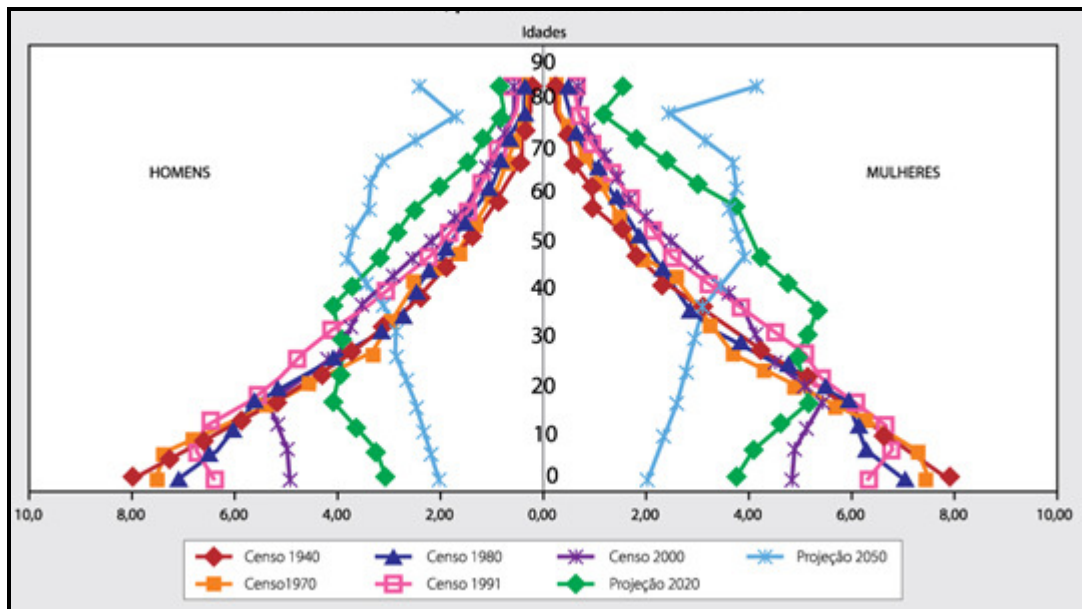


Figura 1. Estrutura etária relativa, por idade e sexo, em milhões de pessoas, no Brasil – 1940 a 2050. (Adaptado de IBGE, 2008).

No período de 2012 a 2022, espera-se uma taxa de crescimento maior do que 4,0 %, o que repercute em mais de 1,0 milhão de idosos anualmente (IBGE, 2015). A relação entre o número de idosos para cada grupo de 100 crianças, de 0 a 14 anos, também está sofrendo mudanças: em 2010, havia 26,7 idosos para cada 100 crianças, mas espera-se, em 2050, uma relação 6,5 vezes maior (172,7), com concentração expressiva nas regiões Sul e Sudeste (IBGE, 2008).

No Espírito Santo, de forma semelhante, os idosos representam 12,7% da população, com projeções de aumento da esperança de vida de 70,4 para 81,2 anos entre 2000 e 2030 (IBGE, 2013b).

De acordo com Camarano, Kanso, Leitão e Mello (2004), torna-se relevante também destacar que dentre os idosos, o número daqueles denominados “muito idosos” também vem crescendo. Este aumento na proporção dos muito idosos é decorrente da redução na taxa de mortalidade nas idades mais avançadas.

Além disso, evidências científicas apontam que não se pode admitir o grupo de indivíduos com 60 anos ou mais como uniforme, em função das diferenças metabólicas, fisiológicas e

socioeconômicas, observadas entre os idosos com mais de 85 anos e aqueles mais jovens (BALTES; SMITH, 2006; JACOB FILHO, 2006; JOHNSON, 2005).

Nesse sentido, a OMS sugeriu uma subdivisão para esse grupo, sendo idosos jovens (*young-old*), com idade entre 60 e 69 anos; idosos velhos (*old-old*), de 70 a 84 anos e idoso mais velho (*oldest-old*), com 85 anos ou mais (De ONIS; HABICHT, 1996; OMS, 2004).

No Brasil, estudos sobre envelhecimento foram impulsionados a partir de 1980, acerca do início das consideráveis transformações etárias, descritas acima (LIMA; MENEZES, 2011). No entanto, a produção do conhecimento é ainda incipiente, sendo que a maior parte das pesquisas concentra-se em descrever casos clínicos ou relatos de caso das múltiplas doenças que acometem esse grupo, como as doenças crônico-degenerativas e síndromes geriátricas, além de procedimentos terapêuticos ou cirúrgicos.

Paralelamente, inseridas nesse universo temático, pesquisas pioneiras foram ou vem sendo desenvolvidas, de cunho epidemiológico, mas que buscam elucidar possíveis mecanismos celulares e moleculares, concentradas nas regiões Sul e Sudeste.

No Sul do Brasil, programas como Genesis (*Gene Invironmental Systems Interactions on Successful Aging*) e Veranópolis (Estudos em Envelhecimento, Longevidade e Qualidade de Vida) contribuíram para o desenvolvimento de pesquisas sobre interações genético-ambientais no envelhecimento saudável, de idosos com 80 anos ou mais. Essas investigações ocorrem nas cidades de Gravataí e Veranópolis, Rio Grande do Sul, que possuem expectativa média de vida superior ao restante do país (CRUZ et al., 2005; DA CRUZ et al., 2004). Na região Sudeste, o projeto BAMBUÍ-MG, de base populacional, se propôs a identificar fatores preditores de eventos adversos à saúde em idosos. Ainda, nessa região, o projeto SABE (Saúde, Bem Estar e Envelhecimento), coordenado pela Organização Pan-Americana de Saúde, apresentou como objetivo, em sua primeira fase, coletar informações sobre as condições de saúde dos idosos com mais de 60 anos em áreas urbanas de metrópoles da América Latina, dentre elas, São Paulo (GIACOMIN et al., 2005; LEBRAO; LAURENTI; 2005).

O envelhecimento, não obstante ser uma das grandes conquistas da humanidade, também se apresenta como desafiador para a sociedade e comunidade acadêmica, de diferentes países, principalmente, para aqueles em desenvolvimento. No Brasil, ao contrário dos países desenvolvidos, a população idosa, de fenótipo frágil com número relevante de doenças, vem aumentando num contexto de desigualdades sociais, instabilidades econômica e dos serviços de saúde (PALLONI et al., 2002).

Dessa forma, é incontestável a necessidade de reorganização das estruturas socioeconômicas, acadêmico-científicas e das políticas de saúde para atender às demandas específicas desse grupo, com o estabelecimento de intervenções preventivas, terapêuticas e diagnósticas, mais efetivas na geriatria, que melhorem a qualidade de vida e proporcionem um envelhecimento saudável, com impactos relevantes em termos de saúde pública.

2.2 Envelhecimento Humano e Teorias Postuladas

O envelhecimento ou senescência está associado com dois processos, a degeneração celular progressiva e a perda da capacidade regenerativa, sendo definido como um declínio progressivo, funcional e orgânico, influenciado por eventos moleculares, celulares e sistêmicos, com alterações na homeostasia e, por conseguinte, aumento da suscetibilidade a doenças e morte (SCHUMACHER; GARINIS; HOEIJMAKERS, 2008).

Os mecanismos envolvidos no processo de envelhecimento ainda não foram totalmente elucidados, mas se sabe que o mesmo é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas como hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, dislipidemias, câncer, doenças reumatológicas e neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (WHEELER; KIM, 2011). Em função do considerável aumento dessas doenças com o decorrer do tempo de vida, compreender os processos biológicos relacionados à fisiopatologia desse evento é de suma importância.

Desde tempos remotos, já se discutia quais seriam os limites entre o processo natural do envelhecimento e o surgimento de doenças ou senilidade. No século VII a.C., o médico grego Pitágoras já dividia o tempo de vida do ser humano em ciclos, sendo os últimos, entre 63 e 81 anos, a fase *senium*, marcados por declínio e incapacidade do organismo (HALPERT, 1983).

No entanto, a somente três décadas, com o isolamento das primeiras cepas de “vida longa” do nematódeo de vida livre *Caenorhabditis elegans* por Klass (1983) e o início de possíveis analogias com o ciclo de vida do ser humano, os estudos sobre envelhecimento avançaram sem precedentes.

Um número considerável de teorias vem sendo postulado para explicar o envelhecimento, sendo as mais amplamente aceitas: **a)** as Estocásticas (TE) - que descrevem que o desgaste decorrente do tempo de vida é consequência de danos moleculares, aleatórios, que alteram a função e estrutura de células, tecidos e órgãos. O acúmulo dessas alterações alcançaria um nível em que algumas ou todas células estariam deficientes, metabolicamente, a ponto de causarem a morte e **b)** as Programadas (TP), baseadas na existência de um “roteiro” para eventos sequenciais e coordenados. Diferentes padrões de controle do metabolismo, dano mitocondrial, interação genes-vias de sinalização celular para apoptose, encurtamento dos telômeros e eventos epigenéticos constiuiriam também uma base para as modificações no decorrer da vida (ARKING et al., 2000; MERCADO-SÁENZ et al., 2010).

Paredes Salido e Roca Fernández (2002) ressaltaram, que além do genoma, a produção e liberação de energia, com formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e fatores ambientais como nutrição e exercício físico têm sido elementos essenciais e determinantes do processo.

Partindo desses princípios, e de que o tempo de vida ou *lifespan* é controlado, pelo menos, numa extensão expressiva, por vias genéticas e processos bioquímicos conservados evolutivamente, hipóteses foram postuladas e biomarcadores importantes vem sendo definidos.

Segundo a hipótese Genética (TP), a intensidade do envelhecimento biológico possivelmente é regulada por genes que auxiliam na manutenção da homeostasia e da função corporal por um

tempo maior do que a média da expectativa de vida e por aqueles que afetam diversas vias metabólicas, as quais podem ocasionar disfunções orgânicas ou o aumento da morbimortalidade entre idosos (JOHNSON, 2005). Os fatores genéticos, nessa perspectiva, são estudados por meio da identificação de variantes polimórficas denominadas SNPs (*single nucleotide polymorphism*) numa população, em que a variação de apenas um nucleotídeo no DNA pode impactar na expressão ou regulação gênica, interferindo no tempo de vida da espécie humana (FALLIN; MATTEINI, 2009).

A contribuição genética para o envelhecimento e tempo de vida foi demonstrada usando registros extensos de gêmeos e de estudos de base populacional. A herdabilidade para gêmeos foi estimada em 20,0 a 30,0% (HERSKIND et al., 1996; McGUE et al., 1993), enquanto para populações, de 15,0 a 25,0% (MITCHELL et al., 2001; KERBER et al., 2001). Estudos também descrevem a relação entre fatores genéticos e estilo de vida: a presença de riscos moderados para doenças cardiovasculares na meia-idade e no período entre 60 e 69 anos contribuiu para a sobrevivência de indivíduos saudáveis e mais fragilizados até 85 anos ou mais, respectivamente (DUTTA et al., 2011; TERRY et al., 2005).

Cruz (2014) propôs a existência de genótipos de “sobrevivência” em resposta a condições ambientais como padrão dietético, tabagismo e exercício físico, agrupados numa série de genes com seus subprodutos, no período pós-reprodutivo, que forneceriam plasticidade a um dado cronograma de vida do ser humano, evitando sua extinção. Isso pode explicar as diferenças fenotípicas inter e intraindividuais entre populações semelhantes (KAZIMIROVA et al., 2004).

Em organismos inferiores, a utilização do modelo de *C. elegans* rompeu os desafios para instaurar as primeiras suposições a respeito da influência genética no tempo de vida. Marx (2002) descreveu as descobertas de cientistas sobre a regulação genética do desenvolvimento de órgãos e morte celular programada nesse organismo-modelo e a existência de genes correspondentes no ser humano.

Evidências científicas também mostraram possíveis mecanismos envolvidos no tempo de vida mais curto, por meio da utilização de modelos murinos e humanos, das síndromes progeróides.

Essas doenças monogênicas apresentam como característica fenotípica o envelhecimento precoce e rápido, sendo as Síndromes de *Hutchinson-Gilford* e *Werner* exemplos clássicos. A instabilidade genômica, dada por danos ao DNA, seguido de erros no seu reparo, explicaria o envelhecimento prematuro (BURTNER; KENNEDY, 2010).

De Magalhães e Church (2007) descreveram que genes associados ao envelhecimento são conservados em nível molecular e há múltiplas interações com outros: genes ortólogos, associados ao ciclo da vida, são encontrados em organismos-modelo e formam uma rede de conexões e atividade contínuas, sendo que quase a maioria das proteínas, por conseguinte, expressas, estão implicadas com doenças relacionadas à idade (DRI), o que poderia explicar a relação entre o surgimento de enfermidades durante esse decurso.

Já a hipótese do Estresse Oxidativo, relacionada com a teoria Estocástica, estabelece que o processo degenerativo, relacionado à idade, é consequência de danos provocados por espécies reativas de oxigênio, advindas, principalmente, do metabolismo aeróbico (SIMM; KLOTZ, 2015). A formação de espécies reativas, principalmente de oxigênio, como radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, se dá pela ação catalítica de enzimas durante o transporte de elétrons na cadeia respiratória e/ou por exposição a diferentes fatores ambientais (GOLUBEV, 1996). Essas moléculas são eletronicamente instáveis e, portanto, extremamente reativas, com habilidade para se combinar a macromoléculas como lipídeos, proteínas e DNA, ocasionando danos celulares e moleculares. Esse processo é um tipo de pressão que induz a uma resposta do organismo, principalmente de agentes antioxidantes. No entanto, durante o envelhecimento, há um aumento exponencial que supera a capacidade antioxidante endógena, numa variedade de tecidos e em diferentes espécies, inclusive em humanos (HARMAN, 1956).

O excesso de espécies reativas de oxigênio acarreta a oxidação celular, a qual é considerada o estágio inicial de doenças que acompanham a senilidade. As EROs alteram as características moleculares de membranas, promovem mutações genéticas, alteram a homeostasia e contribuem para a formação de compostos secundários como aldeídos de cadeia curta, biomarcadores desse processo (HARMAN, 1991; MATÉS et al., 1999).

Apesar das pesquisas sobre envelhecimento avançarem, gerando conhecimento considerável com relação às suas causas e desfechos, ainda estão sujeitas a inúmeros debates e hipóteses conflitantes. Até o momento, mesmo com os ganhos no tempo de vida, observados nos últimas décadas, o leque de doenças que acomete os idosos não se modificou. Ainda sim, muitos podem alcançar idades extremas, a longevidade, com a presença dessas disfunções ou, por outro lado, sem sua presença, menos frágeis e com funções cognitivas e físicas satisfatórias (CHRISTENSEN; JOHNSON; VAUPEL, 2006).

Newman e Murabito (2013) definiram o envelhecimento saudável como a sobrevivência a faixas etárias específicas, maior ou igual a 85 anos. No entanto, retardar o processo de envelhecimento é tarefa fatigante porque envolve o acúmulo e integração de inúmeras informações do ponto de vista biológico, fisiológico e psicossocial.

Investigações científicas que se propõem a buscar novas concepções de atenção à saúde da população idosa, sobretudo aos longevos, que busquem integrar as diferentes informações acerca do processo de envelhecimento são de suma importância para amenizar a incapacidade e fragilidades física e orgânica que acompanham a maioria desses indivíduos.

2.3 Longevidade Humana: conceito, fenótipos e fatores determinantes

O aumento dramático da população idosa, sobretudo dos idosos “mais idosos” tem despertado o interesse dos estudiosos sobre o envelhecimento e avanço das pesquisas na biogerontologia. Torna-se cada vez mais importante não apenas estudar a multimorbidade, mas também os fenótipos e possíveis mecanismos biológicos do envelhecimento saudável (DAVINELLI; WILCOXX; SCAPAGNINI, 2012).

A longevidade é um fenômeno complexo e resulta da interação de inúmeros fatores genéticos, ambientais e comportamentais. Nos estudos de Genética do envelhecimento humano, o termo “longevidade” se remete à sobrevivência que supere o tempo máximo de vida estimado numa população. Do ponto de vista cronológico, seria alcançar 85 anos ou mais de idade, sendo essa

faixa etária daqueles chamados de muito idosos ou *oldest-old*. Considerando aspectos fisiopatológicos, fenótipos da longevidade são caracterizados pela combinação da idade mais avançada, ausência de múltiplas doenças e capacidades física e cognitiva aceitáveis, as quais implicam na necessidade do acréscimo de mais uma denominação: “envelhecimento saudável” ou “longevidade saudável” (BROOKS-WILSON, 2013).

Segundo Mercado-Sáenz et al. (2010), o tempo de vida e o tempo de vida saudável estão intimamente relacionados. No entanto, o ser humano tem tido sucesso quanto ao seu tempo de vida (*lifespan*), mas avançado pouco com relação ao seu tempo de vida saudável (*healthspan*). Observa-se, nas últimas duas décadas, maior probabilidade de se chegar à longevidade, mas com fenótipos negativos quanto à saúde e bem-estar ou uma fase da senescência, relativamente, curta, mas livre de doenças crônico-degenerativas e performance físico-funcional desejável, a qual relaciona-se ao “envelhecimento saudável”.

Na tentativa de buscar compreender esses diferentes fenótipos, a geriatria genômica vem investigando possíveis genes e vias metabólicas, associados ao envelhecimento e candidatos à longevidade. Os primeiros achados, de estudos amplos familiar ou de base populacional, mostraram que a herança genética é um fator que contribui para definir o tempo de vida.

Estudos com gêmeos, mono e dizigóticos mostraram que, aproximadamente, 25% da variação na sobrevivência são determinados por características genéticas (HERSKIND et al., 1996; HJELMBORG et al., 2006). A influência genética também foi significativa quando avaliada entre irmãos de longevos, pelo fato desses apresentarem cerca de quatro vezes mais chance de se tornar octa ou nonagenários do que irmãos de idosos que tiveram senescência breve (*young-old*) (CHRISTENSEN; JOHNSON; VAUPEL, 2006; PERLS et al., 1998). Os efeitos genéticos sobre o tempo de vida de indivíduos gêmeos foram mínimos até os sessenta anos de idade, mas tornaram-se significativos e estáveis com o decorrer da idade, sendo acentuados a partir dos 85 anos (HJELMBORG et al., 2006).

Da mesma forma, em estudos de base populacional, características peculiares foram observadas: à medida que a idade aumentava, a taxa de risco de desenvolvimento para doenças como câncer,

diabetes, doenças cardiovasculares, respiratórias e neurodegenerativas foi substancialmente menor, além da maior participação genética em idades mais extremas (BROOKS-WILSON, 2013; FORTNEY et al., 2015; MITCHELL et al., 2001).

A contribuição genética para o envelhecimento e longevidade humanos, possivelmente, se dá pela interação de vários genes, cada qual com seus efeitos particulares, conectados e pleiotrópicos. Há *genes de predisposição à longevidade*, variantes genéticas ou da regulação de genes, que auxiliam na manutenção da homeostasia e da função corporal por um tempo maior do que a média esperada, superando a expectativa de vida, enquanto que outro grupo, *genes da fragilidade*, aumentaria a suscetibilidade a doenças relacionadas ao envelhecimento, com morbimortalidade precoce, por afetarem vias metabólicas, culminando em disfunções orgânicas potenciais (MURABITO; YUAN; LUNETTA, 2012).

Estudos genéticos de associação têm alcançado importantes resultados na identificação de variações de um único nucleotídeo (SNPs) na seqüência de DNA, relacionadas aos fenótipos característicos do processo de envelhecimento e mostram potenciais descobertas para novos caminhos metabólicos e de sinalização (BROOKS-WILSON, 2013; FIGARSKA; VONK; BOESEN, 2013; JACOBSEN et al., 2010; SEBASTIANI et al., 2013; WILLCOX et al., 2008).

Considerando a longevidade como uma característica poligênica e suas variantes polimórficas, Barzilai e Gabrielly (2010) propuseram possíveis mudanças no perfil genotípico no decorrer da vida de indivíduos idosos, dos 60 aos 100 anos, admitindo-se como sendo esse o máximo intervalo de tempo de vida entre as populações (Figura 2). SNPs que declinam à medida que a idade aumenta relacionam-se a *genes da fragilidade* e com o aumento da proporção de morbimortalidade, ao passo que um padrão diferente e mais relevante seria observado quando SNPs aumentam com o aumento da idade, sendo esses referentes aos *genes de predisposição à longevidade*, protetores das doenças do envelhecimento. Os resultados de Sebastiani e Perls (2012) corroboram com o descrito, pois os mesmos sugeriram que em mulheres e homens centenários a contribuição genética chegaria a 33% e 48%, respectivamente. Todavia, há perfis genotípicos que não alteram sua frequência com o decorrer da vida e que não estão relacionados com a longevidade.

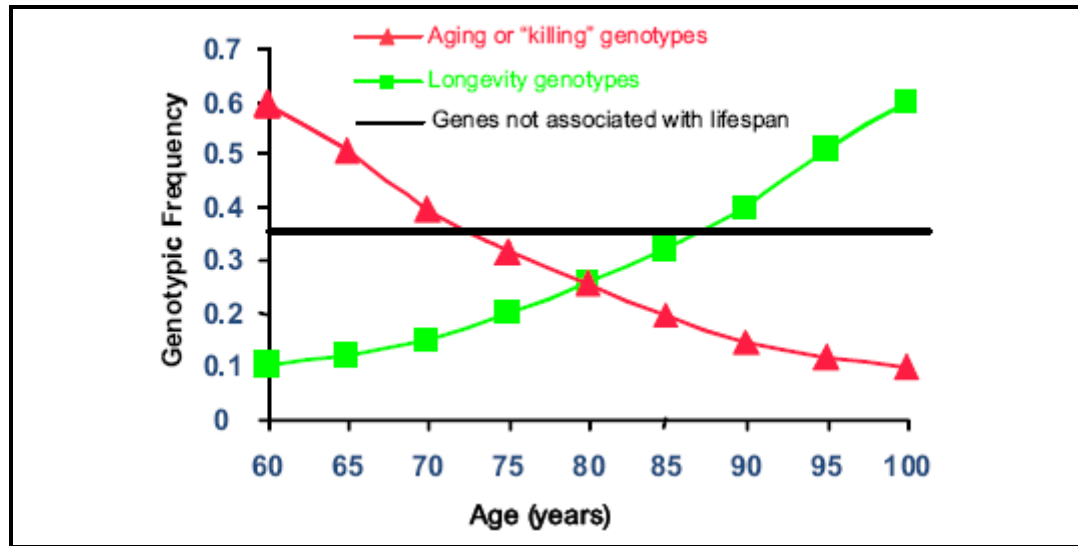


Figura 2. Mudanças nas frequências genotípicas em função da idade. Sabendo-se que o eixo “x” refere-se ao tempo de vida em anos e o eixo “y” à frequência genotípica, apesar de alcançarmos o patamar do tempo de vida, há uma seleção significativa. Linhas verdes representam os genes de predisposição à longevidade – genótipos que contribuem para a longevidade e proteção contra doenças que acompanham o envelhecimento. Linhas vermelhas representam os genes da fragilidade - genótipos associados ao aumento da prevalência de doenças e mortalidade. Linhas pretas indicam genes com SNPs que não alteram sua frequência com a idade (BARZILAI; GABRIELLY, 2010).

Esses achados foram impulsionados a partir da descoberta de variantes genéticas, conservadas evolutivamente, relacionadas à longevidade em invertebrados, os quais possuem vida curta e habilidade no controle de fatores genéticos e ambientais. Variações no gene chamado *age-1*, um gerontogene, encontrado no nematódeo *C. elegans*, seriam responsáveis por aumentar em duas a cinco vezes a extensão no tempo de vida e em até oito vezes, quando combinada à restrição calórica (HOUTHOOFD et al., 2004; JOHNSON, 2005).

Outros modelos animais têm contribuído também para a biogerontologia como aqueles desenvolvidos com *Drosophila melanogaster*, que identificaram o gene *Tor*, que codifica para uma proteína modulada pela disponibilidade de aminoácidos e, por conseguinte, pela dieta. Ademais, é importante mencionar que estudos em animais revelaram que os genes da longevidade são idade-específicos: variantes nos genes *age-1*, *spe-10* e *clk-1* parecem estar envolvidas na redução da mortalidade de *C. elegans* somente em fases tardias da vida ou de baixa reprodutividade (JOHNSON et al., 2001; KAPAHI; ZID, 2004).

