

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS-ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO: FISILOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO:
“EFEITO DO TRANS-RESVERATROL SOBRE A LONGEVIDADE E O
METABOLISMO DE GLICOGÊNIO DE *Drosophila melanogaster* EM
DIFERENTES IDADES”

ORIENTADORA: PROF^a. DRA. ROSELIS SILVEIRA MARTINS DA SILVA

MESTRANDO: FELIPE AMORIM FERNANDES

PORTO ALEGRE, JULHO DE 2006

AGRADECIMENTOS

A minha esposa pelo companheirismo, amor e apoio em todos os momentos. Te amo muito!

Aos meus pais por terem me proporcionado estar neste momento e conquistado tudo o que conquistei.

Aos meus sogros pelos conselhos e apoio nesta caminhada.

A minha colega de laboratório Bibiana Kaiser Dutra pelos intermináveis experimentos, cultivos, enfim, todos os passos; e pela ajuda e companheirismo quando mais precisei.

À minha orientadora Profa. Dra. Roselis Silveira Martins da Silva pelo apoio, atenção e orientação nos momentos mais precisos.

A Profa. Dra. Guendalina Turcato Oliveira por ter sido a minha mãe científica durante minha graduação, pela coorientação e pela amizade que cultivamos.

Ao professor Luiz Carlos Kucharski pela ajuda na dissertação

Aos colegas do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia da PUCRS

A professora Ilma Simone pela ajuda na dissertação

A professora Débora pela ajuda na dissertação

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular

Ao programa de pós-graduação de Fisiologia

A UFRGS

E ao CNPq pela Bolsa

SUMÁRIO

1. Resumo	04
2. Introdução	
Envelhecimento	06
Trans-resveratrol e Defesas Antioxidantes DMSO	12
Insetos como Modelo de Estudos Metabólico	14
3. Objetivo	21
4. Artigo: Efeito do Trans-resveratrol sobre a Longevidade de <i>Drosophila melanogaster</i>	
Resumo	22
Introdução	23
Objetivo	24
Materiais e Métodos	24
Resultados	28
Discussão	29
Referências	33
5. Artigo: Efeito do Trans-resveratrol no Metabolismo de Glicogênio ao Longo da Vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	
Resumo	36
Introdução	37
Objetivo	40
Materiais e Métodos	40
Resultados	47
Discussão	49
Referências	54
6. Conclusões Finais	60
7. Referências Gerais	61

1. RESUMO

O trans-resveratrol é uma fitoalexina natural encontrada em uvas, amoras, amendoim e muitas espécies de plantas. Em uvas o trans-resveratrol é responsável pela proteção natural contra doenças e sua concentração depende da origem geográfica, da variedade e dos métodos de fabricação do vinho; sendo considerado por muitos autores como um geroprotetor. O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito do trans-resveratrol na longevidade e no metabolismo de carboidratos (glicogênio, atividade e expressão da enzima glicogênio fosforilase - GFT) de *Drosophila melanogaster* em diferentes idades (0, 7, 14, 18 e 21 dias). Para a análise da longevidade espécimes de *D. melanogaster* com idade de 10 dias foram colocados em vidros contendo meio de cultura padrão acrescido de água ou dimetilsulfóxido (DMSO) 0,03%, ou trans-resveratrol nas concentrações de 1, 10 ou 20 μ M para ovoposição durante 24 horas, a prole recebeu os seus respectivos tratamentos durante toda a vida. Para as análises do metabolismo de glicogênio os espécimes de *D. melanogaster* foram colocados em meio de cultura padrão adicionado de água ou dimetilsulfóxido 0,03% (DMSO) ou ainda, trans-resveratrol na concentração de 1 μ M dissolvido em DMSO (0,03%) para ovoposição; seus ovos foram mantidos até a eclosão, durante a fase adulta os animais continuaram a receber os seus respectivos tratamentos até os pontos em que foram feitas as determinações bioquímicas e moleculares. Os resultados indicam que o tratamento com trans-resveratrol modulou o metabolismo de carboidratos em fêmeas e em machos de forma diferenciada; contudo, este composto não foi capaz de alterar a expressão gênica da GFT. Nas fêmeas tratadas com trans-resveratrol 1 μ M verificou-se um aumento de 127% na longevidade quando comparado ao grupo controle. Já nos machos tratados com trans-resveratrol 1 μ M observou-se um acréscimo de 50% na longevidade quando comparado ao grupo controle. Em ambos sexos tratados com Trans-resveratrol 10 e 20 μ M não houve aumento significativo da longevidade. Com base nos resultados podemos sugerir que o trans-resveratrol como outros antioxidantes descritos na literatura tem seus efeitos benéficos na menor dose administrada, podendo nas doses mais elevadas estar atuando como um pró-oxidante. Os resultados obtidos sugerem que o trans-resveratrol modula o metabolismo do glicogênio tanto em machos como em fêmeas e aumenta a longevidade do modelo experimental testado.