Camundongos *knockout* para receptores do hormônio do crescimento (GH) e para a via de sinalização de insulina IIS (*insulin/Igf1-like signaling*) podem aumentar substancialmente seu tempo de vida. Essa ablação gênica aumenta a expressão de enzimas antioxidantes e a resistência ao estresse de miócitos e fibroblastos, ativa fatores de transcrição chamados de FOXO, além de reduzir o surgimento de doenças do envelhecimento (BARTKE, 2005).

O sucesso no desenvolvimento dessas pesquisas tem facilitado, de forma expressiva, os esforços na identificação de variações genéticas em vias correspondentes em humanos.

Além do componente genético, sabe-se que a heterogeneidade de fenótipos da longevidade deve-se a fatores ambientais e comportamentais. Evidências científicas mostram que educação, renda, etnia, prática de exercício físico, tabagismo, etilismo e convívio social são informações que têm sido relacionadas ao envelhecimento saudável (HAVEMAN-NIES, de GROOT, STRAVEREN, 2003; SWINDELL et al., 2010; WILLCOX, HE, CHEN; 2006).

Colman et al. (2014) e Barzilai e Bartke (2009) demonstraram associação da restrição calórica (RC), uma redução em 25 a 50% da ingestão calórica, sem desnutrição e mantendo nutrientes indispensáveis ao bom funcionamento do organismo, com aumento do tempo de vida e declínio das enfermidades inerentes ao processo de envelhecimento. Sabe-se que, em mamíferos, a proteína Sirtuína 1 (SIRT1) está envolvida com a resposta metabólica em condições de RC e variantes polimórficas do seu gene (*SIRT1*) com a longevidade. Ainda, de acordo com Akbaraly et al. (2013), Hodge et al. (2014) e Assmann et al. (2015) a ingestão de frutas e de carnes ricas em lipídeos correlaciona-se de formas positiva e negativa, respectivamente, com o envelhecimento saudável.

Investigações clínicas atestam que mudanças no estilo de vida, como a restrição calórica, podem retardar o envelhecimento intrínseco e induzir a desfechos favoráveis quanto a variáveis como Índice de massa corporal, perfil de lipídeos, glicemia e marcadores de sensibilidade à insulina (FONTANA; KLEIN, 2007).

O conhecimento desses possíveis fatores preditores de sobrevivência e saúde é muito importante para as pesquisas contemporâneas sobre a longevidade, pois esses são passíveis de modificação,

proporcionando aos indivíduos “muito idosos” mais qualidade de vida e menor incidência de doenças crônico-degenerativas. Elucidar como os fatores genéticos e sua interação com componentes ambientais contribuem para os fenótipos da longevidade e envelhecimento é um dos campos explorados pela geriatria genômica e que tem despertado interesse dos pesquisadores (MURABITO; YUAN; LUNETTA, 2012). É possível que o estilo de vida saudável conduza ao envelhecimento bem sucedido e/ou os *genes de predisposição à longevidade* protejam idosos dos efeitos prejudiciais advindos de hábitos inadequados (SWAPNIL et al., 2011).

Da mesma forma, o gênero tem influenciado no período de sobrevida. Geralmente, mulheres possuem um tempo médio de vida maior do que homens, sendo as responsáveis pela maior parcela dos “mais idosos” no mundo. Algumas hipóteses para essa diferença são características hormonais, o fator compensatório do cromossomo X em mulheres, a ocorrência maior de doenças como as cardiovasculares e acidentes em homens (NEWMAN; MURABITO, 2013). Por outro lado, os efeitos do sexo sobre a longevidade podem ser modificados por fatores ambientais, bem como pelos genéticos (BROOKS-WILSON, 2013; CATALANO, BRUCKNER, SMITH, 2008). Poulain, Peres e Salaris (2011) mostraram que numa população de longevos da ilha de Sardenha fatores como alimentação, exercício físico, convívio familiar e social, além das características genéticas/biológicas, contribuíram para uma taxa de mortalidade menor entre os homens, contrapondo o esperado.

A variabilidade fenotípica observada entre indivíduos idosos e a longevidade pode ser determinada também pelas características epigenéticas, as quais têm sido investigadas, mais recentemente, em modelos experimentais, cultura de células de mamíferos e estudos com humanos (DEELEN et al., 2014; MCCAULEY; DANG, 2014). Mudanças epigenéticas envolvem alterações químicas nas moléculas de DNA ou histonas, bem como a produção de uma classe especial de ácido ribonucléico (RNA), de curto tamanho e não codificante, os microRNAs. Esses mecanismos, pós-transcricionais, são biologicamente importantes porque apresentam papel na regulação da expressão gênica e são considerados candidatos relevantes na elucidação dos efeitos de fatores ambientais sobre o envelhecimento (SIMMONS, 2008).

No Brasil, há poucos estudos sobre geriatria genômica e longevidade. A maioria dos trabalhos tem se concentrado em estudar condições sócio-demográficas, características

clínicas/bioquímicas/antropométricas, que acompanham as DRI, capacidade funcional e perfil dos cuidadores (VALADARES; VIANNA; MORAES, 2013; LIMA; MENEZES, 2011). Pesquisas sobre variantes polimórficas de genes de predisposição à longevidade foram ou estão sendo desenvolvidas, principalmente, em estados das regiões Sul e Sudeste (Tabela 1). Esses dados mostram a necessidade cadente de investigações na área da biogerontologia, que tratam dos possíveis fatores genéticos e ambientais envolvidos no aumento do tempo de vida da nossa população.

Tabela 1. Estudos desenvolvidos no Brasil sobre Longevidade Humana e Variantes genéticas.

<i>Estudo</i>	<i>Estado</i>	<i>n</i>	<i>Gene (SNP)</i>	<i>Referências</i>
GENESIS	RS	489	<i>SOD2</i> (rs4880)	Taufer et al. (2005) do Valle Gottlieb et al. (2011)
VERANOPOLIS	RS	64	<i>APOE</i> (rs429358/rs7412)	Schwanke et al. (2002)
		252	<i>SOD2</i> (rs4880)	Da Cruz et al. (2004)
BAMBUI	MG	1406	<i>APOE</i> (rs429358/rs7412)	Lima e Costa et al. (2000) Fuzikawa et al. (2008)
SABE	SP	604	<i>APOE</i> (Exoma/NGS)	Lebrão e Laurenti (2005) Naslavsky (2015)- comunicação pessoal

n = número amostral; *SNP* = *single nucleotide polymorphism*; *NGS* = *Next Generation Sequencing*.

Muitas vias metabólicas, como as de respostas ao hormônio insulina, ao estresse oxidativo, metabolismo de lipídeos e restrição calórica/gasto energético, parecem ser cruciais para se alcançar a longevidade (CHRISTENSEN; JOHNSON; VAUPEL, 2006). Sabe-se que há genes e variantes polimórficas relacionados com essas vias de sinalização, os quais têm sido considerados candidatos naturais e de impacto notável sobre o tempo de vida, o que corrobora com a hipótese de que há genes de predisposição à longevidade e da fragilidade.

A elucidação da base genética, bem como de danos oxidativos e genômicos no envelhecimento e seu papel nas alterações fisiológicas, bioquímicas e patológicas com o decorrer da vida permanece intrigante e complexa, oferecendo à gerontologia amplo espectro de pesquisas com vistas a obter possíveis preditores que adicionem qualidade de vida a esses anos acrescentados à humanidade.

2.4 Biomarcadores da Longevidade Humana

Considerando o cenário de envelhecimento populacional e aumento da expectativa de vida, aliado à motivação humana de preservar a vida ao máximo e com qualidade, bem como os custos substanciais dos Sistemas de Saúde com as doenças crônico-degenerativas e múltiplos fatores envolvidos nesse processo, é de suma importância o estudo dos possíveis preditores ou marcadores que interferem na longevidade.

Biomarcadores são definidos como características que podem ser medidas e avaliadas, sendo indicadores de processos biológicos normais ou patogênicos, ou ainda de resposta farmacológica à intervenção terapêutica (DE ZWART et al., 1999; LABAER, 2005).

Para o estudo do envelhecimento e da longevidade, são propostos diversos biomarcadores como genes e regiões genômicas identificados, em estudos *GWAS* (*Genome-Wide Association Studies*) (BROER et al., 2015; FORTNEY et al., 2015), bem como parâmetros clínicos, bioquímicos, antropométricos e fatores ambientais (DUTTA et al., 2011).

Além disso, os estudos têm mostrado que à medida que se envelhece, ocorre disfunção celular e senescência do nosso organismo, dados em parte, pelo aumento exacerbado da produção de espécies reativas de oxigênio, que podem reagir com macromoléculas e, ainda, culminar na produção de compostos secundários citotóxicos ou genotóxicos, como aldeídos de cadeia curta (BECKMAN; AMES, 1998; DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). Esses compostos carbonílicos, diferente das EROs, são relativamente estáveis e se difundem para o meio extracelular, atingindo alvos distantes do seu sítio de origem, propagando o dano oxidativo.

Considerando esses fatores e eventos como determinantes críticos do tempo de vida, estimá-los em populações ainda não estudadas pode aprimorar o conhecimento científico e auxiliar no desenvolvimento de estratégias relacionadas à biogerontologia, que busquem melhorar a qualidade de vida, para que se atinja a longevidade. Ações preventivas ou de diagnóstico, mais efetivas se concretizariam, de acordo com o perfil de cada indivíduo idoso, o que acarreta impactos relevantes em termos de saúde pública.

2.5 Genes associados à Longevidade Humana

Conforme descrito anteriormente, o componente genético contribui em, aproximadamente, 25% para o tempo de vida e genes de predisposição à longevidade vem sendo identificados em estudos com modelos animais e humanos. Genes como *FOXO3*, *SOD2*, *APOE* e *SIRT1* têm sido descritos como moduladores da longevidade e estão envolvidos em vias do metabolismo de lipídeos e carboidratos, com a resposta ao estresse oxidativo e com a suscetibilidade ao desenvolvimento de DRIs (BARZILAI et al., 2012; DATO et al., 2013).

2.5.1 FOXO3

O gene *FOXO3* (*Forkhead box O3*), localizado no cromossomo 6q21, codifica o fator de transcrição multifuncional *forkhead box O3*, que pertence à família das proteínas FOXO, FOXO1, FOXO4, FOXO6, conservadas evolutivamente, de *Caenorhabditis elegans* a mamíferos (LEE et al., 2003). FOXO3 está envolvida em processos como proliferação celular, apoptose,

resposta ao estresse oxidativo, regulação do ciclo celular, metabolismo e longevidade (TZIVION; DOBSON; RAMAKRISHNAN, 2011). Esse fator de transcrição é expresso em tecidos de resposta ao hormônio insulina, adipócitos, músculo esquelético, fígado, pâncreas e tem sido considerado um mediador chave na via de sinalização da insulina *IIS* (*Insulin/Igf1-like signaling*) (LAM; FRANCIS; PETKOVIC, 2006).

Apesar de mecanismos precisos ainda não terem sido elucidados, estudos *in vitro* demonstraram que a via *IIS* pode afetar o tempo de vida por diversos mecanismos. Quando ocorre a inibição da via *IIS*, pelo fator FOXO3, a transcrição de genes de proteínas de choque térmico, envolvidas com a resposta ao estresse, é ativada (MURPHY et al., 2003). FOXO3 pode atuar também na parada do ciclo celular e estimular mecanismos de reparo do DNA, o que reduz a morte celular e o risco de malignidade, limitando o processo de envelhecimento (TRAN et al., 2002). Há evidências também de que os fatores FOXO estão envolvidos com a expressão de enzimas antioxidantes. FOXO3 parece agir como fator de transcrição de múltiplas vias de resistência ao estresse, em resposta à diminuição da sinalização da via *IIS*.

Di Bona et al. (2014) definiram a via *Insulin/Igf1-like* como uma cascata de fosforilações que regulam a translocação nuclear e a ativação de proteínas FOXO, dentre elas, FOXO3. Em resposta a fatores exógenos (dieta) ou ao hormônio do crescimento, ocorre secreção de insulina pelo pâncreas e produção do fator de crescimento 1 da via *IIS* (IGF-1) pelo fígado. A ligação do IGF-1 a receptores específicos inibe a proteína FOXO3, o que impede a expressão de muitos genes homeostáticos, como aqueles dos sistemas antioxidante e imune, envolvidos com a longevidade (Figura 3). No entanto, a expressão do gene *FOXO3* pode ser ativada por proteínas chamadas de sirtuínas, desacetilases dependentes de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo), consideradas moléculas anti-envelhecimento. Variantes polimórficas específicas também podem estar envolvidas com a modulação dessa via como o SNP rs2802292 G/T, localizado na região intrônica do gene.

Em camundongos *knockout* para FOXO3, foram observadas resistência insulínica, anormalidades hematológicas, processos inflamatórios e infertilidade (CASTRILLON et al., 2003; KERDILES et al., 2010).

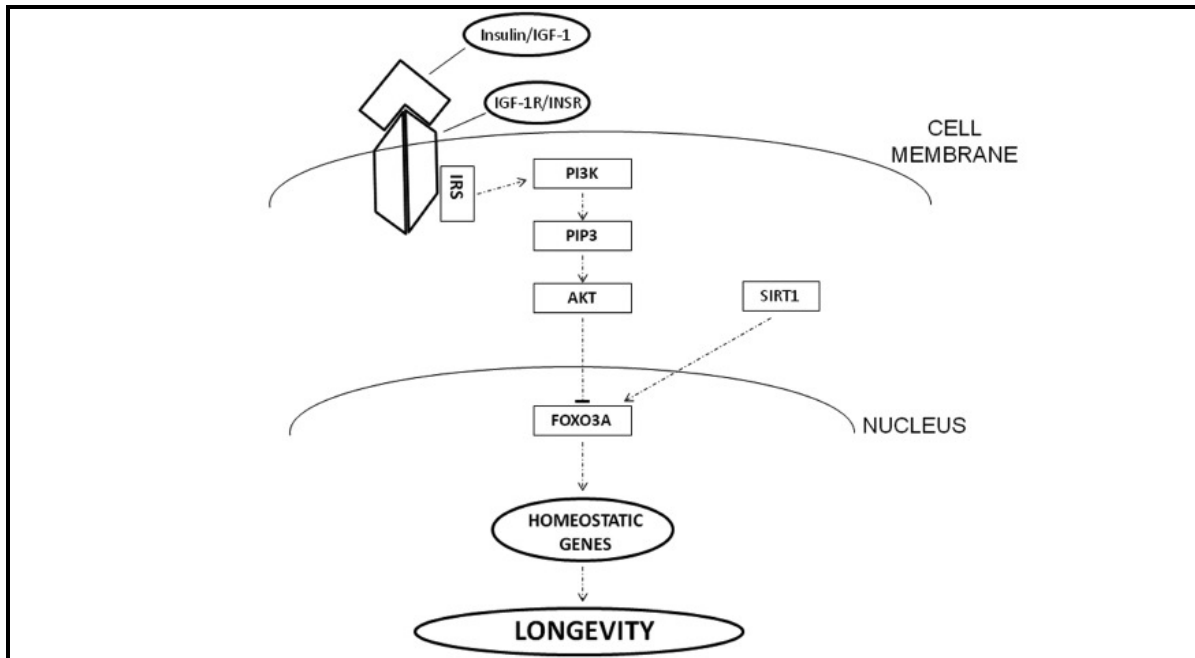


Figura 3. Via de sinalização *Insulin/Igf1-like* e suas implicações na longevidade. Essa via de sinalização apresenta um papel crítico na determinação da longevidade. A ligação do IGF-1 a receptores específicos, numa cascata de fosforilações, inibe a proteína FOXO3, o que impede a expressão de muitos genes homeostáticos, envolvidos com a longevidade. A proteína SIRT1 (Silent Information Regulation Type 1), por outro lado, ativa esse fator de transcrição. Variantes genéticas que reduzem essa sinalização têm sido identificadas: alguns estudos têm mostrado essa associação com um tempo de vida mais longo (DI BONA et al., 2014).

Willcox et al. (2008) foram os primeiros pesquisadores a identificar que o gene *FOXO3* estava fortemente associado com a longevidade, numa população, do Havaí, de homens longevos de origem japonesa. A variação genética rs2802292 mostrou que esses longevos tinham uma ou mais cópias do alelo G e que controles apresentavam uma frequência maior do alelo T. Esses idosos, em relação aos controles, apresentavam também fenótipos relacionados ao envelhecimento saudável como menor prevalência de câncer e doença cardiovascular, melhor perfil lipídico, menores níveis glicêmicos e de insulina.

Estudos subsequentes, com número amostral variando de 600 a 1800 e faixa etária de 18 a 110 anos, confirmaram esses resultados: Anselmi et al. (2009) e Soerensen et al. (2010), em populações de caucasianos, também validaram essa associação, quando analisaram dados de

homens e mulheres, separadamente. Do mesmo modo, um estudo, desse último grupo de pesquisa, com uma população dinamarquesa, que considerou as características função cognitiva, capacidade funcional e saúde auto-reportada, mostrou associação positiva entre SNPs do *FOXO3*, inclusive, rs2802292, e longevidade (SOERENSEN et al., 2015).

2.5.2 *SOD2*

Superóxidos dismutases (SODs) são uma classe de enzimas que catalisam a conversão de ânions superóxidos (O_2^-), uma espécie reativa de oxigênio, em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual, posteriormente, é convertido em água (HALLIWELL, 1978). Essas EROs são geradas, principalmente, durante o transporte de elétrons, na fosforilação oxidativa. As SODs exercem um papel importante em vias biológicas de oxi-redução, sendo cruciais na defesa endógena antioxidante, do sistema de sinalização que protege as células e tecidos do estresse oxidativo, caracterizado por um aumento na produção de compostos reativos (NOZIK-GRAYCK; SULIMAN; PIANTADOSI, 2005).

Em mamíferos, há três isoformas de SOD identificadas, com distribuição celular diferente: SOD1 ou CuZn-SOD (citoplasmática - dependente de cobre e zinco), SOD2 ou Mn-SOD (mitocondrial e dependente de manganês) e SOD3 ou EC-SOD (extracelular) (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002). A superóxido dismutase 2 é responsável pela defesa antioxidante primária do nosso organismo e é codificada pelo gene *SOD2*, localizado no cromossomo 6q25.3. Seu papel no envelhecimento, doenças que o acompanham e na longevidade tem sido descrito, sendo o SNP rs4880 C/T o mais abrangentemente estudado (BUDOVSKY et al., 2013). Holley et al. (2012) e Kaminski et al. (2013) enfatizaram também que essa enzima é responsável por manter níveis moderados de superóxido e peróxido de hidrogênio no meio intracelular, que são positivos para a homeostase.

A variante polimórfica rs4880, com uma substituição do aminoácido valina por alanina, causa uma mudança conformacional na estrutura da proteína de β -pregueada para α -hélice, o que interfere na sua capacidade de neutralizar radicais O_2^- . SOD2 α -hélice (Citosina) estaria

relacionada com um aumento em 30 a 40% na sua atividade, enquanto que a conformação β -pregueada (Timina), com uma redução na sua eficiência enzimática (SHIMODA-MATSUBAYASHI et al., 1996). Por outro lado, Sutton et al. (2005) sugeriram que o desequilíbrio metabólico quanto à atividade de SOD2, dependente dessas variantes, estaria mais relacionado a alterações com o seu transporte no interior da mitocôndria. O genótipo CC confere à enzima a capacidade de atravessar as membranas mitocondriais, interna e externa, rapidamente, em direção à matriz, ao passo que TT ocasionaria uma fase estacionária de SOD2 entre as membranas.

A contribuição desse SNP na determinação dos processos de envelhecimento, doenças e longevidade corrobora com os resultados dos estudos funcionais acima citados. No entanto, os achados têm sido conflitantes. Soerensen et al. (2009) avaliaram a associação do SNP rs4880 com a longevidade numa população dinamarquesa, de 1650 indivíduos e observaram que aqueles portadores do alelo C apresentaram decréscimo na mortalidade. No Brasil, foi conduzido um estudo em Porto Alegre, RS, com 489 indivíduos (recém-nascidos, adultos e longevos). Não foi encontrada associação entre as variantes genéticas e longevidade. No entanto, o genótipo CC foi relacionado ao aumento do risco de câncer de próstata e de mama e de dano genômico em células de sangue periférico (TAUFER et al., 2005). Os estudos de Stessman et al. (2005) e Tian et al. (2011) mostraram um aumento na frequência de alelos T com a idade e com prevalência de *Diabetes mellitus*. Já no trabalho de Gentschew et al. (2013), nenhuma associação foi verificada para rs4880 e tempo de vida entre 1612 longevos (> 95 anos) e 1104 controles (60-75 anos) caucasianos.

A utilização de organismos inferiores e murinos também torna evidente a relação entre SOD2 e tempo de vida. A superexpressão do gene SOD2 em *Drosophila melanogaster* resultou no aumento proporcional do seu tempo de vida e da atividade enzimática (SUN et al., 2002). Num estudo em que apenas 50% de SOD2 foram expressos, observou-se dano oxidativo e função mitocondrial prejudicada (HINERFELD et al., 2004).

Outros fatores como ambientais podem estar envolvidos com esses diferentes fenótipos, já que esse SNP gerou resultados que são impactados por condições como dieta antioxidante e

realização de exercício físico. A ingestão de frutas e hortaliças, fonte de antioxidantes, reduziu os efeitos do risco de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres portadoras do genótipo CC (fator de risco), na fase pré-menopausa (AMBROSONE et al., 1999). Bresciani et al. (2013) mostraram que o estresse oxidativo, proveniente do exercício físico, é modulado pelo SNP rs4880. Avaliou-se a relação entre as variantes polimórficas e medidas de conteúdo protéico, atividade enzimática e expressão gênica de 65 indivíduos adultos do sexo masculino e foi observado que, uma hora após o exercício, para o genótipo CC, o conteúdo de Mn-SOD foi maior, bem como os níveis de expressão de *SOD2*.

2.5.3 APOE

A Apolipoproteína E (ApoE) é uma glicoproteína de 34KDa, que exerce papel relevante na homeostase lipídica no cérebro e tecidos periféricos (MAHLEY, 1988). Essa proteína participa do transporte e redistribuição do colesterol, sendo sintetizada predominantemente pelo fígado. O gene que a codifica, *APOE*, é polimórfico e está localizado no cromossomo 19q13.2. (DAS et al., 1985). A combinação de dois polimorfismos de nucleotídeo único, rs429358 e rs7412, no éxon 4, e suas respectivas diferenças nos resíduos dos aminoácidos 112 e 158, definem três isoformas para *APOE*: $\epsilon 2$, com resíduos de cisteínas em ambos os sítios (cis112, cis158); $\epsilon 3$, com cisteína e arginina (cis112, arg158) e $\epsilon 4$, com resíduos de arginina nas duas posições (arg112, arg158). A figura 4 mostra o descrito de forma esquemática. Considerando essas isoformas, seis possíveis diplótipos são observados, $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ e $\epsilon 4/\epsilon 4$ (ZHONG et al., 2016).

Essas variantes e, por conseguinte, as diferenças entre os aminoácidos cisteína e arginina alteram a estrutura da ApoE, e sua função: ApoE2 e ApoE3 ligam-se, preferencialmente, à lipoproteína de alta densidade (HDL-c), enquanto que ApoE4, adere às lipoproteínas de baixa (LDL-c) e muito baixa densidade (VLDL-c) (SAITO et al., 2003).

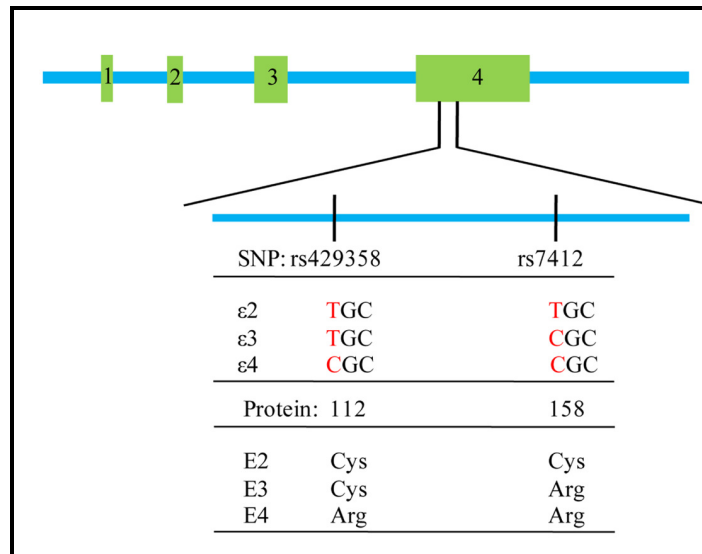


Figura 4. Representação esquemática da localização dos SNPs rs429358 e rs7412, no exon 4, do gene *APOE* e suas possíveis isoformas, de alelos e proteína, de acordo com as mudanças nos resíduos dos aminoácidos 112 e 158 (Adaptado de Zhong et al., 2016).

A presença do resíduo de cisteína na ApoE2, na posição 158, causa um rearranjo na ligação existente entre arg154-arg158, substituindo arg158 por arg 150, o que muda o potencial de ligação da proteína a receptores de lipoproteínas (MAHLEY; HUANG; RALL, 1999). Por outro lado, em ApoE4, a substituição de cisteína por arginina na posição 112 acarreta uma interação entre arginina e glutamina, nas posições 61 e 255, respectivamente, em meio aquoso, culminando em domínios de ligação a receptores na proteína ApoE inexistentes nas isoformas E2 e E3 (ZHONG; WEISGRABER, 2009). Por sua vez, essas alterações tornam a estrutura de E4 mais compacta e com regiões menos estáveis e protegidas em relação a E3 (HUANG et al., 2011). Com isso, ApoE2 e E4 apresentam perfis de ligação a receptores que favorecem hipocolesterolemia e hiperlipidemia, respectivamente (MAHLEY; RALL JR, 2000).

Esses desfechos bioquímicos e metabólicos são responsáveis pela associação dessas isoformas com diferentes eventos biológicos como estresse oxidativo e processo inflamatório (HUEBBE et al., 2011).

Segundo essa conjectura, estudos com humanos sobre variantes genéticas de *APOE*, tempo de vida e doenças que acometem idosos têm sido abrangentemente realizados. O alelo ε4 vem sendo

associado com mortalidade precoce, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas e $\epsilon 2$, com longevidade e tempo de vida saudável (CHRISTENSEN; JOHNSON; VAUPEL, 2006; DEELEN et al., 2011; SCHUPF et al., 2012). A distribuição populacional de $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ e $\epsilon 2$, em torno do mundo, é de cerca de 77,9%, 13,7% e 8,4%, respectivamente (CHRISTENSEN; JOHNSON; VAUPEL, 2006).

Soerensen et al. (2013), num estudo envolvendo caucasianos, sendo 1089 nonagenários e 736 controles na meia idade, demonstraram associação positiva entre o gene *APOE* e extensão do tempo de vida. No entanto, Tindale et al. (2014), encontraram maior frequência do alelo $\epsilon 4$ entre os controles, mas não de $\epsilon 2$ para os muito idosos, em um trabalho com 752 controles e longevos saudáveis. Já numa população de 1406 idosos, com 60 anos ou mais, do sudoeste de Minas Gerais, observou-se que não houve associação entre hipertensão arterial e *APOE*, mas indivíduos portadores do alelo $\epsilon 4$ apresentaram níveis elevados de LDL-c, enquanto que o alelo $\epsilon 2$ foi relacionado a níveis mais baixos dessa lipoproteína (FUZIKAWA et al., 2008).

2.5.4 SIRT1

O gene *SIRT1* (*Silent Information Regulator Type 1*) localizado no cromossomo 10q21.3 é constituído de 11 exons e codifica uma proteína com um importante papel na longevidade e promoção da saúde, a sirtuína 1 (SIRT1). As sirtuínas identificadas em humanos constituem uma família de sete enzimas, as quais são evolutivamente unidas pela presença de um domínio catalítico, de ligação à nicotinamida adenina dinucleotídeo, verificado via atividade de desacetilase-NAD⁺, primariamente, no gene *SIR2* (*Silent Information Regulator 2*) de *Saccharomyces cerevisiae*, envolvido na extensão do tempo de vida desse organismo (FRYE, 2000; SMITH et al., 2000).

SIRT1 é o membro dessa família mais estudado por ser o homólogo mais próximo a Sir2 e pelo seu papel na regulação de processos metabólicos e do ciclo celular, na resposta ao estresse oxidativo e no envelhecimento (HALL et al., 2013; MICHAN; SINCLAIR, 2007). Essa enzima é

encontrada no compartimento nuclear de células hepáticas, pancreáticas, musculares, cardíacas, adipócitos e neurônios. Sua ativação se dá pelos elevados níveis da razão NAD^+/NADH , um indicador chave do consumo de oxigênio e, por conseguinte, da baixa disponibilidade de energia (NOGUEIRAS et al., 2012). Pela catálise de reações envolvidas com a remoção de grupos acetil de resíduos de lisina de proteínas como fatores de transcrição, que induzem processos catabólicos, essa enzima coordena o aumento do estoque energético nas células, garantindo a homeostase (Figura 4).

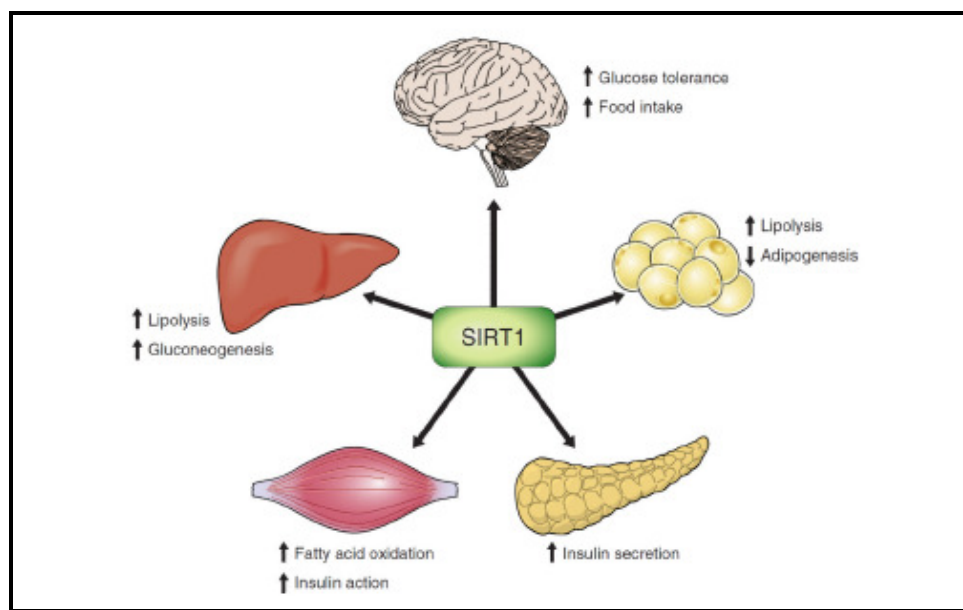


Figura 5. Papéis metabólicos de SIRT1 nos tecidos periféricos e no sistema nervoso central (NOGUEIRAS et al., 2012).

Investigações em modelos animais demonstraram que camundongos transgênicos idosos, com expressão moderada de SIRT1 apresentavam melhor estado geral de saúde, diminuição na expressão de genes relacionados a fenótipos do envelhecimento e menor incidência de carcinomas e sarcomas espontâneos (HERRANZ et al., 2010). Similarmente, linhagens de camundongos *Sirt-1tg*, num modelo de doença cardíaca, mostraram redução nos níveis de marcadores do envelhecimento e da hipertrofia cardíaca, bem como resistência ao estresse satisfatória (ALCENDOR et al., 2007).

Considerando que SIRT1 é uma guardiã do tempo de vida saudável de mamíferos em contextos diversos de doenças, variantes genéticas do *SIRT1* como o SNP rs2273773 C/T têm sido investigadas no contexto da longevidade, sendo uma área de grande interesse e questionamentos.

Figarska, Von and Boezen (2013) examinaram a associação entre a frequência de genótipos do SNP rs2273773 e o tempo de vida de 1390 indivíduos dinamarqueses (49,4 – 61,8 anos), mas não encontraram resultados positivos. Estudos prospectivos desenvolvidos por Kuningas et al. (2007) e Flachsbar et al. (2006) também não constataram associação dessa variante com a longevidade numa amostra de cerca de 1000 caucasianos muito idosos. No entanto, o primeiro grupo de pesquisadores observou que *SIRT1* pode estar relacionado à função cognitiva satisfatória. Achados similares foram descritos por Soerensen et al. (2013), que estudaram genes candidatos à longevidade numa população de caucasianos.

Há poucos trabalhos sobre o estudo de SNPs do *SIRT1* e tempo de vida em humanos. Durante os últimos anos, os achados mostraram, em grande parte, uma relação dessas variantes com fenótipos associados ao metabolismo e morbidades do envelhecimento (LAM et al., 2013; NOGUEIRAS et al., 2012). Han et al. (2015) mostrou que variações genéticas de *SIRT1* estão associadas com o perfil lipídico de idosos, mas não com a longevidade. Uma relação entre variantes polimórficas desse gene, aumento do risco para desenvolvimento de diabetes, redução da sensibilidade à insulina e Índice de Massa Corporal foi observada numa população de indianos (DONG et al., 2011). Em outro estudo, idosos portadores do genótipo CT (rs2273773) apresentavam níveis superiores de SIRT1, indicando proteção relativa ao alelo C. Mas, ao mesmo tempo, um maior índice de estresse oxidativo foi observado nesse grupo (KILIC et al., 2015).

No entanto, o exposto acima não exclui a possibilidade de que variantes polimórficas de moduladores de *SIRT1* ou substratos de sua proteína possam desempenhar um papel crítico na extensão do tempo de vida em humanos. Para atestar essa hipótese, modelos experimentais que sejam capazes de manter as concentrações de NAD⁺ em níveis elevados, como aqueles de indução de restrição calórica, têm sido conduzidos e mostrado consequências do aumento de SIRT1 sobre fenótipos relacionados às DRIs, em diferentes tecidos, com aumento no tempo de

vida e melhor atividade de Sir2 em organismos inferiores, bem como efeitos positivos sobre a saúde humana (LIN et al., 2000; RIBARIC, 2012).

2.6 Estresse Oxidativo, Malondialdeído e o Tempo de vida humano

A relação inversa entre aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e tempo máximo de vida tem sido demonstrada em diversos estudos, sendo esse evento uma das principais causas do envelhecimento e das doenças que o acompanham (DATO et al., 2013; SOHAL; WEINDRUCH, 1996).

Desde a década de 50, a Teoria das espécies reativas de oxigênio do Envelhecimento tem postulado que esse processo se dá, parcialmente, pelo dano oxidativo celular e molecular, oriundos da exposição cumulativa às EROs (HARMAN, 1956). Conforme descrito previamente, o estresse oxidativo é resultante do desequilíbrio entre os estados pró-oxidante e antioxidante e as EROs, seus produtos, são substancialmente instáveis e podem reagir com DNA, proteínas e lipídeos.

Desses alvos biológicos, os lipídeos e o processo de peroxidação lipídica têm sido os mais abrangentemente estudados. A presença abundante de fosfolipídeos nas membranas celulares, e em sítios de produção de espécies reativas de oxigênio, tornam-nos alvos endógenos facilmente acessíveis e rapidamente afetados (DE ZWART et al., 1999). Em especial, ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) são extremamente suscetíveis a reações com as EROs, gerando peróxidos de lipídeos. Esse processo, denominado peroxidação lipídica pode alterar a fluidez e plasticidade da membrana de diversas células como neurônios, cardíacas e musculares, e ocasionar dano à sua integridade (PRATICÓ, 2000). Geralmente, a sensibilidade dos ácidos graxos à oxidação aumenta exponencialmente em função do número de duplas ligações em sua molécula, as quais são propensas ao ataque (BIELSKI; ARUDI; SUTHERLAND, 1983).

Nesse processo autooxidativo, as EROs, principalmente o radical hidroxila (OH^\bullet), reagem com os ácidos graxos poliinsaturados (LH), formando radicais livres de ácidos graxos (L^\bullet), os quais reagem, espontaneamente, com o oxigênio, produzindo o peróxiradical do ácido graxo (LOO^\bullet). Este último pode abstrair um átomo de hidrogênio de uma outra molécula de ácido graxo, formando hidroperóxidos de lipídeo (LOOH) e um novo radical, o qual propicia uma reação em cadeia. Os hidroperóxidos podem sofrer reações de decomposição e ser convertidos em produtos secundários, de baixo peso molecular, como 4-hidroxi-2-nonenal, acroleína e propanodial ou malondialdeído – MDA. (Figura 3) (AUGUSTO, 2006; DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005).

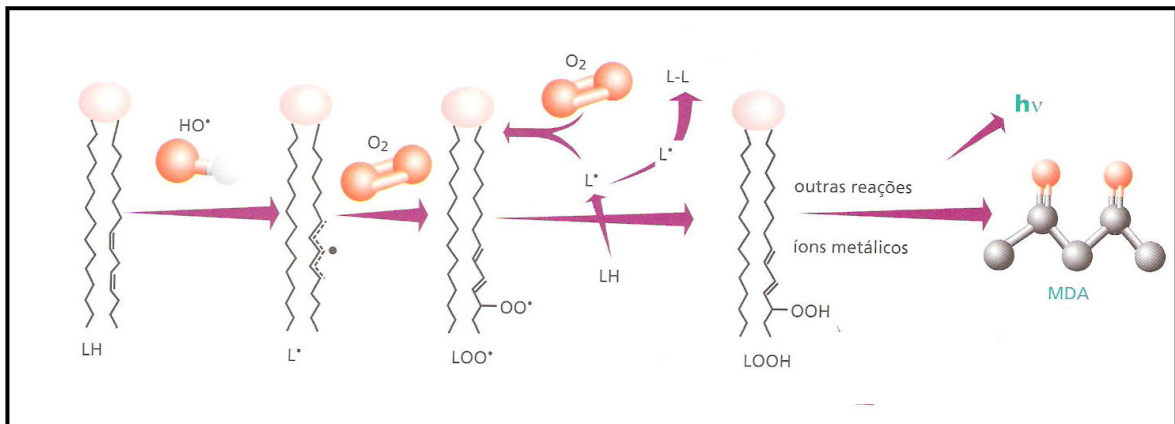


Figura 6. Etapas da Peroxidação Lipídica (Modificado de Augusto, 2006).

Esses compostos bioativos têm recebido particular atenção porque podem propagar e amplificar a injúria oxidativa, já que são relativamente estáveis, com notável meia-vida e difundem-se facilmente pela membrana, atingindo sítios diferentes daquele de origem (NEGRE-SALVAYRE et al., 2008). Além disso, são detectados em tecidos biológicos e têm a capacidade de reagir com ácidos nucléicos e proteínas, alterando mecanismos envolvidos com a funcionalidade celular (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). Investigações *in vitro* e *in vivo* demonstraram a presença desses produtos secundários em diversos modelos de condições patológicas que acompanham o envelhecimento (MOREAU et al., 2005; PAMPLONA et al., 2005; UCHIDA, 2000).

Malondialdeído é o biomarcador mais explorado para monitorar a oxidação lipídica, bem como o envelhecimento *per si* ou saudável. Esse composto carbonílico é derivado da endociclicização dos ácidos graxos linoléico, linolênico e docosaexanóico, pode ser encontrado em suas formas livre ou ligada a grupos sulfidril ou amino de moléculas e sua medida no plasma constitui um reflexo do estado sistêmico (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLER, 1991; MUTLU-TURKOGLU et al., 2003).

Diversas metodologias vêm sendo desenvolvidas para quantificar MDA em amostras biológicas. O método comumente utilizado é o Ensaio de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), introduzido por Yagi et al. (1976), que permite a leitura de um cromógeno róseo por espectrofotocolorimetria, em amostras de plasma. No entanto, por considerar interferentes na medida, esse teste é inespecífico (STEGHENS et al., 2001).

Em contraste a essa limitação, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizada para identificar e quantificar malondialdeído é mais específica, reproduzível e confiável. Com frequência, utiliza-se agentes derivatizantes, como 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), para tornar a identificação do MDA mais precisa e detector espectrofotométrico com arranjo de diodos (DAD), aumentando a seletividade. Nessa perspectiva, o estudo de Antunes et al. (2008) desenvolveu e validou uma metodologia para quantificação do MDA plasmático por CLAE, em indivíduos de 20 a 40 anos, brasileiros, empregando hidrólise alcalina, precipitação ácida, DNPH e DAD. Os níveis desse composto carbonílico variaram de 2,93 a 3,69 $\mu\text{mol/l}$ de plasma.

Nielsen et al. (1997) consideraram esse teste e critérios semelhantes para análise do MDA em plasma humano de indivíduos dinamarqueses, de 20 a 79 anos, e encontraram valores de 1,19 a 1,76 $\mu\text{mol/l}$ de MDA no plasma para idosos, de 69 a 79 anos. Belenguer Varea et al. (2015), admitindo CLAE como procedimento, observaram numa amostra de 59 indivíduos que nonagenários e centenários apresentaram níveis inferiores de MDA ($1,44 \pm 0,45 \mu\text{mol/l}$) em relação aos controles, com 70 a 80 anos ($1,84 \pm 0,59 \mu\text{mol/l}$). Estudos mostraram que indivíduos longevos, possivelmente, apresentam sinais genéticos de proteção, envolvidos com melhor resposta antioxidante (LABAT-ROBERT; ROBERT, 2014; MECOCCI et al., 2000).

2.7 Integridade genômica, Envelhecimento e Longevidade

A molécula de DNA exerce um papel crítico na manutenção da homeostase e sobrevivência dos seres vivos, pois está envolvida com a síntese de componentes celulares, ciclo celular e suas vias de sinalização, apoptose, estabilidade genômica e senescência (LOMBARD et al., 2005). Assim, o estudo de possíveis danos à sua molécula, cumulativos e relacionados à idade, merece especial atenção e têm evidenciado sua associação com o envelhecimento e aumento da morbimortalidade (SOARES et al., 2014).

Sabe-se que, além dos danos oxidativos diretos a macromoléculas, o aumento dramático das EROs, acompanhado de deficiente sistema antioxidante, pode gerar produtos secundários genotóxicos como o malondialdeído, além de influenciar nos mecanismos de reparo do DNA (WILSON; BOHR; MCKINNON, 2008).

As espécies reativas de oxigênio podem acarretar ligações cruzadas DNA-proteínas, danos à estrutura fosfato-desoxirribose, bem como modificações químicas específicas, nas bases purínicas e pirimídicas, o que possivelmente, resulta em mutações, quebra das ligações das bases nitrogenadas ou das fitas do DNA (DE ZWART et al., 1999; DIZDAROGLU, 1991). Ainda, o composto carbonílico MDA, produto da peroxidação lipídica, pode formar adutos ou ligações covalentes com as bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucléico (MARNETT, 1999).

Os níveis e extensão das lesões oxidativas ao DNA em fluidos biológicos, como plasma, e tecidos têm sido considerados biomarcadores confiáveis. Dentre as diversas propostas, o Ensaio do Cometa apresenta-se como uma das técnicas mais simples e difundidas para estudos genotoxicológicos em eucariontes (NERI et al., 2015).

O Ensaio do Cometa ou SCGE Assay (“*Single Cell Gel Electrophoresis*”), uma eletroforese de células individualizadas, foi descrito pela primeira vez por Östling e Johanson (1984), é rápido, econômico, sensível, requer poucas células para análise e avalia danos genômicos que, após serem processados, podem culminar em mutações. Ele combina técnicas bioquímicas, para

detectar quebras de fitas simples, sítios álcali-lábeis, sítios abásicos, excisão de sítios incompletos de reparo, quebras de dupla-fita e ligações cruzadas, com a abordagem típica de análise de células da citogenética (COLLINS, 2004; SINGH et al., 1989; TICE et al., 2000).

Nesse teste, uma suspensão celular é misturada a agarose e sofre lise por meio da ação de um detergente e concentrações salinas elevadas. As membranas celulares sofrem lise, histonas são extraídas e o material genético, maior, mais pesado e aderido à matriz nuclear residual, preenche o espaço do gel, numa estrutura semelhante ao núcleo, chamada de nucleóide. Quando sujeito ao campo eletroforético, o DNA migra, em função da extensão do dano, em direção ao anodo, com uma aparência de um cometa, que pode ser visualizado em microscópio de fluorescência e classificado de acordo com os fragmentos, comprimento e intensidade da cauda (Figura 7) (COLLINS, 2004; FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995).

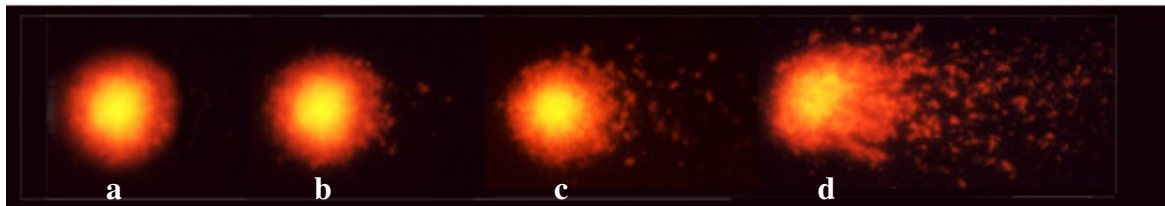


Figura 7. Classes de Cometa que podem ser encontradas na análise: (a) Classe 0; (b) Classe 1; (c) Classe 2; (d) Classe 3. Aumento 1000x. (KOBAYASHI et al., 1995).

Estudos sobre danos à integridade do DNA em populações longevas ainda são escassos, mas, por meio do Ensaio do Cometa, vêm demonstrando que os índices de lesões genômicas no grupo que atinge oitenta e cinco anos ou mais são maiores ou iguais àqueles de indivíduos idosos mais jovens. Hyland et al. (2002) investigaram os níveis de dano ao DNA em 21 nonagenários e 5 controles e não observaram diferenças nos resultados da integridade desse material em relação aos controles com idade média de 40,7 anos. No entanto, os longevos apresentaram capacidade antioxidante superior. Chevanne et al., nos anos de 2003 e 2007, mostraram que os índices de dano ao DNA em indivíduos muito idosos foram similares em relação àqueles mais jovens (18-76 anos), em estudos *in vitro* e *in vivo*. Por outro lado, num estudo envolvendo 40 jovens, 35 idosos e 22 idosos mais velhos, o dano ao material genético foi superior nesse último grupo, mas seus

mecanismos de reparo foram mais eficientes (HUMPHREYS et al., 2007). Recentemente, o trabalho de Franzke et al. (2015) com 105 idosos institucionalizados, de 65 a 98 anos, mostrou que o exercício físico não ocasionou aumento de lesões genômicas entre idosos sob treinamento ou não, porém observou-se melhor capacidade antioxidante e resistência aos danos provocados por peróxido de hidrogênio.

Essas possíveis respostas de resistência ao estresse oxidativo sugerem que o aumento do dano ao DNA com a idade é acompanhado da melhor eficiência dos seus mecanismos de reparo e antioxidantes no envelhecimento saudável, os quais exercem papel crítico na defesa de células que são, rotineiramente, expostas às espécies reativas de oxigênio em sítios de inflamação e defesa (FRANCESCHI et al., 2007; HUMPHREYS et al., 2007; KING et al., 1997). Esses artifícios positivos, geneticamente controlados, parecem prevenir ou, pelo menos, minimizar os efeitos prejudiciais advindos da senescência.

2.8 Estratégias de promoção do envelhecimento saudável

Apesar de o envelhecimento populacional ser amplamente reconhecido como uma das grandes conquistas da humanidade, ele acarreta profundas implicações sobre as políticas públicas e representa um dos maiores desafios da saúde contemporânea (LIMA-COSTA; VERAS, 2003).

No Brasil, conforme descrito anteriormente, o grupo de idosos representa um contingente populacional considerável e de crescente importância (IBGE, 2013a). Sabe-se que as doenças que acometem esse grupo são, em geral, múltiplas e perduram por vários anos, sendo o principal fator limitante do tempo de vida, que ocasiona sofrimento humano e demandas econômicas (BUDOVSKY et al., 2007). Esse panorama gera um interesse expressivo em conceber medidas que sejam capazes de retardar ou, mesmo, impedir o surgimento dessas morbidades.