PALAVRAS-CHAVES: Trans-resveratrol, DMSO, Longevidade, *Drosophila melanogaster*, Metabolismo Intermediário, Glicogênio, Glicogênio Fosforilase

2. INTRODUÇÃO

2.1. ENVELHECIMENTO

O envelhecimento populacional vem chamando a atenção do mundo nas últimas décadas, pois tem como consequência o aumento no número absoluto e proporcional de idosos na população e o aumento da expectativa média de vida. Tal fenômeno traz consigo uma mudança epidemiológica relacionada à prevalência das causas mais comuns de morbimortalidade (OPAS, 1999). Assim, nas últimas décadas houve um aumento na prevalência de doenças crônico-degenerativas, cuja grande maioria apresenta origem multifatorial, envolvendo interações genético-ambientais (Hayflick, 1996).

A partir da década de 60 foi sugerido que as variáveis ambientais, especialmente, o hábito alimentar e a atividade física poderiam estar relacionadas com doenças cardiovasculares e neoplasias, entre outras patologias. Atualmente, sabe-se que o estilo de vida pode funcionar como um modulador para o processo degenerativo (Da Cruz *et al.*, 2000). Como exemplo, temos o hábito do tabagismo que compromete a saúde estimulando a formação dos radicais livres (Beattie *et al.*, 2001; Haveman *et al.*, 2003).

Neste sentido, diversos estudos como o SENECA (Study on Nutrition and the Elderly in Europe) realizado em nove países da Europa, no qual foram acompanhados 2200 idosos entre os anos de 1988 e 1999, concluiu que a adoção de um estilo de vida saudável como o hábito de não fumar, a prática de atividade física regular e uma alta qualidade da dieta contribuem para um envelhecimento bem sucedido. Em geral, quanto mais cedo iniciar a prática de estilo de vida saudável e quanto mais tempo for mantida mesmo em idade avançada, mais efetiva será a prevenção de doenças e disfunções. A adoção de um estilo de vida saudável por idosos, também será efetiva para a prevenção de doenças (Angelis, 2001).

O envelhecimento é um processo natural, inerente a todos os seres vivos, sendo impossível revertê-lo ou pará-lo, ainda que o mesmo possa ser modulado por fatores ambientais. Caracteriza-se por mudanças morfofuncionais que ocorrem ao longo da vida, após a maturação sexual. Como exemplo destas alterações, temos o aparecimento da queda de cabelo, diminuição da audição, menopausa em mulheres, alterações de órgãos, tecidos e células afetando sistemas como o cardiovascular, o endócrino e o imunológico, não significando doença (Da Cruz, 2001). Além disso, dentro da mesma espécie fatores causais

múltiplos podem acelerar ou retardar o processo de envelhecimento desta espécie. As bases moleculares e fisiológicas desses mecanismos e as causas que levam a essas modificações ainda não foram bem esclarecidas (Da Cruz & Schwanke, 2001).

As teorias sobre envelhecimento são muitas e estão embasadas em estudos em diferentes áreas do conhecimento - do morfológico até o molecular - em diferentes espécies.