Para a Organização Mundial de Saúde (2005), entender como os indivíduos estão envelhecendo e aumentar a expectativa de vida saudável e com qualidade tornou-se meta imprescindível para o enfrentamento desse cenário biodemográfico.

Como instrumentos mais recentes de promoção da saúde do indivíduo idoso, no Brasil, há as diretrizes divulgadas, em 2006, pelo Pacto pela Saúde e a revisão da Política Nacional de Saúde da Pessoa Idosa – PNSI (BRASIL, 2006a;b). A saúde do idoso, a promoção do envelhecimento saudável e as pesquisas permanentes são premissas que se destacam.

Nesse sentido, o Ministério da Saúde publicou o Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônico-Degenerativas no Brasil, de 2011 a 2022. Esse plano visa preparar o Brasil para enfrentar e deter, nos próximos dez anos, as DCDs, as quais correspondem cerca de 70% das causas de mortes, por meio de desenvolvimento e implementação de ações integradas, sustentáveis e baseadas em evidências para sua prevenção e controle, além de fortalecer os serviços de saúde. Esse plano define como diretrizes a promoção da saúde e cuidado integral ao idoso e considera a alimentação um fator de risco modificável para as DCDs (BRASIL, 2011).

Na perspectiva de ações de promoção da saúde, a utilização de compostos bioativos, como glucanas, polissacarídeos produzidos por bactérias, leveduras, algas, plantas e fungos, vem se destacando, já que apresentam potencial biotecnológico, sendo alvos promissores no auxílio da prevenção e controle das doenças crônico-degenerativas (RAMESH; THARANATHAN, 2003).

2.8.1 Glucanas

Glucanas são polímeros, amplamente distribuídos na natureza, constituídos de unidades de D-glicopiranosídeos (d-Glcp), ligados por pontes glicosídicas e classificados em dois grupos, α ou β -D-glucanas, de acordo com a configuração anomérica da cadeia principal (CHEN; SEVIOUR, 2007; SILVA et al., 2006).

Apesar da simplicidade na composição monossacarídica, uma ampla diversidade desses polissacarídeos pode ser encontrada devido ao número e à configuração do carbono anomérico das unidades de d-Glpc, da posição e sequência das ligações glicosídicas na cadeia, bem como da frequência de ramificações e da conformação da cadeia (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013).

Esses biopolímeros são produzidos por bactérias, algas, plantas e fungos (MCINTOSH; STONE; STANISICH, 2005) e as α e β -D-glucanas podem ser distinguidas pela sua propriedade estereoquímica, sendo que ligações α -glicosídicas são formadas na posição axial da cadeia e estão presentes nos polissacarídeos pululana e dextrana, produzidos por fungos e bactérias. Já as interações β assumem uma posição equatorial na cadeia e são encontradas na parede celular ou no espaço extracelular de fungos e leveduras como xantanas e escleroglucanas ou ainda podem ser obtidas de cereais (BARBOSA et al., 2003; BASHARI et al., 2013; SPATAREANU et al., 2014).

Na literatura, há poucos registros sobre α -glucanas, mas produtos naturais contendo β -glucanas têm sido usados há milhares de anos pelos seus benefícios à saúde humana, sendo sua identificação como componente ativo, somente, descrita há poucas décadas (LUCAS et al., 1958; SHA et al., 2000; WILLIAMS; DI LUZIO, 1980). A partir dessa descoberta, esses biopolímeros, principalmente, de fungos, têm sido isolados e extensivamente estudados quanto às suas possíveis aplicações biotecnológicas (CHEN; SEVIOUR 2007; WASSER, 2002; ZONG; CAO, WANG, 2012).

Fungos podem produzir β -glucanas de diferentes tipos, com propriedades físico-químicas, reológicas e bioativas peculiares, localizadas na parede celular e no meio extracelular. Essas últimas estão integradas ao exterior da parede celular, formando cápsulas ao redor da célula ou acumulam-se em grandes quantidades, difundindo-se para o meio extracelular, sendo denominadas de exopolissacarídeos (EPS). Esses polissacarídeos fúngicos são responsáveis por um percentual expressivo da biomassa, contribuindo com mais de 75% na constituição dos polissacarídeos da parede das hifas (GUTIÉRREZ; PIETRO; MARTINEZ, 1996; SELBMAN et al., 2002).

Os EPS estão relacionados a processos fitotóxicos e doenças em plantas ou a interações planta-patógenos, como elicitores (CORSARO et al., 1998; SELBMANN; SITNGELE; PETRUCCIOLI, 2003). Estudos demonstraram sua participação na degradação da lignina, como fonte indireta de peróxido de hidrogênio, adsorção de enzimas excretadas, proteção das hifas contra desidratação e regulação da concentração de glicose extracelular (BUCHALA; LEISOLA, 1987; KRCMAR et al., 1999).

Na indústria alimentícia, essas β -glucanas apresentam um leque amplo de aplicações devido às suas propriedades espessantes, estabilizantes, emulsificantes e gelificantes (AHMAD et al., 2012).

Todavia, considerando seu potencial como modificador da resposta biológica (MRB) e utilização em escala comercial, os EPS também vem ganhando atenção nos últimos anos. Além da atividade imunoprotetora, ações antitrombótica, antioxidante, antiviral, antiinflamatória, antiproliferativa, efeitos sobre fatores de risco para doenças cardiovasculares, diabetes e infecções têm sido descritos para esses polissacarídeos (BRANDI et al., 2011; CUNHA et al., 2012; KATO et al., 2010; MARTINICHEN-HERRERO et al., 2005; SOLTANIAN et al., 2009; SYNITSYA; NOVÁK, 2013 ;WANG et al., 2010). Ao lado dessas características, esses biopolímeros são secretados no meio de crescimento, com fácil recuperação por meio de precipitação alcoólica, seguida de purificação e caracterização química e não são suscetíveis a alterações climáticas, contaminação oceânica ou a adversidades da colheita, como no caso daqueles de origem vegetal ou marinha (CHEN; SEVIOUR, 2007; VASCONCELOS et al., 2013).

Essas inúmeras atividades biológicas resultam numa infinidade de aplicações para esses EPS nos setores alimentício, de cosméticos, farmacêutico e biomédico.

2.8.2 Exopolissacarídeo Botriosferana

O fungo ascomiceto e lignolítico, *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, foi isolado do cancro de eucalipto e produz um exopolissacarídeo descrito como uma β -D-glucana (BARBOSA; DEKKER; HARDY, 1996; DEKKER; BARBOSA, 2001).

Posteriormente, Barbosa et al. (2003) caracterizaram esse polímero, estruturalmente, como um EPS ((1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -D-glucana), o qual foi denominado botriosferana. Esse polissacarídeo é constituído de uma cadeia principal, linear, de resíduos de glicose (homopolímero), unidos por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 3), com ramificações de glicose e gentiobiose (duas moléculas de glicose), a cada cinco resíduos de carbono da cadeia, por ligações do tipo β (1 \rightarrow 6). A estrutura química dessa β -glucana está representada na figura 8.

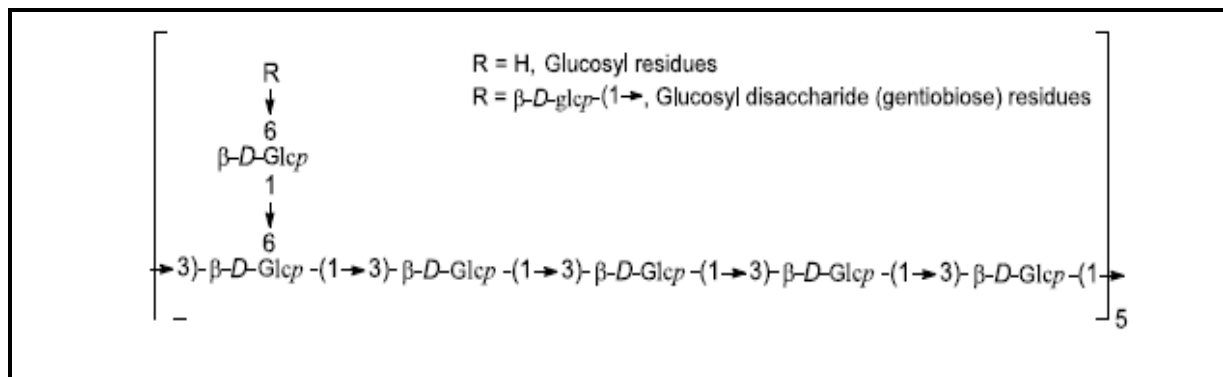


Figura 8. Estrutura química da (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -D-glucana do exopolissacarídeo botriosferana (BARBOSA et al., 2003).

Muitos microorganismos produzem esses polissacarídeos em resposta a fatores ambientais, como fonte de carbono, a qual determina a quantidade e qualidade do EPS obtido (ROSADO et al., 2003). Ao avaliar as possíveis fontes de carbono para a produção de botriosferana, Steluti et al. (2004) observaram que *Botryosphaeria rhodina* sintetizou esse EPS na maioria dos monômeros e dímeros de carboidratos utilizados (glicose, frutose, galactose, manose, sorbitol, lactose, sacarose, sacarose comercial e melão de cana-de-açúcar). No entanto, sacarose comercial foi a melhor fonte de carbono, com maior produção de botriosferana. Além disso, a utilização dessa matéria-

prima na composição do meio de cultivo mostra-se bastante viável, considerando seu custo e fácil acesso, bem como a produção em escala comercial desse EPS.

Além disso, esse homopolímero apresenta considerável solubilidade em água, sendo capaz de formar géis ou soluções viscosas, o que favorece sua utilização nas indústrias alimentícia, farmacêutica e química (NOVAK; VETVICKA, 2008; KAGIMURA et al., 2015).

Diversos estudos têm demonstrado a bioatividade desse EPS, o que o insere no grupo de compostos modificadores da resposta biológica. Miranda et al. (2008) mostraram que o botriosferana não foi mutagênico e exerceu efeito quimioprotetor em ensaio *in vivo*. Em trabalho desenvolvido com ratos *Sprague-Dawley* e células de macrófagos RAW264.7, verificou-se uma potente atividade imunomodulatória desse biopolímero (WENG et al., 2011). Com relação à possível atividade sobre parâmetros bioquímicos, Miranda-Nantes et al. (2011) encontraram um efeito hipoglicemiante considerável desse polissacarídeo em ensaio *in vivo*, de indução de diabetes. Mais recentemente, foram confirmadas suas atividades antioxidante, antiproliferativa e pró-apoptótica em ensaios *in vitro* com células MCF-7 de câncer de mama e Jurkat de linfócitos humanos leucêmicas (GIESE et al., 2015; MALINI et al., 2015; QUEIROZ et al., 2015).

Os mecanismos envolvidos nas respostas biológicas de β -glucanas ainda não foram totalmente elucidados. Em ensaios *in vivo*, acredita-se que ocorra uma cascata de eventos com ativação de macrófagos e seus receptores, seguida da ativação de vias de sinalização para expressão de genes que regulam apoptose durante a proliferação e invasão celular (NOVAK; VETVICKA, 2009). Além disso, em vertebrados, a modulação do sistema imune por esses EPS se dá pelo seu contato com receptores e sua habilidade de ativar leucócitos e ocasionar um estado pró-inflamatório (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013).

Essas β -glucanas fúngicas têm sido usadas pelas medicinas japonesa e chinesa, tradicionalmente e há milênios, para o tratamento de doenças crônico-degenerativas como diabetes, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, bem como para aumentar o tempo de vida (BORCHERS et al., 1999; ZONG; CAO; WANG, 2012). Sua efetividade, possíveis vias biológicas e/ou fisiológicas também têm sido discutidas. Acredita-se que seus efeitos antihiperlipidêmico e

antihiperlicemiante estejam relacionados à sua capacidade de interferir na absorção, em nível intestinal, do colesterol e glicose, como principais constituintes de fibras dietéticas, de estimular a produção de ácidos biliares e influenciar na síntese do hormônio insulina (CASTRO; TIRAPEGUI; BENEDICTO, 2003; EL KHOURY et al., 2012). Nesse caso, parece que a bioatividade desses polímeros está relacionada à sua estrutura molecular, incluindo a constituição em monossacarídeos, ligações glicosídicas na cadeia principal e grau de ramificações (FREITAS et al., 2009; NOVAK, VETVICKA, 2008).

Apesar do vasto interesse e das pesquisas já realizadas pelo nosso grupo, há muito ainda a ser explorado quanto ao potencial terapêutico e aplicações biotecnológicas do EPS ((1→3;1→6)-β-D-glucana). Até o presente, as investigações foram realizadas em ensaios *in vitro* ou com murinos adultos. Estudos que se propõem a investigar o efeito (anti)citogenotóxico e a bioatividade do botriosferana em camundongos *Swiss (Mus musculus)*, machos e fêmeas, jovens e idosos, submetidos a tratamento subcrônico e em modelo animal com ablação gênica, de doença crônico-degenerativa são importantes devido ao seu papel na ampliação do conhecimento científico e do potencial biotecnológico dessa biomacromolécula. Os dados gerados poderão auxiliar no incremento da avaliação da sua segurança quanto à citogenotoxicidade, em fases diferentes do ciclo de vida, e fornecer subsídios para registro de patente de novo ingrediente alimentar ou produto com fins biotecnológicos, sendo adjuvante na prevenção ou tratamento de doenças que acompanham o envelhecimento.

2.9 Ensaio com Animais

Apesar do progresso observado no uso de métodos alternativos, como ensaios *in vitro*, modelos experimentais com animais continuam sendo dignos de mérito, principalmente, por oferecerem informações de forma ampla sobre todo o organismo (CHIA et al., 2005; RIBEIRO; CAMPOS; TIRAPEGUI, 1995).

Dentre os modelos *in vivo*, a utilização de camundongos, observando-se os preceitos éticos, vem se destacando desde o início do século XX. A escolha, em pesquisas científicas, por esse murino

se dá em função do seu pequeno porte, de ser muito prolífero, ter curto período de gestação, da fácil domesticação e manutenção (SANTOS, 2002a;b). Além disso, possui quantidade considerável de protocolos experimentais já estabelecidos e compõe uma infinidade de modelos existentes (LEON, 2005).

Murinos são também os animais de escolha para se avaliar o potencial genotóxico de agentes com aplicações biotecnológicas, como o botriosferana, uma vez que ensaios prévios para avaliação e aprovação de novos produtos, com o uso de roedores, são preconizados pelos principais órgãos regulamentadores (ANVISA, 2013a;b; CSGMT, 1988).

De acordo com Richardson et al. (2016), quanto às investigações na biogerontologia, camundongos constituem o modelo mamífero de escolha. Além das características descritas acima, esses animais são interessantes para se estudar o envelhecimento e doenças que o acompanham, devido à sua relativa facilidade de manipulação genética, baixo custo e tempo de vida curto.

Segundo esse mesmo autor, as características genéticas e o sexo podem ter um efeito significativo sobre o envelhecimento, bem como sobre as funções fisiológicas e doenças. Dessa maneira, é imperativo que os estudos sejam realizados em animais de ambos os sexos, com heterogeneidade gênica, e, se possível, também em linhagens isogênicas.

2.9.1 Avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade

Conforme descrito anteriormente, exopolissacarídeos como as β -D-glucanas têm despertado grande interesse devido às suas propriedades tecnológicas e atividades biológicas. Em relação ao botriosferana, estudos envolvendo sua eficácia como composto bioativo e sua segurança toxicológica vêm sendo desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa. Apesar de extensivamente estudado, seus potenciais mutagênico, citotóxico e antimutagênico em ensaio *in vivo*, com animais jovens e idosos, ainda não foram explorados.

Segundo Agências Reguladoras, nacionais e internacionais, a avaliação do perigo genotóxico de compostos com potencial terapêutico é uma etapa importante de estudos de segurança pré-clínicos (ANVISA, 2013a;b; SAWANT; FIELDEN; BLACK, 2014).

O dano ao DNA pode se manifestar de várias formas, como mutações de ponto, quebras de fitas duplas ou simples, formação de adutos e por eventos de recombinação (KIRSCH-VOLDERS et al., 2002). Uma bateria de testes, *in vitro* e *in vivo*, tem sido adotada pela Genética Toxicológica para avaliar o potencial de mutagenicidade de novos agentes bioativos (OECD, 1997).

Dentre esses ensaios, o Teste do Micronúcleo *in vivo* têm sido amplamente aceito e recomendado na investigação de agentes clastogênicos, que quebram cromossomos, e aneugênicos, os quais induzem aneuploidias ou segregação cromossômica anormal (MACGREGOR et al., 1987; KRISHNA; HAYASHI, 2000). Nesse teste, avalia-se a formação de micronúcleos (MN) em amostras de eritrócitos da medula óssea ou de sangue periférico de roedores, o qual é especialmente relevante por ser rápido, de baixo custo, sensível e considerar processos como metabolismo da substância-teste, sua farmacocinética e reparo do DNA, que estão ativos e contribuem com respostas distintas (OECD, 1997; KRISHNA; HAYASHI, 2000; TWEATS et al., 2007).

A proposta inicial para esse teste citogenético foi desenvolvida no final do século XX, sendo os micronúcleos chamados de “corpos de Howell-Jolly” (SCHMID, 1975; SEARS; UDDEN, 2011). Subsequentemente, Heddle et al. (1983) modificaram o método, desde seu delineamento e protocolos à análise estatística, e atestaram que o micronúcleo era um biomarcador sensível de genotoxicidade.

Os MN são uma pequena massa de cromatina ou corpos nucleares minúsculos, separados do núcleo principal, na fase da telófase, por um atraso durante a migração para os pólos da célula, na anáfase da divisão celular, originados de fragmentos cromossômicos acêntricos, advindos de quebras cromossômicas ou de cromossomos inteiros (Figura 9). Especificamente, durante o processo de eritropoiese, o núcleo principal é expulso de um eritroblasto e o MN, um fragmento ou o cromossomo inteiro permanece no citoplasma, envolto pela membrana nuclear, no eritrócito

imaturu e pode ser visualizado por meio de análise citológica (SEDELNIKOVA et al., 2007; FENECH et al., 2011).

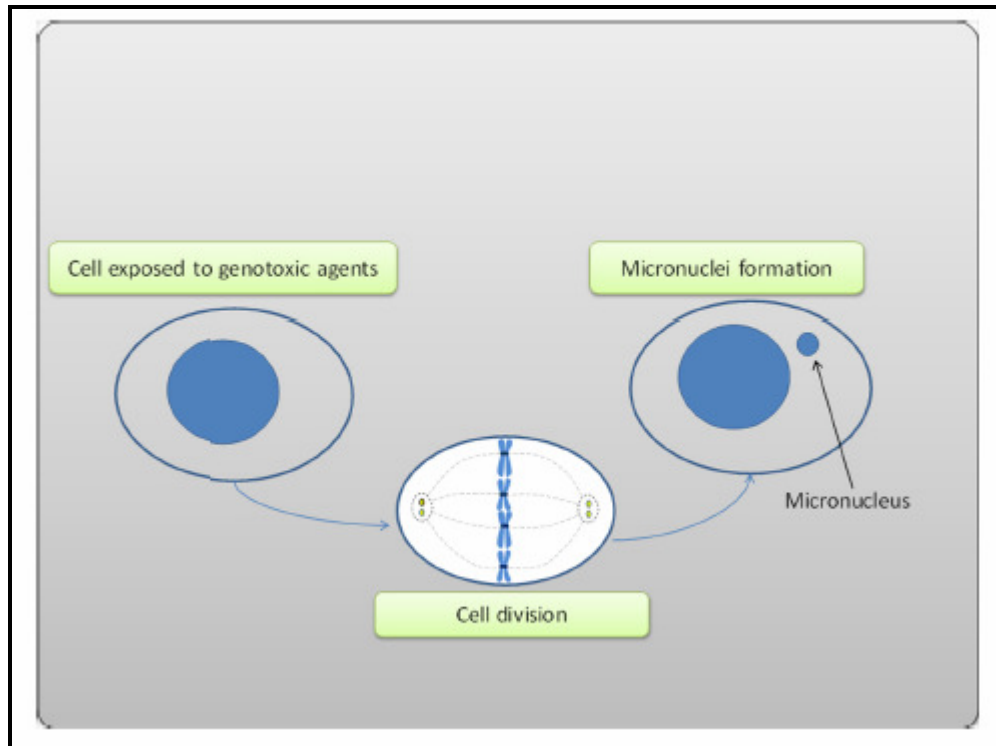


Figura 9. Formação de micronúcleos em células expostas a agentes genotóxicos (LUZHNA; KATHIRIA; KOVALCHUK, 2013).

De acordo com Ribeiro (2003), durante a análise em medula óssea, o efeito do agente potencialmente tóxico é observado nessas células imaturas, chamados de eritrócitos policromáticos anucleados (PCE), que possuem meia-vida relativamente curta, de até vinte e quatro horas, o que garante que a detecção de quaisquer micronúcleos gerados seja resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente. Os MN são facilmente identificáveis, sendo sua distribuição bem definida e os PCE ainda contêm ácido ribonucléico (RNA) e coram-se de azul na presença de eosina azul de metileno seguindo o método de Leishman. Eritrócitos normocromáticos (NCE), maduros, são também identificados com coloração rósea, quando o mesmo corante está presente, já que não mais possuem RNA, e sim, hemoglobina, em maior proporção (KRISHINA; HAYASHI, 2000). Ao final, é possível estimar o potencial mutagênico da substância-teste pelo

cômputo de PCE e MN, entre materiais de controles e tratamentos, e com a razão PCE: (PCE+NCE), sua citotoxicidade.

Em camundongos, esses ensaios, de toxicidade subcrônica ou crônica, podem ser realizados também em sangue periférico, por meio da análise de micronúcleos em NCE, já que o baço desses animais não remove da circulação sanguínea os eritrócitos com micronúcleos. Esse aspecto é oportuno porque mais de uma amostra de um mesmo animal pode ser obtida, sem a necessidade de eutanásia, o que permite avaliar o perfil de frequência de micronúcleos ao longo de um tratamento (CSGMT, 1992; SCHLEGEL; MACGREGOR, 1982). Hayashi et al. (1990) reportaram o Teste do micronúcleo em sangue periférico, empregando a coloração laranja de acridina. Esse corante fluorescente flui, rapidamente, pelo citoplasma, através da membrana celular, e liga-se ao DNA e RNA, com alta afinidade (BENVIN et al., 2007). Entretanto, possui a propriedade de se intercalar ao DNA, emitindo fluorescência amarela, o que não é observado quando da sua ligação ao RNA, gerando fluorescência vermelha. Essa capacidade distinta possibilita a identificação dos eritrócitos normocromáticos, ricos em RNA, e os micronúcleos, com DNA em sua constituição.

Embora possam ser originados espontaneamente, a indução de micronúcleos pode ser ocasionada quando da utilização de agentes que produzam um aumento substancial, confiável e detectado pela sua frequência, superior aos modestos níveis, encontrados normalmente (OECD, 1997). Essas substâncias são administradas aos controles positivos durante os testes, sendo a ciclofosfamida um dos agentes escolhidos para esse fim. A ciclofosfamida, utilizada como um antineoplásico, é um agente alquilante do tipo mostarda nitrogenada, que interfere na síntese do DNA, sendo sua principal ação farmacológica relacionada à ligação, de forma covalente, a compostos nucleofílicos, de células em divisão. Esse processo de alquilação gera efeitos clastogênicos significativos (COLVIN, 1999; KADAM; MOHADIK; BOTHARA, 2007).

Além de explorar o perigo genotóxico de um composto bioativo, é possível também avaliar o seu potencial antimutagênico ou quimioprotetor, pelo Ensaio do Micronúcleo. Nessa proposição, os tratamentos com os agentes mutagênico e antimutagênico podem ocorrer de forma simultânea, prévia ou posterior à indução do dano ao DNA (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

O termo “antimutagênico” foi empregado, pela primeira vez, por Novick e Szilard, em 1952, e representa a característica peculiar de agentes que reduzem a frequência de mutações espontâneas ou induzidas, independente do mecanismo envolvido (VON BORSTEL; DRAKE; LOEB, 1996). Dois mecanismos para esses agentes protetores são propostos: a desmutagênese e a bioantimutagênese. No primeiro, os agentes antimutagênicos são capazes de inativar, por ação direta, os compostos que induzem mutações, química ou enzimaticamente, inibindo a ativação metabólica de pró-mutágenos ou pelo seqüestro de moléculas reativas. Na bioantimutagênese, os agentes protetores atuam sobre o processo que acarreta a indução de mutações, como moduladores do reparo e replicação do DNA (FERGUSON, 1994; KADA; MORITA; INOUE, 1978; WATERS et al., 1996).