Strehler (1982) salienta que para uma teoria do envelhecimento ser aceita ela precisa necessariamente contemplar características como:

- ser deletéria: o fator desencadeante deve reduzir a funcionalidade corporal ao longo do tempo;
- ser progressiva: modificações e redução da funcionalidade devem ser graduais;
- ser intrínseca: modificações e redução da funcionalidade não devem ser resultado direto de um fator ambiental;
- ser universal: modificações e redução da funcionalidade devem ocorrer similarmente ao longo do ciclo de vida, ainda que precoce ou tardiamente, em todos os indivíduos da mesma espécie.

Segundo Arking (1998) as teorias do envelhecimento podem ser agrupadas em duas grandes categorias, levando em consideração eventos intra e intercelulares:

a) Teorias sistêmicas ou da genética do desenvolvimento (intrínsecas): definem o envelhecimento como sendo parte de uma programação genética específica determinada, podendo ser modulado (acelerado/desacelerado) por fatores ambientais. A principal base explicativa para a evolução da programação genética do envelhecimento baseia-se na idéia de que o mesmo conjunto de genes que poderia se expressar em fases precoces da vida de modo benéfico poderia ter efeitos negativos no período pós-reprodutivo, determinando o envelhecimento.

Entre as teorias genéticas mais conhecidas, destacam-se: o antagonismo pleiotrópico, genes da longevidade, síndromes do envelhecimento acelerado, teoria neuroendócrina, teoria imunológica, senescência celular e morte celular.

b) Teorias estocásticas (extrínsecas): definem o envelhecimento como sendo causa de eventos ao acaso, levando ao acúmulo de danos com deterioração orgânica; não

existiria um mecanismo pré-determinado. Baseia-se no fato de que a pressão seletiva é próxima à zero. Desta forma, embora aconteçam mutações que tornem um determinado indivíduo mais longo ou mais frágil à doenças, a possibilidade de transmitir estas variações para as próximas gerações seria nula ou muito pequena, já que as mesmas acontecem depois do período reprodutivo.

Entre as teorias estocásticas mais conhecidas, destacam-se: a teoria da mutação somática e reparo do DNA, do erro catastrófico, da modificação protéica ou metabólica e do estresse ou dano oxidativo.

Uma das teorias estocásticas mais relevantes é a teoria do dano oxidativo, primeiramente proposta por Harman (1956). O autor relata que as espécies reativas de oxigênio (ERO) desencadeado por radicais livres, comumente denominados de estresse oxidativo, produzidos durante a respiração aeróbica, seria o principal fator desencadeante do envelhecimento, fundamentando a chamada Teoria dos Radicais Livres para o Envelhecimento. Essas substâncias causam danos moleculares que determinam alteração no equilíbrio interno (homeostase) dos organismos, ocasionando, entre outras anomalias, disfunções metabólicas (Van Voorhies, 2001). Os outros mecanismos postulados incluem: danos cumulativos ao DNA, levando à instabilidade gênica; alterações epigênicas que levam às mudanças no padrão de expressão gênica com encurtamento do telômero em células replicativas e, a glicosilação não enzimática de proteínas de longa duração (Jazwinski, 1996; Martin *et al.*, 1994).

Em mamíferos, Lee *et al.* (1999), examinando eventos moleculares associados ao envelhecimento, analisaram a resposta transcricional de 6347 genes do músculo gastrocnêmio de camundongos. Estes autores verificaram que os efeitos do envelhecimento estão associados a alterações nos níveis de expressão de mRNA, tendo como reflexo mudanças marcantes na expressão gênica e na estabilidade do mRNA. Dos 58 genes que aumentaram suas expressões, 16% estão envolvidos com as respostas aos diferentes tipos de estresses como as proteínas de choque térmico HSP 71 e HSP 27, a protease Do e o gene GADD45, indutor de danos ao DNA. Também foi detectado um aumento de 3,8 vezes na expressão do gene que codifica a creatina quinase (sarcomérica) mitocondrial, enzima que participa da inativação induzida das EROs.

A associação entre o dano oxidativo e o envelhecimento baseia-se no seguinte postulado: a longevidade seria um fenômeno inversamente proporcional à extensão do dano oxidativo; sendo diretamente proporcional a atividade das defesas antioxidantes. Portanto, a dimensão do dano oxidativo sofrido pelas células de um indivíduo determinaria alterações de parâmetros fisiológicos e com a magnitude sendo dependente da idade (Yo & Yang, 1996). Lee *et al.* (1999) sugerem que durante o processo de envelhecimento ocorre uma indução ao estresse oxidativo por aumento da expressão de proteínas e outras macromoléculas que geram dano oxidativo. A correlação entre envelhecimento e o aumento da expressão de genes (HIC-5, HSP 70 e o *insulin-like* fator de crescimento ligado a proteína) induzidos pelo dano oxidativo no músculo esquelético já foi demonstrada, *in vitro*, em fibroblastos (Bonelli, 2001; 1999). Entretanto, existe uma tendência atual para explicar o envelhecimento como sendo um resultado de interações genético-ambientais.

Dentro das questões relacionadas com a biologia de espécies animais, o envelhecimento e a morte possuem um destaque especial. Embora esses processos biológicos sejam naturais, pode-se dizer que são pouco conhecidos. Contudo, ainda é uma questão em debate se as alterações decorrentes do processo de envelhecimento são resultados inevitáveis dos eventos programados geneticamente ou são influenciadas por fatores ambientais ou ainda uma combinação de ambos (Da Cruz, 2002).

Sabe-se que o envelhecimento afeta a fisiologia e a bioquímica celular, levando a alterações nos sistemas fisiológicos e componentes histológicos. Durante os períodos de crescimento, os processos anabólicos excedem os catabólicos. Na maturidade, ocorre inversão e o catabolismo é maior que o anabolismo (Carvalho, 1996).

Mais do que nunca, cresce o interesse em identificar os fatores que levam ao envelhecimento bem sucedido, pois envelhecer não significa necessariamente adoecer, ou seja, o foco central gira em torno do interesse dos idosos, da velhice e do envelhecimento com uma boa saúde. Pode-se dizer que o envelhecimento não é necessariamente um fator determinante no aparecimento de doenças.

Dados recentes da literatura demonstram que o envelhecimento parece ser um processo multifatorial, e já se sabe que todos os eucariotos apresentam as vias envolvidas com a determinação de longevidade altamente conservadas. Estes achados foram em parte, verificados a partir de estudos com *Saccharomyces cerevisiae* (Bitterman *et al.*, 2003). Os

estudos forneceram significativas informações sobre o processo genético do envelhecimento, e a ciência passou a aceitar modelos biológicos mais simples para estudo do envelhecimento/longevidade. Também as pesquisas nesta área demonstraram a existência de genes únicos que controlariam o envelhecimento e nos anos 90, estudos genéticos demonstraram que mutações em numerosos genes tinham a capacidade de estender o tempo de vida (Bitterman *et al.*, 2003).

Hoje existem dezenas de mutações que sabidamente aumentam o período de vida em numerosos modelos biológicos. Muitos dos genes envolvidos com a longevidade têm funções relevantes sobre o metabolismo intermediário e a superexpressão ou mutação desses genes leva ao aumento da expectativa de vida. Dentre esses genes muitos estão diretamente envolvidos com a via de sinalização do metabolismo da glicose (CDC25, CYR1, GPR1, GPA2, RAS1, RAS2, TPK1), com a biossíntese de NAD (NPT1, NMA1/2, PNC1, SIR2) e com a defesa antioxidante (SOD1/ SOD2 – citosólica, superóxido desmutase mitocondrial, *UTH1*- gene responsivo ao estresse oxidativo, mas ainda com função desconhecida) (Bitterman *et al.*, 2003).