Estudos demonstraram que β -D-glucanas apresentam atividades antitumoral, anticancerígena e antiinflamatória, o que as torna agentes terapêuticos promissores (CHEN; SEVIOUR 2007; MANTOVANI et al., 2008; PETRAVIĆ-TOMINAC et al., 2010; SURENJAV et al., 2006). Miranda et al. (2008) verificaram, num protocolo de tratamento simultâneo, por gavagem, durante 15 dias, com camundongos *Swiss* adultos, de ambos os sexos, que o botriosferana apresentou atividade antimutagênica, dose-dependente, contra os efeitos clastogênicos induzidos pela ciclofosfamida, mas não investigou sua citotoxicidade. Com relação aos possíveis mecanismos envolvidos nesse efeito biológico, Giese et al. (2015) constataram que esse EPS, em ensaio *in vitro*, de eliminação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, exibiu uma elevada capacidade antioxidante natural, bem como uma considerável eliminação dessas espécies instáveis. Além disso, Queiroz et al. (2015) e Malini et al. (2015) mostraram, em ensaios *in vitro*, com células MCF-7 de câncer de mama e Jurkat de linfócitos humanos leucêmicas, uma atividade antiproliferativa expressiva, bem como modulação gênica pelo botriosferana, que lhe conferem importante propriedade biomodulatória no tratamento do câncer.

Nesse sentido, essa (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -D-glucana poderá proteger as células contra os efeitos produzidos por agentes genotóxicos, possibilitando, no futuro, a redução na incidência do risco de câncer e de outras doenças crônico-degenerativas que acometem a população idosa.

Sabe-se que o processo de envelhecimento e as DCDs são acompanhados e/ou ocasionados pelo aumento dos danos oxidativos às células e ao material genético (KOHEN; NISKA 2002; DATO et al., 2013). O Teste do Micronúcleo tem sido considerado um dos principais marcadores da instabilidade genômica (LUZHNA; KATHIRIA; KOVALCHUK, 2013), sendo possível, através de parâmetros como antimutagenicidade e anticitotoxicidade, em ensaios com murinos idosos, estabelecer estratégias inovadoras e promissoras no uso de biomoléculas como o botriosferana para amenizar os efeitos dessas lesões oxidativas.

Alcançados os resultados satisfatórios quanto à segurança citogenotóxica do exopolissacarídeo botriosferana, estudos envolvendo sua eficácia no que tange à prevenção e tratamento de doenças crônico-degenerativas, como as cardiovasculares, são de extrema relevância, haja vista seu impacto sobre os custos dos Sistemas de Saúde, na qualidade e tempo de vida da população mundial.

2.9.2 Modelo Animal para Aterosclerose

As doenças cardiovasculares (DCV) são consideradas a principal causa de morte no mundo, sendo responsáveis por mais de 17,3 milhões de óbitos, anualmente (WHO, 2011). Em 2011, no Brasil, 335.213 indivíduos morreram por DCV, sendo 37,17% relativos àqueles com sessenta anos ou mais. Ademais, a essas doenças foi atribuída a segunda causa de internações, perfazendo 30% das mesmas (DATASUS, 2011).

A aterosclerose é uma doença degenerativa crônica, concebida como a causa primária de outras doenças cardiovasculares, como acidente vascular encefálico e doença isquêmica do coração, dada em decorrência da agressão endotelial que acomete, principalmente, a camada íntima de artérias de médio e grosso calibre (HOOG et al., 1993; LUSIS, 2000). O processo aterosclerótico é progressivo e lento, caracterizando-se pelo acúmulo de lipídeos, células inflamatórias e elementos fibrosos, sendo sua etiologia multifatorial com a combinação de fatores genéticos, ambientais e tempo de vida (HACKAM; ANAND, 2003; LIBBY, 2002).

A hipótese de que a lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), que transporta 65% do colesterol na corrente sanguínea, é aquela que desempenha papel relevante na patogênese da aterosclerose, em relação a outras (lipoproteínas de densidade intermediária -IDL, de muito baixa densidade -VLDL ou quilomícrons), é uma das mais aceitas. A agressão endotelial, dada por diversos fatores como pela hipercolesterolemia, causada pelo maior aporte de colesterol pela dieta ou por variantes genéticas que acarretam diminuição/alteração dos receptores de LDL, aumenta as concentrações plasmáticas de LDL-c. A disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da camada íntima dos vasos a lipoproteínas, favorecendo sua retenção no espaço subendotelial. A LDL-c é oxidada por espécies reativas de oxigênio, torna-se imunogênica e uma lesão no endotélio é formada. No endotélio, moléculas de adesão passam a ser expressas e mediadores de resposta inflamatória são produzidos, com a presença de macrófagos, repletos de lipídeos, formando as estrias gordurosas, lesões macroscópicas, e linfócitos T, que produzem citocinas (HANSSON, 2005; O'BRIEN; NGUYEN, 1997; ROSS, 1999; STEINBERG et al., 1989). A atividade inflamatória intensa, acompanhada de material consideravelmente trombogênico, pode culminar na formação de um trombo subjacente, um processo chamado de aterotrombose, responsável por algumas das manifestações clínicas da aterosclerose (XAVIER et al., 2013).

A formação da lesão aterosclerótica é um processo lento, progressivo e pode levar décadas para evoluir em humanos (GOTTLIEB; BONARDI; MORIGUCHI, 2005). Todavia, modelos murinos foram estabelecidos e vem sendo amplamente utilizados. O processo patológico é bastante similar, ocorre em curto período de tempo e os modelos experimentais destacam-se pelo fácil manuseio, reprodução e disponibilidade de linhagens isogênicas (VANDERLAAN; REARDON; GETZ, 2004; VASQUEZ et al., 2012).

Na década de 90, a engenharia genética desenvolveu camundongos admitidos como modelos para estudo de hipercolesterolemia experimental. Ishibashi et al. (1993) reproduziram o fenótipo da hipercolesterolemia familiar, por meio do emprego da técnica de recombinação homóloga em células embrionárias, produzindo camundongos com o gene do receptor de LDL inativado ($LDLr^{-/-}$). A deleção gênica, alelo-específica, gerou camundongos *knockout* com níveis plasmáticos de colesterol duas vezes maior que o observado entre os selvagens ou controles (C57BL/6 – linhagem isogênica *background*), em virtude do aumento das lipoproteínas aterogênicas LDL e

IDL. No entanto, o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas tornou-se mais expressivo quando esses animais foram alimentados com dieta aterogênica, com elevado conteúdo de gordura saturada e colesterol, também chamada de *Western-type* (semelhante à dieta ocidental, com contribuição expressiva de lipídeos).

De acordo com Bergman e Ader (2000), há uma relação expressiva entre distúrbios do metabolismo lipídico e resistência à insulina. Assim, modelos experimentais, com células β -pancreáticas isoladas de camundongos e ilhotas humanas, demonstraram que as LDL oxidadas exercem papel relevante na patogênese da resistência insulínica, prejudicando a sobrevivência e função secretora das células beta (ROEHRICH et al., 2003; RUTTI et al., 2009). No estudo de Bonfleur et al. (2010), camundongos $LDLr^{-/-}$ apresentaram tolerância à glicose e secreção de insulina diminuídas. As ilhotas desses animais eram constituídas de conteúdo expressivo de colesterol e suas mitocôndrias produziam maior quantidade de espécies reativas de oxigênio. Esse estado oxidativo favorece a transição de permeabilidade de membrana, o que culmina em morte celular. A resistência insulínica pode também ser atribuída ao aumento do tecido adiposo visceral, dado pela dieta hiperlipídica (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001; OLIVEIRA et al., 2005).

Dentre as vantagens da utilização desse modelo animal, pode-se citar a semelhança com o fenótipo de hipercolesterolemia familiar humana, que decorre de mutações no gene para o receptor de LDL; à maior parte do colesterol estar confinada na lipoproteína de baixa densidade (LDL), o que torna o perfil lipoprotéico similar ao de humanos e o grau de dislipidemia intermediário com desenvolvimento de lesões menos avançadas em relação aos modelos com ablação gênica para a apolipoproteína E, a qual atua na depuração de quilomícrons e VLDL remanescentes (ZADELAAR et al., 2007).

É importante ressaltar que em camundongos, a fração responsável pelo maior percentual de transporte do colesterol não é a LDL-c, e sim a HDL-c (Lipoproteína de alta densidade), o que explica a resistência dos animais selvagens em desenvolver aterosclerose. Apesar dessa diferença, os camundongos possuem, em linhas gerais, o mesmo conjunto de genes que modulam nosso metabolismo de lipídeos e o perfil lipídico dos animais desenvolvidos com deleção gênica assemelha-se ao observado em humanos, com um deslocamento das lipoproteínas plasmáticas de

HDL-c para VLDL-c, IDL-c e LDL-c (BRESLOW, 1996; JAWIEN; NASTALEK; KORBUT, 2004).

2.9.3 Efeitos de β -glucanas sobre glicemia, perfil lipídico e ateroproteção

Modelos animais de doenças humanas são de grande relevância em estudos que buscam investigar possíveis efeitos terapêuticos de novas entidades químicas como o botriosferana. Associados à essa informação, dados da literatura apontam que β -glucanas são efetivas na prevenção e tratamento de diferentes condições patológicas e suas complicações (KAGIMURA et al., 2015; ZHU, DU, XU, 2016).

Os efeitos biológicos de β -glucanas de cereais como a aveia foram bastante explorados cientificamente e já são regulamentados, geralmente reconhecidas como seguras (GRAS), sendo admitidas como os constituintes predominantes de fibras solúveis com capacidade de modificar indicadores de saúde relacionados a DCDs como diabetes e hipercolesterolemia (LAZARIDOU; BILIADERIS, 2007; LAZARIDOU et al., 2014; US FDA, 1997).

Nesse sentido, Watkins (2004) sugeriu a inserção de β -glucanas, na alimentação, por contribuírem na homeostase do metabolismo de colesterol e glicose, como agente coadjuvante no tratamento da hipercolesterolemia, a qual pode culminar em outras doenças cardiovasculares.

Em leveduras, Waszkiewicz-Robak (2013), mostraram essa atividade pró-saúde quando ofereceram β -glucana, de *Saccharomyces cerevisiae*, a ratos que haviam recebido dieta hiperlipídica. Vetvicka e Vetvickova (2007), no primeiro estudo com indução de hipercolesterolemia por meio de dieta rica em gorduras, com camundongos como modelo experimental, avaliaram a eficácia cardioprotetora de β -glucanas isoladas de cereal, levedura e fungo, e observaram seu efeito hipocolesterolêmico. Já London et al. (2014), analisando o potencial antilipidêmico de β -glucanas produzidas por bactérias, num ensaio envolvendo camundongos jovens, com deleção gênica para a apolipoproteína E, verificaram que aqueles com

dieta aterogênica, na presença desses biopolímeros, apresentaram redução da hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, mas nenhum efeito ateroprotetor, relativo às placas ateroscleróticas.

Como descrito anteriormente, esses biopolímeros também vêm sendo isolados da parede celular ou meio extracelular de fungos. A eficácia de uma β -glucana, extraída do corpo de frutificação de *Volvariella volvacea*, na redução dos níveis de colesterol total e hepático, LDL-c e triglicerídeos plasmáticos de ratos hipercolesterolêmicos foi reportada no estudo de Cheung (1996). Além disso, essa glucana promoveu aumento da excreção de ácidos biliares. Por meio de um modelo experimental semelhante, Yang et al. (2002) também mostraram a atividade hipolipidêmica de um EPS de *Auricularia polytricha*. Num estudo com ratos, de indução de diabetes, polissacarídeos fúngicos foram capazes de diminuir os níveis plasmáticos de glicose, colesterol e triglicerídeos (KIM et al., 2005). Em 2007, Cho et al. demonstraram que EPS extraídos de *Tremella fuciformis* e *Phellinus baumii* apresentaram efeito antihiperглиcêmico e hipotrigliceridêmico com suplementação, por via oral, a camundongos durante cinquenta e dois dias. O exopolissacarídeo isolado de *Stropharia rugosoannulata* também apresentou efeito antihiperглиcêmico em ensaio *in vivo* (ZHAI et al., 2013). Em camundongos jovens, que receberam dieta hiperlipídica, foi observada a atividade hipocolesterolêmica de *Ganoderma lucidum* (RUBEL et al., 2011). Da mesma forma, as atividades antihiperглиcêmica, antihiperlipidêmica e antioxidante de polissacarídeos extraídos de *Catathelasma ventricosum* foram observadas em camundongos, em tratamento de trinta dias, como modelo experimental de diabetes (LIU et al., 2013).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que o botriosferana, na dose de 12mg/kg de peso corpóreo, apresentou atividade hipoglicêmica, durante tratamento de quinze dias, em ensaio de indução de diabetes com ratos adultos e benefícios menos expressivos na hipercolesterolemia de ratos que receberam dieta hiperlipídica (MIRANDA-NANTES et al., 2011).

No entanto, modelos experimentais de doença crônico-degenerativa como a aterosclerose, com animais idosos, explorando o potencial biotecnológico desse exopolissacarídeo (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -D-glucana ainda não foram conduzidos.

Assim como em animais, investigações com humanos também vem mostrando os benefícios da ingestão desses polissacarídeos. Indivíduos hipercolesterolêmicos, com idade entre 27 e 78 anos apresentaram menores níveis plasmáticos de colesterol quando receberam três gramas (g) de glucanas, diariamente, como ingredientes alimentares (WANG et al., 2016). Já entre portadores de *diabetes mellitus* tipo 2, *Pleurotus ostreatus* também foi promissor na diminuição da glicemia e melhorou de forma significativa o perfil lipídico, após ingestão por três meses (AGRAWAL et al., 2010). Crianças e adolescentes, com diagnóstico de hipercolesterolemia familiar, ao inserirem 3g de β -glucanas, na forma de ingrediente de produtos alimentícios e isoladas de *Sacharomyces cerevisiae*, na sua dieta, durante quatro semanas, apresentaram mudança no seu perfil lipídico, com redução nos níveis de colesterol total (22%) e lipoproteína de baixa densidade (28%) (MAKI et al., 2003).

O registro na literatura sobre os efeitos positivos de β -glucanas à saúde é consideravelmente extenso. Todavia, ainda se discute os possíveis mecanismos celulares e moleculares envolvidos.

Esses exopolissacarídeos, quando ingeridos, passam pelo estômago sem sofrer mudanças químicas ou estruturais porque são resistentes a meios ácidos e, no intestino, o potencial hidrogeniônico alcalino favorece a ionização dos grupos hidroxila e sua solubilidade, além de não haver enzimas capazes de degradá-los (BER, 1997). Segundo Castro, Tirapegui e Benedicto (2003), essas biomacromoléculas seriam capazes de interferir na absorção, em nível intestinal, do colesterol e na produção de ácidos biliares. Chema et al. (2016) descreveram que os EPS fúngicos podem atuar como prebióticos e sua fermentação no cólon culminaria na produção de ácidos graxos de cadeia curta, os quais estão envolvidos na regulação hepática de lipídeos. Já o efeito hipoglicemiante estaria relacionado à diminuição nos níveis de transaminases hepática e pancreática, o que aumenta a produção do hormônio insulina (KIM et al., 2001; VETVICKA; VETVICKOVA, 2007). El Khoury et al. (2012) também reportaram os efeitos sobre a redução de parâmetros bioquímicos como colesterol e glicose, por β -glucanas, e os associaram à sua habilidade, como fibra solúvel, de aumentar a viscosidade no intestino, com retardo do esvaziamento gástrico, da digestão e absorção. Isso diminui o transporte daqueles compostos até os enterócitos.

Segundo a hipótese de Kahlon e Woodruff (2003), no intestino, esses biopolímeros ligariam-se aos ácidos biliares, o que aumentaria a excreção dos mesmos nas fezes. Esse processo resultaria na diminuição do *pool* de sais biliares (SB) ativos na formação de micelas, etapa importante para a absorção de lipídeos, e interferiria na sua síntese a partir do colesterol no fígado. Dessa forma, tanto o transporte prejudicado de colesterol para a corrente sanguínea, quanto sua mobilização para produção de SB promoveriam redução na sua concentração plasmática. Esses achados foram descritos também por Bobek, Ozdín e Galbav (1998), num ensaio *in vivo*, com indução de hipercolesterolemia.

Fukushima et al. (2000) sugeriram que fibras dietéticas, principalmente, aquelas ricas em β -glucanas, diminuíram o colesterol total sérico por aumentarem os níveis de expressão do RNA mensageiro para o receptor de LDL hepático, em ensaio *in vivo*. Os resultados de Hong, Xun e Wutong (2007) demonstraram que o efeito antidiabético de glucanas, de *Grifola frondosa*, em modelo experimental com camundongos, se deu pela sua influência no aumento da sensibilidade à insulina e redução na resistência da mesma. Em relação à essa suposição, num ensaio *in vivo*, com polissacarídeos de *Ganoderma lucidum*, Xiao et al. (2012) verificaram que o decréscimo nos níveis de glicose plasmática estava associado à redução nos níveis de expressão de enzimas envolvidas com a gliconeogênese e/ou glicogenólise.

Quanto à possível produção de ácidos graxos de cadeia curta por meio de β -glucanas, Russo et al. (2012) comprovaram o efeito prébiotico de um exopolissacarídeo de *Pediococcus parvulus* para três linhagens diferentes de probióticos. Além disso, a presença desse EPS potencializou a adesão de *Lactobacillus plantarum* WCFS1 às células do epitélio intestinal, em ensaio *in vitro*. Um prebiótico é definido como um ingrediente alimentar que não pode ser digerido, mas que estimula o crescimento de microorganismos benéficos à nossa microbiota intestinal (GIBSON et al., 2004). Esses microorganismos podem produzir ácidos graxos de cadeia curta, resultantes da fermentação do prebiótico, os quais acarretam melhora no perfil lipídico por inibirem a atividade da enzima hidroximetilglutaril coenzima redutase e, logo a síntese de colesterol hepático, e/ou a redistribuição do mesmo do plasma para o fígado (PEREIRA; GIBSON, 2002). Especula-se que esses polissacarídeos possam inibir a expressão de transcritos de enzimas lipogênicas, por meio

de receptores celulares e mediadores secundários, o que implicaria na diminuição de VLDL-c circulantes (KAUR, GUPTA, 2002).

Mais recentemente, discute-se a respeito do efeito de β -glucanas no conjunto de sinais e sintomas da Síndrome metabólica, os quais estão relacionados com alterações em parâmetros do metabolismo de lipídeos e glicose. Cloetens et al. (2012) sumariza os últimos trabalhos desenvolvidos com humanos a respeito e mostraram que o aumento da viscosidade do quimo, dado pela ingestão dessas glucanas, no processo digestivo, parece exercer um papel crucial na redução da glicemia. Concluiu-se que a estrutura molecular dessas biomoléculas parece impactar nos níveis de glicose plasmáticos e na resposta à insulina, o que reforça a importância de se conhecer a composição química e estrutural desses polissacarídeos para direcionar seus possíveis efeitos terapêuticos. Legentil et al. (2015) consideraram que o peso molecular, grau de ramificação, solubilidade, conformação tridimensional e a forma como as glucanas interagem com seus receptores são cruciais para que as mesmas possam exercer seus efeitos biológicos. Com relação ao botriosferana, sua cadeia principal é linear, mas com ramificações, o que favorece sua solubilidade. Além disso, sua conformação em tripla hélice possibilita a formação de ligações de hidrogênio intercadeias, o que contribui para a estabilidade da molécula (GIESE et al., 2008).

Não obstante a conjectura de Raa (2015), o qual descreve que a atividade biológica de (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -D-glucanas parece ocorrer, em nível intestinal e seus possíveis efeitos sistêmicos resultarem dessa interação primária, via receptores de membrana e mediadores secundários, a existência de receptores celulares e proteínas ligantes no plasma específicos para β -glucanas em humanos foi descrita por Chan, Chan, Sze (2009) e Ross et al. (1999). Esses receptores têm sido identificados em células do sistema imune, como monócitos, macrófagos, neutrófilos, e nas células do epitélio alveolar, endoteliais e fibroblastos, por meio de estudos *in vitro* (BROWN; GORDON, 2003). Uma pequena quantidade de β -glucanas solúveis é reconhecida, via receptores transmembrana chamados de Dectina-1, nos enterócitos, e capturada por macrófagos (BROWN; GORDON, 2001). Elas são internalizadas e fragmentadas no interior dessas células, com geração de fragmentos menores. Considerando que Yadomae (2000) identificou β -glucanas não degradadas em hepatócitos e no baço, sugere-se que as primeiras ou aqueles fragmentos sejam,

eventualmente, secretados pelos macrófagos, na circulação sanguínea, e reconhecidos, via outros receptores, como colectina placentária-1 (CL-P1), expressos, principalmente, em células endoteliais vasculares. Essa proteína transmembrana tipo II pode também ligar-se às LDLs oxidadas, participando da sua internalização, por endocitose, e por, conseguinte, estar envolvida no processo de aterosclerose (CHAN; CHAN, SZE, 2009; JANG et al., 2014; MORI et al., 2014).

O transporte descrito acima pode fundamentar a suposição de que o efeito cardioprotetor do botriosferana não se restrinja apenas ao trato intestinal, considerando sua atividade na redução de placas ateroscleróticas. Ao ser internalizado pelas células endoteliais, o botriosferana atuaria como um agente antioxidante. Estudos demonstram que antioxidantes podem retardar o desenvolvimento das placas ateroscleróticas em ensaios *in vivo* e sabe-se que a oxidação da LDL-c desempenha papel relevante na aterogênese (JEMAI et al., 2008; KOROU et al., 2010). (WHITMANN et al., 2004; ROSS, 1999). Esse efeito biológico do botriosferana foi reportado por Giese et al. (2015) que mostraram a expressiva capacidade antioxidante e de eliminar espécies reativas de oxigênio desse EPS. Essa seria uma importante estratégia terapêutica no tratamento e prevenção da aterosclerose.

Um outro ponto que merece destaque é a possibilidade de β -glucanas apresentarem efeitos pleiotrópicos. Nesse caso, a atividade de macrófagos, presentes no processo de desenvolvimento da placa aterosclerótica, seria modulada pelo EPS, com produção de menores níveis de óxido nítrico (NO), e, conseqüentemente, peroxinitritos, o que atenuaria o processo inflamatório característico dessa condição patológica (BUTTERY et al., 1996). Macrófagos da região peritoneal de camundongos hipercolesterolêmicos, que receberam β -glucanas de *Ganoderma lucidum* apresentaram menores concentrações de NO (RUBEL et al., 2011). Normalmente, o NO exerce um papel protetor, como antioxidante e vasodilatador, mas em níveis superiores, induzidos por condições patológicas e citocinas, relaciona-se com disfunção endotelial, oxidação de lipoproteínas, hipercolesterolemia e aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento da aterosclerose (NAPOLI; IGNARRO, 2009). Sugere-se que essa atividade imunomodulatória do EPS (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -D-glucana ocorra via receptor-sinalização nuclear para diminuição dos transcritos da enzima sintase do óxido nítrico induzível (iNOS).

Diante do exposto, estudos conduzidos na óptica da segurança toxicológica e quimioproteção, bem como da bioatividade de compostos com propriedade funcional e ou de saúde, como o botriosferana são de suma importância para prover informações necessárias que subsidiem a comprovação da sua efetividade, como um coadjuvante promissor, na forma de ingrediente alimentar ou medicamento, no tratamento e prevenção de doenças. Essas medidas são consideradas prioridade na saúde contemporânea, já que a população idosa vem aumentando seu tempo de vida, mas a esses anos acrescentados foram pouco expressivos os ganhos no tempo de vida saudável, segundo o descrito anteriormente. Aliar estratégias da medicina e genômica personalizada ao desenvolvimento de produtos de fontes naturais com potencial biotecnológico é estabelecer modalidades emergentes de intervenção na saúde, com vistas ao enfrentamento das doenças crônico-degenerativas e da longevidade na prática clínica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo avaliar a frequência de polimorfismos dos genes *FOXO3*, *SOD2*, *APOE* e *SIRT1*, os níveis de estresse oxidativo e da integridade genômica em uma população de longevos da região metropolitana Grande Vitória, ES, bem como avaliar a bioatividade do exopolissacarídeo botriosferana em ensaios com camundongos *Swiss*, jovens e idosos, *C57BL/6* e *LDLr^{-/-}* idosos.