Muitas mutações gênicas que aumentam a expectativa de vida também conferem resistência ao estresse oxidativo (Johnson *et al.*, 2002). Estes dados fornecem apoio para a teoria de que os radicais livres levam ao envelhecimento, pois as ROS acumuladas ao longo da vida provocam danos oxidativos às macromoléculas (incluindo ácidos nucleicos, proteínas e lipídios) e estão correlacionadas ao processo de envelhecimento e de morte (Harman, 1956; Beckman & Ames, 1998).

Em relação ao metabolismo intermediário, uma acentuada diminuição na expressão e na atividade de proteínas reguladoras durante o processo de envelhecimento foi demonstrada no estudo de Bitterman *et al.* (2003). Genes associados com a bioenergética e *turnover* mitocondrial (adenosina 5'-trifosfato sintase *A cadeia* e a NADP transidrogenase), com a gênese mitocondrial e com a manutenção do DNA mitocondrial diminuem a sua expressão em cerca de duas vezes com o envelhecimento. Ocorre uma diminuição da expressão de genes envolvidos na via glicolítica e na via gliconeogênica (frutose-bifosfato aldolase e glicose-6-fosfato isomerase), no metabolismo do glicogênio, no *shunt* do glicerofosfato, no metabolismo de lipídios (esqualeno-sintase e estearoi-coenzima A

desaturase) e no metabolismo de proteínas (EF-1-gama, 20S subunidade proteasoma, 26S componente proteasoma TBP1, ubiquitina-tiolesterase, Unp ubiquitina-protease específica).

Na literatura consultada estudos sobre restrição de ingestão calórica (Lee *et al.*, 2001; Van Voorhies, 2001; Ji II, 2001; 2002; De Grey, 2001) e atividade física voluntária (Narath *et al.*, 2001) demonstraram, claramente, aumento do tempo de vida.

Postula-se que a ingestão, ao longo da vida, de uma dieta pobre em calorias diminuiria a atividade metabólica e que a restrição calórica em longo prazo prolongue a vida via redução no gasto metabólico, o que levaria a uma acentuada diminuição na produção de radicais livres gerados. A restrição calórica promove uma reprogramação metabólica em longo prazo, que foi caracterizada pela mudança no perfil transcricional de genes envolvidos com o metabolismo energético através da biossíntese e *turnover* de proteínas. No tecido muscular, genes como os que codificam a glicose-6-fosfato (glicólise), a frutose 1,6 bifosfatase (gliconeogênese), o IPP-2 (um inibidor da síntese de glicogênio) e a transcetolase (atua na via da pentose fosfato fornecendo NADPH para a biossíntese e como poderoso redutor para vários sistemas oxidantes) aumentaram em até quatro vezes sua expressão com a restrição calórica (Lee *et al.*, 2001).

Já a atividade física regular demonstrou ser um parâmetro que aumenta a expectativa de vida. Narath *et al.* (2001) compararam os efeitos da atividade física forçada e a voluntária sobre a longevidade em ratos. Os autores chegaram à conclusão de que os animais que praticavam exercício livremente, não forçado, apresentaram um aumento significativo da longevidade quando comparados aos animais que eram forçados à prática de exercício. Além disso, os animais não forçados ao exercício apresentavam um percentual de gordura corporal significativamente menor do que animais sedentários ou forçados ao exercício.

2.2. TRANS-RESVERATROL E DEFESAS ANTIOXIDANTES

As defesas antioxidantes no organismo contra os EROs produzidos durante a respiração celular podem ter origem endógena (enzimática ou não enzimática) ou exógena da dieta, como as vitaminas, carotenóides, flavonóides, etc. (Harman, 1994). O aumento do consumo dietético de substâncias antioxidantes ajuda na manutenção de um adequado