3.2. Objetivos específicos

No estudo com humanos:

- Avaliar a frequência de polimorfismos dos genes *FOXO3* (*rs2802292*), *SOD2* (*rs4880*), *APOE* (*rs429358* e *rs7412*) e *SIRT1* (*rs2273773*) em indivíduos longevos e controles e verificar sua associação com a extensão do tempo de vida e sua importância como possíveis fatores genéticos da longevidade;
- Quantificar malondialdeído no plasma de longevos e controles, para avaliação do nível de peroxidação lipídica;
- Analisar a frequência de danos genômicos em indivíduos longevos e controles, a fim de estimar a integridade do DNA na longevidade;
- Identificar possíveis fatores ambientais e fenótipos relacionados à longevidade, segundo características demográficas e socioeconômicas, estilo de vida, morbidades, dados antropométricos, físicos e bioquímicos.

No estudo com animais:

- Investigar os efeitos quimioprotetivos do botriosferana contra os danos mutagênicos e citotóxicos induzidos pela ciclofosfamida, nas concentrações de 7,5; 15,0 e 30,0mg/kg de peso corpóreo, por meio da análise da frequência de micronúcleos em células de medula óssea de camundongos (*Mus musculus*), machos e fêmeas, jovens e idosos, durante tratamento de trinta e quinze dias, respectivamente;

- Investigar o possível efeito mutagênico do botriosferana, nas concentrações de 7,5; 15,0 e 30,0mg/kg de peso corpóreo, por meio da análise da frequência de micronúcleos em células de sangue periférico de camundongos (*Mus musculus*), machos e fêmeas, jovens e idosos, durante tratamento de trinta e quinze dias, respectivamente;

- Avaliar o efeito do tratamento com o botriosferana, durante quinze dias, na dose de 30mg/kg de peso corpóreo, sobre a concentração plasmática de glicose, triglicerídeos, colesterol total e frações, de camundongos idosos, machos, LDLr *knockout*;

- Verificar o efeito do tratamento com o botriosferana, durante quinze dias, na dose de 30mg/kg de peso corpóreo, sobre a deposição lipídica vascular de camundongos idosos, machos, LDLr *knockout*;

- Avaliar o efeito quimioprotetor do botriosferana contra os danos genotóxicos e citotóxicos espontâneos decorrentes do envelhecimento e da aterosclerose.

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DA TESE

4.1 MANUSCRITO 1

O manuscrito intitulado “*Longevity-associated FOXO3 variant in a Brazilian population*” foi submetido para avaliação ao periódico *The Journals of Gerontology: Biological Sciences*, de acordo com os critérios estipulados pelo Regimento do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.



4.2 MANUSCRITO 2

O manuscrito intitulado “*Botryosphaeran bioactivity in young, aged and LDLr^{-/-} mice: DNA, glycemia, lipoproteins and lipid deposition*” foi submetido para avaliação ao periódico *International Journal of Biological Macromolecules*, de acordo com os critérios estipulados pelo Regimento do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, R.P. et al. Effect of oyster mushroom on glycemia, lipid profile and quality of life in type 2 diabetic patients. **Aust. J. Med. Herbalism**, v. 22, n. 2, p. 50-54, 2010.

AHMAD, A. et al. Beta glucan: a valuable functional ingredient in foods. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v. 52, n. 3, p. 201-212, 2012.

ALCENDOR, R.R. et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. **Circ Res.**, n.100, p.1512–1521, 2007.

AKBARALY, T. et al. Does overall diet in midlife predict future aging phenotypes? A cohort study. **Am J Med**, v. 126, p. 411–419, 2013.

AMBROSONE, C.B. et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants and risk of breast cancer. **Cancer Res.**, v. 59, p. 602-606, 1999.

BELENGUER VAREAA, Á. et al. El estrés oxidativo como predictor de longevidad; estudio de casos y controles **Rev Esp Geriatr Gerontol.**, v. 50, n. 1, p.16–21, 2015.

ANSELMINI, C.V. et al. Association of the FOXO3 locus with extreme longevity in a southern Italian centenarian study. **Rejuvenation Res.**, v. 12, n.2, p. 95-104, apr. 2009.

ANTUNES, M.V. et al. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Rev. Bras. Cienc.**, v.44, n.2, p. 279-287, 2008.

ANTUNES, L.M.G.; ARAUJO, M.C.P. Mutagenicity and antimutagenicity of the main food colorings. **Rev. de Nutr.**, v. 13, n. 2, p. 81-88, 2000.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para a Condução de Estudos não clínicos de Toxicologia e Segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia. Distrito Federal: Brasília, janeiro, 2013a, 48p.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes. Gerência de Produtos Especiais e Gerência Geral de Alimentos. Distrito Federal: Brasília, fevereiro, 2013b, 45p.

ARKING, R. et al. Identical longevity phenotypes are characterized by different patterns of gene expression and oxidative damage. **Exp Gerontol.** , v.35, n.3, p.353-373, may 2000.

ASSMANN, K.E. et al. A Healthy Dietary Pattern at Midlife, Combined with a Regulated Energy Intake, Is Related to Increased Odds for Healthy Aging. **J Nutr.**, v.145, n. 9, p. 2139-45, 2015.

AUGUSTO, O. Radicais Livres como Maus à Vida. In: _____. **Radicais Livres – bons, maus e naturais.** São Paulo: Oficina de Textos - USP, cap. 2, p.38, 2006.

BALTES, P.B; SMITH, J. **Novas fronteiras para o futuro do envelhecimento: da velhice bem sucedida do idoso jovem aos dilemas da Quarta Idade e Terceira Idade.** Serviço Social do Comércio. ST-Gerência de Estudos e Programas da Terceira Idade. Tradução Anita Liberalesso Neri. São Paulo: v.17, n. 36, p.7-31, jun-2006.

BARBOSA, A.M. et al. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→;3;1→6)-beta-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, Botryosphaeria sp. **Carbohydr Res.**, v. 29, n. 338, supp. 16, p. 1691-1698, jul. 2003.

BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; HARDY, G.E.ST. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, Botryosphaeria sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 23, p. 93-96, 1996.

BARZILAI, N.; BARTKE, A. Biological approaches to mechanistically understand the healthy life span extension achieved by calorie restriction and modulation of hormones. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, v.64, n.2, p.187-191, 2009.

BARZILAI, N.; GABRIELY, I. Genetic Studies Reveal the Role of the Endocrine and Metabolic Systems in Aging. **J Clin Endocrinol Metab**, v.95, n.10, p. 4493-4500, oct. 2010.

BARZILAI, N. et al. The critical role of metabolic pathways in aging. **Diabetes**, v. 61, p.1315–1322, 2012.

BARTKE A. Minireview: role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. **Endocrinology**, v.146, n.9, p. 3718-3723, sep. 2005.

BASHARI, M. et al. Separation and characterization of dextran extracted from deteriorated sugarcane. **Int J Biol Macromol.**, v.59, p. 246-254, aug 2013.

BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. **Physiol. Rev**, v.78, p. 547–581, 1998.

BENVIN, A.L. et al. Fluorescent DNA nanotags: supramolecular fluorescent labels based on intercalating dye arrays assembled on nanostructured DNA templates. **J Am Chem Soc.**, v. 129, n. 129, sup. 7, p. 2025-2034, feb. 2007.

BER, L. Yeast-derived β -1,3-glucan: an adjuvant concept. **Am J Natural Med.**, v. 4, p. 21-24, 1997.

BERGMAN, R.N.; ADER, M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 11, p. 351-356, 2000.

BIELSKI, B.H.J.; ARUDI, M.W.; SUTHERLAND, M.W. A study of the reactivity of HO_2/O_2^- with unsaturated fatty acids. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 4759-4761, 1983.

BOBEK, P.; OZDÍN, L.; GALBAV, S. Dose- and time-dependent hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats. **Nutrition**, v. 14, n.3, p. 282-286, 1998.

BOHR, V. Oxidative DNA damage and repair. **Free Radic Biol Méd**, v. 32, p.804–812,2002.

BORCHERS, A.T. et al. Mushrooms, tumors, and immunity. **Proc Soc Exp Biol Med.**, v. 221,p. 281–293.1999.

BRANDI, J., et al. Chemical modification of botryosphaeran: Structural characterization and anticoagulant activity of a water-soluble sulfonated (1→3)(1→6)- β -d-glucan. **J Microbiol Biotechnol**, v. 21, p.1036–1042, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das DCNTs no Brasil. 2011-2022. DASS. Brasília: MS, 2011.148 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 399/GM de 22 de fevereiro de 2006. Divulga o Pacto pela Saúde 2006. Consolidação do SUS e aprova as Diretrizes Operacionais do Referido Pacto. Brasília: MS, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 2.528, de 19 de outubro de 2006. Aprova a Política Nacional de Saúde da Pessoa Idosa. Brasília: MS, 2006b.

BRESCIANI, G. et al. The Ala16Val MnSOD gene polymorphism modulates oxidative response to exercise. **Clin Biochem**. v. 46, p. 335-40, 2013.

BRESLOW, J.L. Mouse models of atherosclerosis. **Science**, v.272, p.685-688, 1996.

BROER, L. et al. GWAS of Longevity in CHARGE Consortium Confirms *APOE* and *FOXO3* Candidacy. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.70, n. 1, p.110–118, jan. 2015.

BROOKS-WILSON, A.R. Genetics of healthy aging and longevity. **Human Genetics**, v.132, n. 12, p. 1323–1338, 2013.

BROWN, G.D.; GORDON, S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. **Nature.**, v. 6, n. 413, supp. 6851, p. 36-37, sep. 2001.

BROWN, G.D.; GORDON, S. Fungal β -glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v.16, p. 311-315, 2003.

BUCHALA, A. J.; LEISOLA, M. Structure of the β -glucan secreted by *Phanerochaete chrysosporium* in continuous culture. **Carbohydr Res.**, v. 165, p. 146-149, 1987.

BUDOVSKY, A. et al. Longevity network: Construction and implications. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.128, p.117–124, 2007.

BUDOVSKY, A. LongevityMap: a database of human genetic variants associated with longevity. **Trends Genet.**, v. 29, n. 10, p. 559-60, oct. 2013.

BURTNER, C.R.; KENNEDY, B.K. Progeria syndromes and ageing: what is the connection? **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 11, n. 8, p. 567-78, aug. 2010.

BUTTERY, L.D. et al. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. **Lab Invest.**, v. 75, n. 1, p. 77-85, jul. 1996.

CAMARANO, A.A.; KANSO, S.; LEITÃO E MELLO, J. Como vive o idoso brasileiro? In: CAMARANO, A.A. **Os Novos Idosos Brasileiros Muito Além Dos 60?**. cap. 1, p. 25-76. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. IPEA. Rio de Janeiro. set. 2004.

CAMARANO, A.A.; KANSO, S.; LEITÃO E MELLO, J. Quão além dos 60 poderão viver os idosos brasileiros? In: CAMARANO, A.A. **Os Novos Idosos Brasileiros Muito Além Dos 60?**. cap. 2, p. 77-106. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. IPEA. Rio de Janeiro. set. 2004.

CASTRO, I.A.; TIRAPEGUI, J.; BENEDICTO, M.L. Effects of diet supplementation with three soluble polysaccharides on serum lipid levels of hypercholesterolemic rats. **Food Chemistry**, v. 80, p. 323-330, 2003.

CASTRILLON, D.H. et al. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor FOXO3. **Science**, v. 301, p. 215–218, 2003.

CATALANO, R.; BRUCKNER, T; SMITH, K.R. Ambient temperature predicts sex ratios and male longevity. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 105, p. 2244–2247, 2008.

CHAN, G.C.; CHAN, W.K.; SZE, DM. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. **J Hematol Oncol.**, v. 10, n. 2: 25, jun. 2009.

CHEMA, B. et al. Structural Characterization, Technological Functionality and Physiological Aspects of Fungal β -D-Glucans: A Review. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v. 56, n.10, p. 1746-1752, jul. 2016.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal beta-(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans. **Mycol Res**, v. 111, p. 635–652, 2007.

CHEUNG, P.C. The hypocholesterolemic effect of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom. **Nutr Res.**, v. 16, p. 1953-1957, 1996.

CHEVANNE, R. et al. Comparative levels of DNA breaks and sensitivity to oxidative stress in aged and senescent human fibroblasts: a distinctive pattern for centenarians. **Biogerontology**, v. 4, p. 97–104, 2003.

CHEVANNE, M. et al. Oxidative DNA damage repair and parp 1 and parp 2 expression in Epstein-Barr virus-immortalized B lymphocyte cells from young subjects, old subjects, and centenarians, **Rejuvenation Res.** v. 10, p.191–204, 2007.

CHIA, R. et al. The origins and uses of mouse outbred stocks. **Nature Genetics**, v. 37, n.11, p. 1181-1186, 2005.

CHO, E.J. et al. Hypoglycemic effects of exopolysaccharides produced by mycelial cultures of two different mushrooms *Tremella fuciformis* and *Phellinus baumii* in ob/ob mice. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.75,n.6, p. 1257-1265, 2007.

CHRISTENSEN, K.; JOHNSON, T.E.; VAUPEL, J.W. The quest for genetic determinants of human longevity: challenges and insights. Review. **Nat Rev Genet.** v. 7, n. 6, p. 436-48, jun. 2006.

CLOETENS, L., et al. Role of dietary beta-glucans in the prevention of the metabolic syndrome. **Nutr Rev.**, v. 70, n. 8, p. 444-58, aug. 2012.

COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principle, Applications and Limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p.249 - 261, 2004.

COLVIN, O.M. An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. **Curr Pharm Des.**, v. 5, p. 555-560, 1999.

CORSARO, M.M. et al. Chemical structure of two phytotoxic exopolysaccharides produced by *Phomopsis foeniculi*. **Carbohydr Res.**, v. 308, n.3-4, p.349-357, jun.1998.

CRUZ, I.B.M. et al. Association among Oxidized LDL Levels, MnSOD, Apolipoprotein and Polymorphisms and Cardiovascular Risk Factors in an South Brazilian Region Population. **Genetics and Molecular Research** (Online), Ribeirão Preto-SP, v. 4, n.4, p. 691-703, 2005.
CRUZ, I.B.M. Genetics of aging and its impact on human longevity: theories and evidences that helps to prevent age-associated diseases. **PAJAR**, v. 2, n.1, p. 3-14, 2014.

CUNHA, M.A.A. et al. Lasiodiplodan, an exocellular (1(6)→d-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **J Ind Microbiol and Biotechnol**, v. 39, p. 1–10, 2012.

CSGMT. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Strain differences in the micronucleus test. **Mutat. Res.**, v. 204, p. 307-316, 1988.

CSGMT. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. **Mutat. Res.**, v. 278, p. 83-98, 1992.

DA CRUZ, I.B.M. et al. Prevalência de obesidade em idosos longevos e sua associação com fatores de risco e morbidades cardiovasculares. **Rev Assoc Méd Brás**, v. 50, n. 2, p.172-7, 2004.

DAS, H.K. Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. **J Biol Chem.**, v. 260, n. 10, p. 6240-7, may 1985.

DATASUS. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. Ministério da Saúde. Informações de Saúde. Disponível em:
<<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defctohtm.exe?sim/cnvobt10uf.def>>. Acesso em 10 mai. 2016.

DATO, S. et al. Exploring the role of genetic variability and lifestyle in oxidative stress response for healthy aging and longevity. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 8, p.16443–16472, 2013.

DAVINELLI, S; WILCOXX, D.C.; SCAPAGNINI, G. Extending healthy ageing: nutrient sensitive pathway and centenarian populat. **Immun Ageing**, v.9, p.9-15, 2012.

DE MAGALHÃES, J.P.; CHURCH, G.M. Analyses of human-chimpanzee orthologous gene pairs to explore evolutionary hypotheses of aging. **Mech Ageing Dev**, v.128, n.5-6, p. 355-64, may-jun. 2007.

DE ONIS, M.; HABICHT, J.P. Anthropometric reference data for international use: recommendations from a World Health Organization Expert Committee. **Am J Clin Nutr.**, v. 64, p.650-658, 1996.

DEELEN, J. et al. Genome-wide association meta-analysis of human longevity identifies a novel locus conferring survival beyond 90 years of age. **Hum Mol Genet.** v. 23, p. 4420-32, 2014.

DEKKER, R.F.; BARBOSA, A.M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme Microb Technol.**, v.2, n.28, sup. 1, p. 81-88, 2001.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.** , v. 15, n. 4, p. 316-328, aug. 2005.

DE ZWART, L.L. et al. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radic Biol Med.** v. 26, n.1-2, p. 202-26, jan.1999.

DI BONA, D. Association between genetic variations in the insulin/insulin-like growth factor (Igf-1) signaling pathway and longevity: a systematic review and meta-analysis. **Curr Vasc Pharmacol.**, v.12, n.5, p. 674-681, 2014.

DIZDAROGLU, M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. **Free Radic. Biol. Med.** v. 10, p. 225-242; 1991.

DO VALLE GOTTLIEB et. al. Longevity and aging in Rio Grande do Sul state: a historical, ethnic and morbi-mortality profile. **Rev Bras Ger e Geront.** (UnATI. Impresso), v. 14, p. 15-28, 2011.

DONG, X.C. et al. Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. **Cell Metab.**,v. 8, p.65-76, 2008.

DONG, Y. et al. SIRT1 is associated with a decrease in acute insulin secretion and a sex specific increase in risk for type 2 diabetes in Pima Indians. **Mol Genet Metab.**, v. 104, n. 4, p. 661-665, dec. 2011.

DUTTA A et al. Predictors of extraordinary survival in the Iowa established populations for epidemiologic study of the elderly: cohort follow-up to "extinction". **J Am Geriatr Soc.** v. 59, n.6, p. 963-71, jun. 2011.2011.

EL KHOURY, D. et al. Beta-glucan: Health benefits in obesity and metabolic syndrome. **J. Nutr. Metab.**, art. no. 851362, 2012.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic. Biol. Med.**, v.11, p.81-128, 1991.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The Comet Assay: A comprehensive review. **Mutat. Res.** v. 339, p. 37-59, 1995.

FALLIN, M.D.; MATTEINI, A. Genetic Epidemiology in Aging Research. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, v.64A, n.1, p.47 – 60, 2009.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis.**, v. 26, n. 1, p.125-32. jan. 2011.

FERGUSON, L.R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutat Res.**, v.307, p. 395-410, 1994.

FIGARSKA, S.M.; VONK, J.M.; BOEZEN, H.M. SIRT1 polymorphism, long-term survival and glucose tolerance in the general population. **PLoS One**, v. 8, n.3, e.58636, 2013.

FLACHSBART, F. et al. Sirtuin 1 (SIRT1) sequence variation is not associated with exceptional human longevity. **Experimental Gerontology**, v. 41, p. 98–102, 2006.

FONTANA L.; KLEIN, S. Aging, Adiposity, and Calorie Restriction. **JAMA**, v. 297, p.986-994, 2007.

FORTNEY, K. et al. Genome-Wide Scan Informed by Age Related Disease Identifies Loci for Exceptional Human Longevity. **PLoS Genet.** v. 11, n. 12, dec. 2015.

FRANCESCHI, C. et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans, **Mech. Ageing Dev.**, v.128, p. 92–105, 2007.

FRANZKE, B. et al. The impact of six months strength training, nutritional supplementation or cognitive training on DNA damage in institutionalised elderly. **Mutagenesis**, v. 30, p.147–153, 2015.

FREITAS, F. et al. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. **Bioresour Technol.**, v. 100, n. 2, p. 859-65. jan. 2009.

FRYE, R.A. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 273, n. 2, p. 793–798, 2000.

FUKUSHIMA, M. et al. Hepatic LDL receptor mRNA in rats is increased by dietary mushroom (*Agaricus bisporus*) fiber and sugar beet fiber. **J. Nutr.**, v. 130, n. 9, p. 2151-2156, 2000.

FUJIKAWA, A.K. et al. Association of ApoE polymorphisms with prevalent hypertension in 1406 older adults: the Bambuí Health Aging Study (BHAS). **Brazil J Med and Biol Res**, v. 41, n. 2, p. 89-94, 2008.

GENTSCHKEW, L. et al. Polymorphisms in the superoxidase dismutase genes reveal no association with human longevity in Germans: a case-control association study.

Biogerontology, v. 14, n.6, p.719-727, dec. 2013.

GIACOMIN, K.C. et al. Projeto Bambuí: um estudo de base populacional da prevalência e dos fatores associados à necessidade de cuidador entre idosos. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 80-91, fev. 2005.

GIBSON, G.R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutr Res Rev.**, v. 17, p. 259-275, 2004.

GIESE, E.C. et al. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other β -D-glucans. **Int J Biol Macromol.** v. 72, p.125-130., jan. 2015.

GOLUBEV, A.G. The other side of metabolism: a review. **Biochemistry**, v.61, p.1443–1460, 1996.

GOTTLIEB, M.G.V.; BONARDI, G.; MORIGUCHI, E.H. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. **Sci Med.**, Porto Alegre: PUCRS, v. 15, n. 3, p. 203-207, jul./set. 2005.

GUTIÉRREZ, A.; PIETRO, A.; MARTÍNEZ, A. T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydr Res.**, v. 281, p. 143-154, 1996.

HACKAM, D.G.; ANAND, S.S. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. **JAMA.**, v. 290, n. 7, p. 932-940, aug. 2003.

HALL, J.A. et al. The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies. **The Journal of Clinical Investigation.**, v. 123, n.3, p. 973-979, 2013.

HALLIWELL, B. Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: the key role of superoxide dismutase. **Cell Biol Int Rep.**, v. 2, n. 2, p.113-28, mar.1978.

HALPERT, B.P. Development of the term “senility” as a medical diagnosis. **Minn Med.**, v. 66, p. 421-424, 1983.

HAN, J. et al. Genetic variation in Sirtuin 1 (SIRT1) is associated with lipid profiles but not with longevity in Ashkenazi Jews. **Transl Res.**, v.165, n. 4, p.480-1, apr. 2015.

HANSSON, G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med.**, v. 352, n.16, p. 1685-1695, apr. 2005.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical radiation chemistry. **J Gerontol.**, v. 11, p. 298-300, 1956.

HARMAN, D. The aging process: major risk factor for disease and death. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.88, p. 5360-5363, 1991.

HAVEMAN-NIES, A.; DE GROOT, L.C.; VAN STRAVEREN, W.A. Dietary quality, lifestyle factors and healthy ageing in Europe: The SENECA study. **Age Ageing**, v. 32, p. 427-434, 2003.

HAYASHI, M. et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutat. Res.**, v. 245, n.4, p. 245-249, dec. 1990.

HEDDLE, J. A. et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat Res.**, v. 123, n.1, p. 61-118, sep.1983.

HERRANZ, D. et al. Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. **Nat Commun.**, p.1-3, apr. 2010.

HERSKIND, A.M. et al. The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900. **Hum Genet.**, v. 97, n.3, p. 319-23, mar. 1996.

HINERFELD, D. et al. Endogenous mitochondrial oxidative stress: neurodegeneration, proteomic analysis, specific respiratory chain defects, and efficacious antioxidant therapy in superoxide dismutase 2 null mice. **J Neurochem.** v. 88, p. 657-667, 2004.

HJELMBORG, JvB. J. et al. Genetic influence on human lifespan and longevity. **Hum Genet.**, v.119, n.3, p. 312-21, apr. 2006.

HODGE, A.M. et al. Dietary patterns as predictors of successful ageing. **J Nutr Health Aging**, v. 18, p. 221-227, 2014.

HOLLEY, A.K. et al. Manganese superoxide dismutase: beyond life and death. **Amino acids.**, v. 42, n.1, p.139-158, 2012.

HONG, L.; XUN, M.; WUTONG, W. Anti-diabetic effect of an beta-glucan from fruit body of maitake (*Grifola frondosa*) on KK-Ay mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 59, n.4, p. 575-582, 2007.

HOOG, N. et al. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. **FEBS Lett**, v.334, p.170-174, 1993.

HOUTHOOFD, K. et al. Extending life-span in *C. elegans*. **Science**, v. 305, p.1238–1239, 2004.

HUMPHREYS, V. et al. Age-related increases in DNA repair and antioxidant protection: a comparison of the Boyd Orr Cohort of elderly subjects with a younger population sample, **Age Ageing**, v. 36, p.521–526, 2007.

HUANG, R.Y. et al. Hydrogen/deuterium exchange and electron-transfer dissociation mass spectrometry determine the interface and dynamics of apolipoprotein E oligomerization. **Biochemistry**, v. 50, p. 9273-9282, 2011.

HYLAND, P. et al. Nonagenarians from the Swedish NONA Immune Study have increased plasma antioxidant capacity and similar levels of DNA damage in peripheral blood mononuclear cells compared to younger control subjects. **Exp. Gerontol.**, v. 37, 465–473, 2002.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeção da população do Brasil, por sexo e idade – 1980-2050. Rio de Janeiro, Brasil, 2008. 93p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Síntese de Indicadores Sociais. Uma análise das condições de vida da população brasileira. Rio de Janeiro, Brasil, 2013a. 266p
 IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Série Relatórios Metodológicos. v.40. Projeções da População – Brasil e Unidades da Federação. Rio de Janeiro, Brasil, 2013b. 41p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estudos e Análises - Informação Demográfica e Socioeconômica número 3. Mudança Demográfica no Brasil no Início do Século XXI. Subsídios para as projeções da população. Rio de Janeiro, Brasil, 2015. 156p.

ISHIBASHI, S. et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **J Clin Invest**. 92, p. 883-893, 1993.

JACOB FILHO, W. Atividade física e envelhecimento saudável. Revista Brasileira de Educação Física Especializada. São Paulo, v.20, p.73-77, suplemento n. 5, set. 2006.

JACOBSEN, R. et al. Increased effect of the ApoE gene on survival at advanced age in healthy and long-lived Danes: two nationwide cohort studies. **Aging Cell**, v. 9, p.1004–1009, 2010.

JANG, S. et al. Scavenger receptor CL-P1 mediates endocytosis by associating with AP-2 μ . **Biochim Biophys Acta.**, n. 1840, supp.11, p. 3226-3237, nov. 2014.

JAWIENÍ, J.; NASTALEK, P.; KORBUT, R. Mouse Models of Experimental Atherosclerosis. **J Physiol Pharmacol.**, v. 55, n.3, p. 503-517, sept. 2004.

JEMAI, H. et al. Lipid-lowering and antioxidant effects of hydroxytyrosol and its triacetylated derivative recovered from olive tree leaves in cholesterol-fed rats. **J Agric Food Chem.**, v. 23, n. 56, supp. 8, p. 2630-2636, apr. 2008.

JOHNSON, T.E. *et al.* Relationship between increased longevity and stress resistance as assessed through gerontogene mutations in *Caenorhabditis elegans*. **Exp. Gerontol.** v. 36, p.1609–1617, 2001.

JOHNSON, T. Genes, phenes, and dreams of immortality: the 2003 Kleemeier Award Lecture. **J Gerontol**, v. 60A, n. 6, p.680–687, 2005.

KADA, T., MORITA, K., INOUE, T. Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. **Mutat Res.**, Amsterdam, v.53, n.3, p.351-353, 1978.

KADAM, S.S.; MOHADIK, K.R.; BOTHARA, K.G. Anti-neoplastic agents. In: LEMKE, T.L. et al (Ed.) **Foye's Principles of med chem.** 6. ed. Bangalori: Nerali Prakashan, v. 1, 2007. p. 141-166.

KAGIMURA, F.Y. et al. Biological activities of derivatized D-glucans: a review. **Int J Biol Macromol.** v.72, p. 588-98, jan. 2015.

KAHLON, T.S.; WOODRUFF, C.L. In vitro Binding of Bile Acids by Rice Bran, Oat Bran, Barley and β -Glucan Enriched Barley. **Cereal Chem.**,v. 80, n.3, p. 260-263, 2003.

KAMIŃSKI, M.M. et al. Mitochondria as oxidative signaling organelles in T-cell activation: physiological role and pathological implications. **Arch Immunol Ther Exp.** (Warsz), v.61, p. 367-384, 2013.

KAPAHI P .; ZID, B. TOR pathway: linking nutrient sensing to life span. **Sci Aging Knowledge Environ.**, v. 36, PE34, sept. 2004.

KATO, D. et al. Antiviral activity of chondroitin sulphate E targeting dengue virus envelope protein. **Antiviral Res**, v. 88, p. 236–243, 2010.

KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **J. Biosci.**, Bangalore, v. 27, p. 703-714, 2002.

KAZIMIROVA, A. et al. Does a vegetarian diet influence genomic stability? **Eur J Nutr.**, v. 43, p.32-38, 2004.

KERBER, R.A. et al. Familial excess longevity in Utah genealogies. **J Gerontol A Biol Sci.** v. 56, n. 3, p.B130–B139, 2001.

KERDILES, YM, et al. Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function. **Immunity**, v. 33, p. 890–904, 2010.

KILIC, U. et al. A Remarkable Age-Related Increase in SIRT1 Protein Expression against Oxidative Stress in Elderly: *SIRT1* Gene Variants and Longevity in Human. **Plos One**, v. 10, n. 3, p.1-19, 2015.

KING, C.M. et al. In vivo antioxidant status, DNA damage, mutation and DNA repair capacity in cultured lymphocytes from healthy 75- to 80-year-old humans, **Mutat. Res.** v. 377, p.137–147, 1997.

KINSELLA, K.; HE, W. An Aging World: 2008. International Population Reports. NATIONAL INSTITUTE ON AGING.U.S. issued: June, 2009.

KIM, D.H. et al. Apreliminary study on the hypoglycemic effect of the exopolysaccharides produced by five different medicinal mushrooms. **J Microbiol Biotechnol.**, v. 11, p. 167-171, 2001.

KIM, Y.W. et al. Anti-diabetic activity of beta-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. **Biotechnol Lett.**, v. 27, n.7, p. 483-487, apr. 2005.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. Review. **Mutat Res.** v. 25, n. 504, p. 137-148, jul. 2002.

KLASS, M.R. A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results. **Mech. Ageing Dev.** 22, 279–286,1983.

KOBAYASHI, H. et al. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun.** , v. 3, p.103–115, 1995.

KOHEN, R.; NYSKA, V. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, methods for their quantification. **Toxicol Pathol.**,v. 30, n. 6, p. 620-650, 2002.

KOROU, L.M. etal. Comparative antilipidemic effect of N-acetylcysteine and sesam oil administration in diet-induced hypercholesterolemic mice. **Lipids Health Dis.**, v. 9, p.23, 2010.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett.**, v. 495, p. 12-15, 2001.

KRCMAR, P. et al. Structure of extracellular polysaccharide produced by lignin-degrading fungus *Phlebia radiata* in liquid culture. **Int J Biol Macromol.**, v.24, n.1, p. 61-64, jan. 1999.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutat. Res.**, n. 455, p. 155-166, 2000.

KUNINGAS, M. et al. SIRT1 Gene, Age-Related Diseases, and Mortality: The Leiden 85-Plus Study. **Journal of Gerontology: biological sciences**, v. 62A, n. 9, p.960–965, 2007.

LABAER, J. So, you want to look for biomarkers (introduction to the special biomarkers issue). **J Proteome Res.**, v. 4, n.4, p.1053-1059, jul.-aug. 2005.

LABAT-ROBERT, J. ; ROBERT, L. Longevity and aging. Role of free radicals and xanthine oxidase. A review. **Pathol Biol (Paris)**., v.62, n.2, p.61-66, apr. 2014.

LAM, E.W. ; FRANCIS, R.E.; PETKOVIC, M. FOXO transcription factors: key regulators of cell fate. **Biochem Soc Trans.**, v. 34, pt. 5, p.722-726, nov. 2006.

LAM, Y.Y.; PETERSON, C.M.; RAVUSSIN, E. Resveratrol vs. calorie restriction: data from rodents to humans. **Exp Gerontol.**, v. 48, n.10, p.1018-24, oct. 2013.

LAZARIDOU, A.; BILIADERIS, C.G. Molecular aspects of cereal beta-glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. **J. Cereal Sci.**, v. 46, p. 101-118, 2007.

LAZARIDOU, A. et al. A micro- and macro-scale approach to probe the dynamics of sol-gel transition in cereal beta-glucan solutions varying in molecular characteristics. **Food Hydrocol.**, v. 39,p. 204–214, 2014.

LEBRAO, M.L.; LAURENTI, R. Saúde, bem-estar e envelhecimento: o estudo SABE no Município de São Paulo. **Rev. Bras. Epidemiol.**, São Paulo, v. 8, n. 2, p.127-141, jun. 2005.

LEE, S.S. et al. DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. **Science**, v. 300, p.644–647, 2003.

LEON, L.R. The use of gene knockout mice in thermoregulation studies. **J Therm Biol.**, v. 30, p. 273-88, 2005.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 868-874, dec. 2000.

LIMA, T.A.S.; MENEZES, T.M.O. Investigando a produção do conhecimento sobre a pessoa idosa longaeva. **Rev Brás Enferm.**, v. 64, n.4, p. 751-758, jul.-ago. 2011.

LIMA E COSTA, M.F. et al. The Bambuí health and ageing study (BHAS): methodological approach and preliminary results of a population-based cohort study of the elderly in Brazil. **Rev Saú Públ**, v.34, n.2, p.126-135, 2000.

LIMA-COSTA, M.F.; VERAS, R. Saúde pública e envelhecimento. **Cad Saúde Pública**, v.19, p.700-701, 2003.

LIN, S.; DEFOSSEZ, P.; GUARENTE, L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Science**, v.289, p.2126-2128, 2000.

LIU, Y. et al. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* in streptozotocin-induced diabetic mice. **Food Chem. Toxicol.**, v.57, p. 39-45, 2013.

LOMBARD, D.B. et al. DNA repair, genome stability, and aging. **Cell.**, v. 120, p. 497-512, 2005.

LONDON, L.E. et al. Exopolysaccharide-producing probiotic Lactobacilli reduce serum cholesterol and modify enteric microbiota in ApoE-deficient mice. **J Nutr.**, v.144, n. 12, p. 1956-1962, dec. 2014.

LUCAS, E.H. et al. Production of oncostatic principles in vivo and in vitro by species of the genus *Calvatia*. **Antibiot Annu**, v. 6, p. 493-496, 1958.

LUSIS, A.J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 14, n. 407 (6801), p. 233-241, sep. 2000.

LUZHNA, L.; KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. **Front Genet.**, v. 4, n.131, p.1-17, jul. 2013 Jul.

MACGREGOR, J.T.; HEDDLE, J.A.; HITE, M.; MARGOLIN, B.H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M.F.; TICE, R.R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutat Res.**, v.189, n. 2, p.103-121, oct. 1987.

MAKI et al. Lipid responses to consumption of a beta-glucan containing ready-to-eat cereal in children and adolescents with mild-to-moderate primary hypercholesterolemia. **Nut. Res.**, v. 23, p. 1527-1535, 2003.

MAHLEY, R.W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. **Science**, v. 240, p. 622-30, 1988.

MAHLEY, R.W.; HUANG, Y.; RALL, S.C. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): questions, quandaries, and paradoxes. **J Lipid Res**, v. 40, p.1933-1949, 1999.

MAHLEY, R.W.; RALL JR, S.C. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 1, p. 507-537, 2000.

MALINI, M. et al. Modulation of gene expression and cell cycle by botryosphaeran, a (1→3)(1→6)-β-d-glucan in human lymphocytes. **Int J Biol Macromol.**, v. 77, p. 214-221, 2015.

MANTOVANI, M.S. et al. β-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutat Res.**, v. 658, n.3, p. 154-161, 2008.

MARNETT, L.J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutat.Res.**,v. 424, p.83–95, 1999.

MARTINICHEN-HERRERO, J.C. Et al. Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically sulfated galactoglucomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*. **Int J Biol Macromol.** v. 35, n. 1-2, p. 97-102, mar. 2005.

MARX, J. Nobel Prize in Physiology or Medicine. Tiny worm takes a star tune. **Science**, v. 288, n. 5593, p. 526, oct. 2002.

MATÉS, J.M.; PÉREZ-GOMES, C.; CASTRO, I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin Biochem.**, v.32, p.595-605, 1999.

MCCAULEY, B.S.; DANG, W. Histone methylation and aging: Lessons learned from model systems. **Biochim et Biophys Acta**, v. 1839, n. 12, p.1454–1462, 2014.

MCGUE, M. et al. Longevity is moderately heritable in a sample of Danish twins born 1870–1880. **J Gerontol.**, v.48, n.6, p. B237–B244, 1993.

MCINTOSH, M.; STONE, B.A.; STANISICH, V.A. Curdlan and other bacterial (1→3)-beta-D-glucans. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 68, p.163–173, 2005.

MECOCCI, P. et al. Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. **Free Radic Biol Med.**, v. 28, p.1243–1248, 2000.

MERCADO-SÁENZ, S. et al. Cellular aging: theories and technological influence. **Braz Arch Biol Technol.**, v. 53, n. 6, p.1319-1332, 2010.

MICHAN, S.; SINCLAIR, D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. **Biochem J.**, v. 404, p.1–13, 2007.

MIRANDA, C.C. et al. Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Int J Biol Macromol.**, v. 1, n. 42, sup. 2, p.172-177, mar. 2008.

MIRANDA-NANTES, C.C. et al. Hypoglycemic and hypocholesterolemic Effects of Botryosphaeran form *Botryosphaeria* MAMB-05 in Diabetes-Induced and Hypoerlipidemia conditions in Rats. **Mycobiology**, v. 39, n.3, p. 187-193, sep. 2011.

MITCHELL, B.D. et al. Heritability of life span in the Old Order Amish. **Am J Med Genet.**, v. 102, n. 4, p. 346–352, 2001.

MOREAU, R. et al. Reversal by aminoguanidine of the age-related increase in glycoxidation and lipoxidation in the cardiovascular system of Fischer 344 rats. **Biochem.Pharmacol.**, v.69, p.29–40, 2005.

MORI, K. et al. Scavenger receptor CL-P1 mainly utilizes a collagen-like domain to uptake microbes and modified LDL. **Biochim Biophys Acta.**, n. 1840, supp. 12, p. 3345-56, dec. 2014.

MURPHY, C.T. et al. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 424, p.277–283, 2003.

MUTLU-TURKOGLU, U. et al. Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects. **Clin Biochem.**,v. 36, p. 397-400, 2003.

MURABITO, J.M.; YUAN, R.; LUNETTA, K.L. The Search for Longevity and Healthy Aging Genes: Insights From Epidemiological Studies and Samples of Long-Lived Individuals. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, v. 67A, n. 5, p.470–479, may 2012.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L.J. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. **Arch Pharm Res**, v. 32,n. 8,p.1103–1108, 2009.

NEGRE-SALVAYRE, A. et al. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. **Br. J. Pharmacol.**, v.153, p. 6–20, 2008.

NERI, M. et al. Worldwide interest in the comet assay: a bibliometric study. **Mutagenesis**, v. 30, p. 155–163, 2015.

NEWMAN, A.B.; MURABITO, J.M. The epidemiology of longevity and exceptional survival. **Epidemiol. Rev.**, v. 35, p.181–197, 2013.

NIELSEN, F. et al. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. **Clin Chem.**, v.43, n.7, p.1209-14, jul.1997.

NOGUEIRA, S.L. et al. Distribuição espacial e crescimento da população idosa nas capitais brasileiras 1980 a 2006: estudo ecológico. **Rev. Bras. Estud. Popul.**, v.25, n.1, p.195-198, 2008.

NOGUEIRAS, R., et al. Sirtuin 1 and Sirtuin 3: Physiological Modulators Of Metabolism. **Physiol Rev.**, v. 92, n.3, p.1479–1514, 2012.

NOVAK, M.; VETVICKA, V. Beta-glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. **J Immunotoxicol.**, v.5, n.1, p. 47-57, jan. 2008.

NOVAK, M.; VETVICKA, V. Glucans as biological response modifiers. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.**, v. 9, n. 1, p. 67-75, mar. 2009.

NOZIK-GRAYCK, E.; SULIMAN, H.B.; PIANTADOSI, C.A. Extracellular superoxide dismutase. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 37, n.12, p. 2466-2471, dec. 2005.

O'BRIEN T.; NGUYEN, T.T. Lipids and lipoproteins in women. **Mayo Clin Proc**, v. 72, p. 235-244, 1997.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development Guideline for Genetic Toxicology. Testing of Chemicals: Mammalian erythrocyte micronucleus test. Paris, Guideline 474, 1997. 10 p.

OLIVEIRA, H.C. et al. Oxidative stress in atherosclerosis prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. **FASEB J.**, v. 19, p. 278-280, 2005.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Envelhecimento ativo: uma política de saúde. Tradução Suzana Gontijo. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2005. p.33-44.

OMS. Organização Mundial de Saúde. A glossary of terms for community health care and services for older persons. 2004. Ageing and Health Technical Report, volume 5. p. 42. Disponível em: <<http://www.who.int/>>. Acesso em 20 jan 2015.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Mental health and older adult. Fact sheet N°381. september 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/>>. Acesso em: 15 jan 2015.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.123, p. 291–298, 1984.

PAMPLONA, R. et al. Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycooxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. **J. Biol.Chem.** v. 280, p.21522–21530, 2005.

PALLONI, A.; PINTO-AGUIRRE, O.; PELAEZ, M. Demographic and health conditions of ageing in Latin America and the Caribbean. **Int J Epidemiol**, v. 31, n. 4, p. 762-71, 2002.

PAREDES SALIDO, F.; ROCA FERNÁNDEZ, J. J. Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. **Bioquímica**, v. 21, p. 96-100, 2002.

PEREIRA, D.I.A.; GIBSON, G.R. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. **Critical Rev. Biochem. Molec. Biol.**, v. 37, n. 4, p.259-281, 2002.

PERLS, T.T. et al. Siblings of centenarians live longer. **Lancet.**, v. 23, n. 351(9115), p.1560, may 1998.

PETRAVIĆ-TOMINAC, V. et al. Biological Effects of Yeast β -Glucans. **Agric Conspec Sci.**, v. 75, n.4, p. 149-158, 2010.

PRATICÒ, DOMENICO. Lipid Peroxidation and the Aging Process. Review. **Science of Aging Knowledge Environment.**, p. 1-4, 18, dec. 2002.

POULAIN, M.; PES, G.; SALARIS, L. A Population Where Men Live As Long As Women: Villagrande Strisaili, Sardinia. **J Aging Res.**, article ID 153756, 10 p., 2011.

QUEIROZ, E.A. et al. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of three fungal exocellular β -glucans in MCF-7 breast cancer cells is mediated by oxidative stress, AMP-activated protein kinase (AMPK) and the Forkhead transcription factor, FOXO3a. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 67, p. 14-24, oct. 2015.

RAA, J. Immune modulation by non-digestible and non-absorbable beta-1,3/1,6-glucan. **Microb Ecol Health Dis.**, v. 29, n. 26: 27824, may 2015.

RAJPATHAK, S.N. et. al. Lifestyle Factors of People With Exceptional Longevity. **J Am Geriatr Soc.**, v. 59, n.8, p. 1509–1512, 2011.

RAMESH, H.P.; THARANATHAN, R.N. Carbohydrates the renewable raw materials of high biotechnological value. **Crit Rev Biotechnol.**, v. 23, n.2, p.149-73, 2003.

RIBARIC, S. Diet and Aging. Review. **Oxid Med Cell Longev.**, v. 2012, 741468, p.1-20, 2012.

RIBEIRO, S.M.L.; CAMPOS, P.; TIRAPEGUI, J. O rato como animal de laboratório: histórico, dados biológicos e análise crítica de seu uso. **Rev Farm Bioquím Univ São Paulo**, v. 31, n. 1, p. 21-28, 1995.

RICHARDSON, A. et al. Measures of Healthspan as Indices of Aging in Mice- A Recommendation. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, v. 71, n. 4, p. 427-430, apr. 2016.

ROEHRICH, M.E. et al. Insulin-secreting beta-cell dysfunction induced by human lipoproteins. **J Biol Chem.**, v. 278, p.18368-18375, 2003.

ROSADO, F.R. et al. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* SING., and *Pleurotus ostreatus* "florida" (JACK.: FR.) KUMMER. **J. Basic Microbiol.**, v. 43, p. 230-237, 2003.

ROSS, R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. **N Engl J Med.**, v. 340, n.2, p. 115-126, jan.1999.

ROSS, G. D., et al. Therapeutic intervention with complement and β -glucan in cancer. **Immunopharmacology**, v. 42, p. 61-74, 1999.

RUBEL, R. et al. Hypolipidemic and antioxidant properties of *Ganoderma lucidum* (Leyss:Fr) Karst used as a dietary supplement. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 27, n. 5, p. 1083-1089, 2011.

RUSSO, P. et al. Beta-Glucans Improve Growth, Viability and Colonization of Probiotic Microorganisms. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, p.6026-6039, 2012.

RÜTTI, S. et al. Low- and high-density lipoproteins modulate function, apoptosis, and proliferation of primary human and murine pancreatic betacells. **Endocrinology**, v. 150, p. 4521-4530, 2009.

SAITO, H. et al. Effects of polymorphism on the lipid interaction of human apolipoprotein E. **J Biol Chem.**, v. 278, p. 40723-40729, 2003.

SANTOS, B.F. Modelo Animal. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002a. cap. 2. p. 23-24.

SANTOS, B.F. Criação e manejo de camundongos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002b. cap. 14. p. 115-118.

SAWANT, S.G.; FIELDEN, M.R.; BLACK, K.A. Evaluation of genotoxicity testing of FDA approved large molecule therapeutics **Regul Toxicol Pharmacol.**, v. 70, n.1, p. 87-97, oct. 2014.

SCHLEGEL, R.; MACGREGOR, J.T. The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: detection of chronic chromosome breakage in mice. **Mutat Res.**, v.104, n.6, p. 367-369, jul. 1982.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutat Res.**, v.31, n.1, p.9-15, feb. 1975.

SCHUMACHER, B.; GARINIS, G.A.; HOEIJMAKERS, J.H. Age to survive: DNA damage and aging. **Trends Genet.**, v. 24, p. 77-85, 2008.

SCHUPF, N. et al. Apolipoprotein E and familial longevity. **Neurobiol. Aging**, v. 34, p.1287-1291, 2012.

SCHWANKE, C.H.A. et al. Análise da associação entre polimorfismo do gene da apolipoproteína E e fatores de risco cardiovasculares em idosos longevos. **Arq Bras Cardiol**, v. 78, n.6, p. 561-579, jun. 2002.

SEARS, D.A.; UDDEN, M.M. Howell–Jolly bodies: a brief historical review. **Am.J.Med. Sci.** 343, 407–409, 2011.

SEBASTIANI, P.; PERLS, T.T. The genetics of extreme longevity: lessons from the New England Centenarian Study. **Front Genet.**, v. 3, p.277, 2012.

SEBASTIANI, P. et al. Meta-analysis of genetic variants associated with human exceptional longevity. **Ageing**, v. 5, p. 653–661, 2013.

SEDELNIKOVA, O.A. et al. DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models. **Cancer Res.**, v. 67, n. 9, p. 4295-4302, may 2007.

SELBMANN, L. et al. Production and structural characterisation of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. **Res Microbiol.**, v.153, p. 585–592, 2002.

SELBMANN, L.; STINGELE, F.; PETRUCCIOLI, M. Exopolysaccharide production by filamentous fungi: the example of *Botryosphaeria rhodina*. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v. 84, n. 2, p.135-45, 2003.

SHAH, V. et al. Characterization of the extracellular polysaccharide produced by a marine cyanobacterium, *Cyanothece* sp. ATCC 51142, and its exploitation toward metal removal from solutions. **Curr Microbiol.**, v.40, n.4, p. 274-278, apr. 2000.

SHIMODA-MATSUBAYASHI, S. et al. Structural Dimorphism in the Mitochondrial Targeting Sequence in the Human Manganese Superoxide Dismutase Gene. A Predictive Evidence for Conformational Change to Influence Mitochondrial Transport and a Study of Allelic Association in Parkinson's Disease. **Biochem. Biophys. Res Commun.** v. 226, p. 561-5, 1996.

SILVA, M. de L. C. da et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Quím. Nova**, v. 29, n.1, p. 85-92, 2006.

SIMM, ANDREAS; KLOTZ, LARS-OLIVER. Stress and biological aging - A double-edged sword. **Z Gerontol Geriat**, v. 48, p. 505-510, 2015.

SIMMONS, D. Epigenetic Influences and Disease. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p.6, 2008.

SINGH, N.P. et al. Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. **Exp Cell Res.**, v. 184, n. 2, p. 461-70, oct. 1989.

SMITH, J.S. et al. A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 97, p. 6658-6663, 2000.

SOARES, J.P. et al. Aging and DNA damage in humans: a meta-analysis study. **Aging** (Albany NY), v.6, n.6, p. 432-9, jun. 2014.

SOERENSEN, M. et al. The Mn superoxide dismutase single nucleotide polymorphism rs4880 and the glutathione peroxidase 1 single nucleotide polymorphism rs1050450 are associated with aging and longevity in the oldest old. **Mech Ageing Dev.**, v. 130, n.5, p. 308-314, may 2009.

SOERENSEN, M. et al. Replication of an association of variation in the FOXO3 gene with human longevity using both case-control and longitudinal data. **Aging Cell.**, v. 9, n.6, p. 1010-1017, dec. 2010.

SOERENSEN, M. et al. Evidence from case-control and longitudinal studies supports associations of genetic variation in *APOE*, *CETP*, and *IL6* with human longevity. **Age**, v. 35, n. 2, p.487-500, 2013.

SOERENSEN, M. et al. Association study of FOXO3 SNPs and aging phenotypes in Danish oldest-old individuals. **Aging Cell.**, v. 14, n.1, p. 60-66, feb. 2015.

SOHAL, R.S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science**, v. 273, n. 5271, p. 59–63, 1996.

SOLTANIAN, S. et al. Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. **Crit Rev Microbiol.**, v.35, n.2, p.109-38. 2009.

SPATAREANU, A. et al. Synthesis, characterization and solution behaviour of oxidized pullulan. **Carbohydr Polym.**v.13, n. 111, p. 63-71, oct. 2014.

STEGHENS, J.P. et al. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. **Free Radic Biol Med.**, v.1, n.2, p. 242-249, jul. 2001.

STEINBERG, D. et al. Beyond cholesterol modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **NEJM.**, v. 320, p. 915-924, 1989.

STELUTI, R.M. et al. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **J Basic Microbiol.**, v. 44, n. 6, p. 480-486, 2004.

STESSMAN, J. et al. Candidate genes associated with ageing and life expectancy in the Jerusalem longitudinal study. **Mech Ageing Dev.**, v. 126, n.2, p. 333-339, feb. 2005.

SUN, J. et al. Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster*. **Genetics.**, v. 161, n.2, p. 661-672, 2002.

SURENJAV, U. et al. Effects of molecular structure on antitumor activities of (1→3)- β -D-glucans from different *Lentinus Edodes*. **Carbohydr. Polym.**, v. 63, p. 97–104, 2006.

SUTTON, A. et al. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. **Pharmacogenet. Genomics**, v. 15, p. 311-319, 2005.

SWINDELL, W.R. et al. Study Of Osteoporotic Fractures Research Group. Indicators of "healthy aging" in older women (65-69 years of age). A data-mining approach based on prediction of long-term survival. **BMC Geriatr.**, v. 10, n.55, p. 1-24, aug. 2010.

SYNYTSYA, A.; NOVÁK, M. Structural diversity of fungal glucans. Review. **Carbohydr Polym.**, v. 92, 792– 809, 2013.

TAUFER, M. et al. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, v. 60, n.4, p. 432-438, apr. 2005.

TERRY, D.F. et al. Cardiovascular risk factors predictive for survival and morbidity-free survival in the oldest-old Framingham Heart Study participants. **J Am Geriatr Soc.**, v. 53, n.11, p. 1944-1950, 2005.

TIAN, C. ; FANG, S. ; DU, X. ; JIA, C. Association of the C47T polymorphism in SOD2 with diabetes mellitus and diabetic microvascular complications: a meta-analysis. **Diabetologia.**, v. 54, n. 4, p. 803-811, apr. 2011.

TICE, R.R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen.**, v. 35, n.3, p. 206-221, 2000.

TINDALE, L.C. et al.. Rare and common variants in the Apolipoprotein E gene in healthy oldest old. **Neurobiol Aging.**, v. 35, n.3, p.727.e1-e3, mar. 2014.

TRAN, H. et al. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3 through the Gadd45 protein. **Science**, v. 296, n. 5567, p. 530–534, 2002.

TWEATS, D.J.; et al. Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory *in vivo* tests I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards. **Mutat. Res.**, v. 627, p. 78–91, 2007.

TZIVION, G.; DOBSON, M.; RAMAKRISHNAN, G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1813, n. 11, p. 1938-1945, nov. 2011.

UCHIDA, K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 28, p.1685–1696, 2000.

US FDA. US Food & Drug Administration. Food Labeling: health claims; soluble dietary fiber from certain foods and coronary heart disease. Federal Register, 67, 61773e61783,1997.

VALADARES, M.O.; VIANNA, L.G.; MORAES, C.F. A temática do envelhecimento humano nos grupos de pesquisa do Brasil. **Revista Kairós Gerontologia**, v.16, n. 2, p. 117-128, mar. 2013.

VANDERLAAN, A.P.; REARDON, A.C.; GETZ, S.G. Site specificity of atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 24, p.12-22, jan. 2004.

VASCONCELOS, A. F. et al. Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan (lasiodiplodan). **Carbohydr Polym.**, v.15, n. 92, sup. 2, p.1908-1914, feb. 2013.

VASQUEZ, E.C. et al. Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. **J Biomed Sci.**, v. 13, p.19-22, 2012.

VETVICKA, V.; VETVICKOVA, Physiological effects of different types of beta-glucan. **J. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.**, v. 151, n.2, p. 225-231, dec. 2007.

VON BORSTEL, R.C.; DRAKE, J.W.; LOEB, L.A. Foreword. **Mutat Res/Fund Mol Mech Mutag.**, v. 350, n.1, p.1-3, 1996.

WANG, J. et al. Sulfated modification, characterization and structure-antioxidant relationships of Artemisia sphaerocephala polysaccharides. **Carbohydr Polym**, v. 81, p. 897-905, 2010.

WANG, Y. et al. High-molecular-weight β -glucan decreases serum cholesterol differentially based on the CYP7A1 rs3808607 polymorphism in mildly hypercholesterolemic adults. **J Nutr.**, v. 146, n.4, p. 720-727, apr. 2016.

WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 60, n.3, p. 258-274, nov. 2002.

WATERS, M.D. et al. Activity profiles of antimutagens: in vitro and in vivo data. **Mutat Res.**, v.350, n.1, p.109-129.

WENG, B.B. et al. Toxicological and immunomodulatory assessments of botryosphaeran (β -glucan) produced by Botryosphaeria rhodina RCYU 30101. **Food Chem Toxicol.**, v. 49, n. 4, p. 910-916. apr. 2011.

WHEELER, H.E.; KIM, S.K. Genetics and genomics of human ageing. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 366, n. 1561, p. 43-50, jan. 2011.

WHITMAN, S.C. A practical approach to using mice in atherosclerosis research. **Clin. Biochem. Rev.**, v. 25, p. 81-93, 2004.

WHO. World Health Organization. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. 2011. Disponível em:
<http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/en>. Acesso em: 10 mai. 2016.

WILLCOX, B.J. et al. Midlife risk factors and healthy survival in men. **JAMA**, v. 296, p. 2343-2350, 2006.

WILLCOX, B.J. et al. FOXO3 is strongly associated with human longevity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.105, p.13987–13992, 2008.

WILLIAMS, D.L.; DI LUZIO, N.R. Glucan-induced modification of murine viral hepatitis. **Science**, v. 208, p. 67–69, 1980.

WILSON, D.M.; BOHR, V.A.; MCKINNON, P.J. DNA damage, DNA repair, ageing and age-related disease. **Mech Ageing Dev.**, v. 129, n. 7-8, p. 349-52, jul.-aug. 2008.

XAVIER, H.T. et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.101, n.4, sup.1, out. 2013.

XIAO, C. et al. Hypoglycemic effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in type 2 diabetic mice. **Archives of Pharmacol Res.**, v.35, n. 10, p. 1791-1801, 2012.

YADOMAE, T. Structure and biological activities of fungal beta-1,3-glucans. **Yakugaku Zasshi.**, v. 120, p. 413–431, 2000.

YAGI, K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. **Biochem. Med.**, v.15, p. 212-216, 1976.

YANG, B.K. et al. Hypolipidemic effect of an exo-biopolymer produced from submerged mycelial culture of *Auricularia polytricha* in rats. **Biotechnol Lett.**, v. 24, p. 1319-1325, 2002.

ZADELAAR, S. et al. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n.8, p.1706-1721, 2007.

ZELKO, I.N.; MARIANI, T.J.; FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radic Biol Med.**, v.1, n.33, p. 337-349, aug. 2002.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recent research. **Carbohydr Polym.**, v.6, n. 90, supp.4, p. 1395-1410, nov. 2012.

Zhai X, Zhao A, Geng L, Xu C. Fermentation characteristics and hypoglycemic activity of an exopolysaccharide produced by submerged culture of *Stropharia rugosoannulata* #2. **Ann Microbiol.**, v. 63, n. 3, p. 1013-1020, sept. 2013.

ZHONG, N.; WEISGRABER, K.H. Understanding the association of apolipoprotein E4 with Alzheimer disease: clues from its structure. **J Biol Chem.**, v. 284, p. 6027-6031, 2009.

ZHONG, L. et al. A rapid and cost-effective method for genotyping apolipoprotein E gene polymorphism. **Mol Neurodegener**, v.11, n.2, p. 1-8, 2016.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. Review. **Food Hydrocol.**, v.52, p. 275-288, 2016.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP)

← → C aplicação.saude.gov.br/plataformabrasil/visao/pesquisador/gerirPesquisa/detalharPesquisa.jsf

Saúde
Ministério da Saúde

Plataforma Brasil

principal central de suporte sair

Público Pesquisador Alterar Meus Dados

FLAVIA DE PAULA - Pesquisador | V2.20

Cadastros Sua sessão expira em: 38min 02

Você está em: Pesquisador > Gerir Pesquisa

GERIR PESQUISA

Para cadastrar um novo projeto, clique aqui: [Nova Submissão](#) Para cadastrar projetos aprovados anteriores à Plataforma Brasil, clique aqui: [Projeto anterior](#)

Projetos de Pesquisa:

Título da Pesquisa: Número CAAE:

Pesquisador Responsável: Última Modificação: Tipo de Submissão:

Palavra-chave:

Situação da Pesquisa

- Marcar Todas
- Aguardando para Tramitar
- Aprovado
- Em apreciação Ética
- Em Edição
- Em Recepção e Validação Documental
- Não Aprovado - Não Cabe Recurso
- Não Aprovado na CONEP
- Não Aprovado no CEP
- Pendência Documental Emitida pela CONEP
- Pendência Documental Emitida pelo CEP
- Pendência Emitida pela CONEP
- Pendência Emitida pelo CEP
- Recurso Não Aprovado no CEP
- Recurso Submetido ao CEP
- Recurso Submetido à CONEP
- Retirado
- Retirado pelo Centro Coordenador

Buscar Projeto de Pesquisa Limpar

← → C aplicação.saude.gov.br/plataformabrasil/visao/pesquisador/gerirPesquisa/detalharPesquisa.jsf

Para cadastrar um novo projeto, clique aqui: [Nova Submissão](#) Para cadastrar projetos aprovados anteriores à Plataforma Brasil, clique aqui: [Projeto anterior](#)

Projetos de Pesquisa:

Título da Pesquisa: Número CAAE:

Pesquisador Responsável: Última Modificação: Tipo de Submissão:

Palavra-chave:

Situação da Pesquisa

- Marcar Todas
- Aguardando para Tramitar
- Aprovado
- Em apreciação Ética
- Em Edição
- Em Recepção e Validação Documental
- Não Aprovado - Não Cabe Recurso
- Não Aprovado na CONEP
- Não Aprovado no CEP
- Pendência Documental Emitida pela CONEP
- Pendência Documental Emitida pelo CEP
- Pendência Emitida pela CONEP
- Pendência Emitida pelo CEP
- Recurso Não Aprovado no CEP
- Recurso Submetido ao CEP
- Recurso Submetido à CONEP
- Retirado
- Retirado pelo Centro Coordenador

Buscar Projeto de Pesquisa Limpar

Projeto de Pesquisa:

Tipo	Número CAAE	Título da Pesquisa	Pesquisador Responsável	Versão	Última Modificação	Situação	Gestão da Pesquisa
P	14815413.1.0000.5060	Identificação de biomarcadores genéticos da longevidade humana e avaliação da atividade de(...)	FLAVIA DE PAULA	1	24/05/2013	Aprovado	

Este sistema foi desenvolvido para os navegadores Internet Explorer (versão 7 ou superior), ou Mozilla Firefox (versão 9 ou superior).

Comitê Nacional de Saúde SUS Ministério da Saúde

ANEXO B – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA)



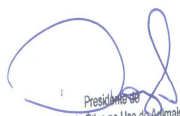
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 017/2013, relativo ao projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da atividade de biopolímero no envelhecimento por meio de ensaios in vivo.**", que tem como responsável o (a) docente **Maria do Carmo Pimentel Batitucci**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 07/06/13.

Vitória (ES), 05 de julho de 2013.


Presidente do
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA/UFES
Prof. Dr. Douglas Severo Siqueira
CRM/ES 0880/Medicina 015466/10
Presidente CEUA-UFES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

I. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

Título: Identificação de biomarcadores da longevidade humana e avaliação da atividade de biopolímero no envelhecimento

Descrição: Nas últimas décadas, observou-se um crescimento da população idosa. As pessoas estão chegando aos 90 anos ou mais, saudáveis ou com doenças como diabetes, hipertensão arterial, obesidade, que acometem as articulações, a memória. Pessoas que vivem mais anos, chamadas de longevas, podem ter esse fator associado a causas ambientais (dieta, prática de exercício físico, poluição ambiental) ou genéticas (características herdadas dos pais). Nossa pesquisa, com duração prevista de 8 anos, pretende estudar as causas da longevidade humana. Será necessária a coleta de 20ml de sangue daqueles indivíduos que concordarem em participar da pesquisa. O (a) senhor (a) não é obrigado (a) a participar desse estudo, pois sua participação é voluntária. Contudo, caso possa participar, será muito importante, pois os resultados gerados a partir dessa pesquisa podem dar informações que auxiliem no desenvolvimento de estratégias que busquem melhorar a qualidade de vida das pessoas. Quem quiser participar dessa pesquisa, precisa preencher e assinar esse termo de consentimento.

Avaliação do risco da pesquisa:

sem risco risco mínimo risco médio risco maior

O risco mínimo refere-se à eventual possibilidade de roxo ou vermelhidão e/ou dor mínima no local da coleta de sangue.

II. DIREITOS E GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

O (a) senhor (a) não é obrigado (a) a participar da pesquisa. As pessoas que quiserem participar têm acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive podem fazer perguntas para esclarecer dúvidas. O (a) senhor (a) pode retirar seu consentimento a qualquer momento e a não adesão a esse projeto de pesquisa não implicará em prejuízo de qualquer natureza. Asseguramos que as amostras de seu DNA não serão utilizadas para fins de direito civil e penal (investigação criminal ou identificação humana para paternidade e maternidade), mas apenas para os fins descritos no presente protocolo de pesquisa. Não haverá ônus (gastos) para os participantes da pesquisa. Os resultados dessa pesquisa serão divulgados na comunidade científica. Contudo, a identidade dos participantes não será revelada, garantindo a confidencialidade, sigilo e privacidade do participante. Não estão previstas formas de ressarcimento ou indenizações durante a pesquisa.

III. INFORMAÇÕES SOBRE OS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA:

Profa. Flávia de Paula e GERALDA Gillian Silva Sena – aluna do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – UFES. Endereço: Laboratório de Genética Humana e Molecular (LGHM), Departamento de Ciências Biológicas, CCHN/UFES. Av. Marechal Campos, 1468, Campus de Maruípe, Vitória, ES. CEP: 29040-090, Telefone: (27) 3335-7251.

IV. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

NOME:.....Telefone:.....

Data nascimento:...../...../..... Idade:Sexo:M () F ()

Endereço:.....

Etnia/Raça:.....Escolaridade:.....

Responsável legal (se necessário):

NOME:.....Idade:.....

Grau de Parentesco:.....Telefone:

V. CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, sem que tenha sido forçado ou obrigado, consinto em participar do presente protocolo de pesquisa.

() Desejo conhecer os resultados dessa pesquisa.

() Não desejo conhecer os resultados dessa pesquisa.

Local e data:.....,/...../.....

Assinatura do participante ou responsável legal

.....

Assinatura do pesquisador responsável:

.....

Em caso de dúvidas, entre em contato com a professora responsável pela pesquisa, Flávia de Paula (telefone: 3335-7251) e para reclamações, com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Espírito Santo (telefone: 3335-7211).
Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa: Av. Marechal Campos, 1468, Campus de Maruípe, Prédio da Administração – UFES, Cep. 29040-090, Vitória, ES.

**Em duas vias: Via do Participante
 Via do Pesquisador**

APÊNDICE B – Questionário de Saúde Pessoal

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

PROJETO: Identificação de biomarcadores da longevidade humana e avaliação da atividade de biopolímero no envelhecimentoQuestionário de Saúde Pessoal**1. IDENTIFICAÇÃO, DADOS BIOQUÍMICOS E ANTROPOMÉTRICOS, SÓCIOECONÔMICOS, COMPOSIÇÃO FAMILIAR****1.1 IDENTIFICAÇÃO**

Data: ____/____/____ 3. Tel.: _____

1. Nome: _____

2. Endereço: _____

4. Data de nascimento: ____/____/____ 5. Idade: _____ 6. Sexo: () M () F

7. Etnia/Raça(origem):

() Caucasiano

Descendência familiar:

() Negro

() Oriental

() Indígena

() Outro. Qual? _____

8. Estado civil:

Solteiro() Casado() Separado() Divorciado() Viúvo() Não informado()

9. Pressão arterial no ato da consulta: PAD ____mmHg PAS ____mmHg

1.2 DADOS BIOQUÍMICOS (PRONTUÁRIO)

10. Colesterol Total: _____ 13. Triglicerídeos: _____

11. HDL-c: _____ 14. Glicose: _____

12. LDL-c: _____

1.3 DADOS ANTROPOMÉTRICOS: 15. Peso: _____ 16. Altura: _____

17. Circunferência Cintura: _____ 18. Circunferência Quadril: _____

1.4 DADOS SOCIOECONÔMICOS E COMPOSIÇÃO FAMILIAR:

19. Qual é a renda mensal de sua família? _____ salários

20. Tem convênio saúde (Plano de saúde)?

() Sim. Qual? _____

() Não

21. Escolaridade: _____

22. Moradia: () Própria () Alugada () Mora com outro(s)

23. Número de filhos (natural e não adotados/criação): _____

24. Número de filhos vivos: _____

25. Com quem vive? () Cônjuge () Parentes () Outros _____

26. Convivência com a família: () sim () não

2. MEDICAMENTOS E DOENÇAS

27. O (a) senhor (a) toma algum medicamento?

() Sim. Qual (is)? _____

() Não

28. O (a) senhor (a) toma algum medicamento não prescrito por médico?

() Sim. Qual (is)? _____

() Não

29. O (a) senhor (a) fez uso de vitaminas nos últimos seis meses?

() Sim. Qual (is)? _____

() Não

30. O (a) senhor (a) tem ou teve alguma dessas doenças?

() Câncer

() Osteoporose

() Reumatológicas

() Doença cardiovascular*

() Hipertensão

() Diabetes

() Asma/bronquite

() AIDS

() Neurodegenerativas

Outras doenças _____

* angina, Insuficiência cardíaca congestiva, doença circulatória periférica, AVC, IAM.

31. O (a) senhor (a) já se submeteu a alguma cirurgia?

() Sim. Qual (is)? _____

() Não

31.1. O (a) senhor (a) recebeu vacinação nos últimos 12 meses? Qual (is)? _____

32. O (a) senhor (a) precisou de fazer algum procedimento com Raios-X nos últimos seis meses?

() Sim. Qual (is)? _____

() Não

3. HÁBITO ALIMENTAR E ESTILO DE VIDA

Com relação à sua alimentação diária:

33. O (a) senhor (a) come 5 porções diárias de hortaliças e legumes?

() Sim () Não

34. O (a) senhor (a) come 5 porções diárias de frutas?

() Sim () Não

35. O (a) senhor (a) come arroz diariamente?

() Sim () Não

36. O (a) senhor (a) come carne?

() Sim () Não

37. sim, qual é a frequência?

	Dias/semana			
	1-2	3-4	5-6	Todos os dias
Bovina	()	()	()	()
Suína	()	()	()	()
Peixe	()	()	()	()
Aves	()	()	()	()
Outras	()	()	()	()

38. Com qual frequência o (a) senhor (a) consome alimentos fritos? _____

39. Com qual frequência o (a) senhor (a) consome carnes processadas e embutidos? _____

40. Com qual frequência o (a) senhor (a) consome doces? _____

41. O (a) senhor (a) consome sal de cozinha? () Sim () Não

Se sim, quantas vezes por dia? _____

42. O (a) senhor (a) usa adoçante? () Sim () Não

Se sim, quanto por dia? _____

43. O (a) senhor (a) toma refrigerante? () Sim () Não

Se sim, quanto por dia? _____

44. O (a) senhor (a) toma café? () Sim () Não

Se sim, quanto por dia? _____

45. O (a) senhor (a) toma chá? () Sim () Não

Se sim, quanto por dia? _____

46. O (a) senhor (a) toma suco? () Sim () Não

Se sim, quanto por dia e se natural ou artificial?

47. Ingere alguma destas bebidas com açúcar? (Questões 44-46)

() sim () não

Se sim, qual(is) e quanto açúcar (em colheres de chá)?

48. Ingere bebida (s) alcoólica(s)? Qual(is) e quanto por semana você ingere?

() não bebo

() cerveja _____ () uísque _____

() vinho _____ () cachaça _____

() outros _____

49. Como o (a) senhor (a) avalia sua alimentação ao longo da vida?

50. Quanto ao tabagismo:

() nunca fumou

() ex-fumante, Idade de início: _____ Idade que parou: _____

() Fuma, Média de cigarros por dia: _____ /dia

51.1 Familiares fumam?

() Sim () Não

Quais? () filhos () irmãos

52. Com qual frequência o (a) senhor (a) pratica exercício físico? _____

4. HISTÓRIA GENÉTICA

53. O (a) senhor (a) tem algum familiar que nasceu com alguma doença hereditária?

() Sim () Não

Se sim, qual? _____

54. O (a) senhor (a) teve algum filho que nasceu com algum defeito genético ou alguma doença hereditária?

() Sim () Não

Se sim, qual? _____

55. Houve aborto?

() Sim () Não

5. CAPACIDADE FUNCIONAL

Os seguintes itens são sobre atividades que você poderia fazer atualmente durante um dia comum. Devido à sua saúde, você teria dificuldade para fazer estas atividades?

Atividades	Sim, dificulta muito	Sim, dificulta um pouco	Não, não dificulta de modo algum
56) Atividades Rigorosas, que exigem muito esforço, tais como correr, levantar objetos pesados, participar em esportes árduos.	1	2	3
57) Atividades moderadas, tais como mover uma mesa, passar aspirador de pó, jogar bola, varrer a casa.	1	2	3
58) Levantar ou carregar mantimentos	1	2	3
59) Subir vários lances de escada	1	2	3
60) Subir um lance de escada	1	2	3
61) Curvar-se, ajoelhar-se ou dobrar-se	1	2	3
62) Andar mais de 1 quilômetro	1	2	3
63) Andar vários quarteirões	1	2	3
64) Andar um quarteirão	1	2	3
65) Tomar banho ou vestir-se	1	2	3