balanço oxidativo, definido como o balanço entre substâncias oxidantes e antioxidantes no organismo (Halliwell, 1995). Alguns estudos epidemiológicos sustentam os efeitos protetores da dieta rica em antioxidantes, pois o aumento do consumo de frutas e vegetais está diretamente relacionado com a redução do desenvolvimento de doenças cardiovasculares e de certos tipos de câncer (Kohlmeir *et al.*, 1995; Steinmetz & Potter, 1996; Hininger *et al.*, 1997; Ness & Powles, 1997). Estudos indicam que a maior fonte dietética responsável pelos efeitos protetores antioxidantes são os compostos polifenólicos (Hertog *et al.*, 1994; 1996; 1995; 1997). Uma grande variedade de alimentos e bebidas de origem vegetal contém várias classes de compostos polifenólicos não-flavonóides. Estes compostos são sintetizados pelas plantas (principalmente pelos espermatófitos) em resposta a injúria ou ataque de fungos. Dentre estes compostos, o trans-resveratrol foi identificado como o principal composto ativo.

O trans-resveratrol foi primeiramente detectado em uvas (*Vitis vinifera*) por Langcake & Pryce em 1976. Os autores verificaram que a produção deste composto deve-se a um mecanismo de proteção contra o ataque de fungos (principalmente *Botrytis cinerea*) ou devido à exposição à luz ultravioleta. O trans-resveratrol ocorre na natureza nas formas isoméricas cis e trans, contudo a forma cis foi detectada em uvas em uma quantidade muito menor do que a forma trans (Frémont, 2000). O trans-resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-trans-estilbeno) é uma fitoalexina natural encontrada em uvas, amoras, amendoim e muitas espécies de plantas. Essa fitoalexina é a responsável pela proteção natural da uva contra doenças, e sua concentração depende da origem geográfica, da variedade, dos métodos de crescimento da uva, e dos métodos de fabricação do vinho. Posteriormente, Siemann & Creasy (1992) detectaram a presença do trans-resveratrol no vinho, sugerindo que essa substância seria um dos principais compostos biologicamente ativo do vinho tinto. A partir de então começaram os estudos científicos sobre os efeitos biológicos do trans-resveratrol.

O vinho é utilizado há muito tempo pelo homem, que sempre acreditou que a sua ingestão traria efeitos benéficos para o corpo e a alma. O sul do Brasil caracteriza-se como um pólo de viticultura, tendo uma produção expressiva de diferentes variedades de vinho. Trabalho de Souto *et al.* (2001) demonstrou que os vinhos produzidos na região sul do Brasil apresentam uma quantidade expressiva de trans-resveratrol quando comparados com

vinhos produzidos na Europa, Japão e Estados Unidos. O vinho Merlot produzido no Rio Grande do Sul foi a variedade de vinho que apresentou a maior concentração de trans-resveratrol, tendo uma média de 5,1mg/L desse composto. A seguir temos a variedade Tannat (4,2mg/L), Pinot Noir (3,5mg/L) e Cabernet Sauvignon (2,01mg/L).

Estudos realizados comprovaram que a ingestão regular, mas moderada de vinho tinto, teria um efeito eficaz na redução de doenças cardiovasculares e uma melhor qualidade de vida (Beckman & Ames, 1998).

Asensi *et al.* (2002) administraram oralmente uma dose de trans-resveratrol de 20mg/kg de peso em coelhos, ratos e camundongos e coletaram sangue nos tempos 2.5, 5, 10, 30, e 60 minutos. Os autores demonstraram que o trans-resveratrol atinge sua concentração plasmática máxima em 5 minutos após a administração, sendo esta concentração de $42,8 \pm 4,4\mu\text{M}$, contudo, após 60 minutos os valores encontrados foram de $0,9 \pm 0,2\mu\text{M}$.

Estudos demonstraram que o trans-resveratrol atua: na inibição da peroxidação de lipídios (LDL, membranas); como quelante de cobre; como antioxidante bloqueador das reações com radicais livres; na alteração da síntese de eicosanóides; na inibição da agregação plaquetária; como potente antiinflamatório; como vasorelaxante; na modulação do metabolismo lipídico; como inibidor da angiogênese; como inibidor da atividade da ciclooxigenase; e na atividade estrogênica (Ji II, 2002). A estrutura molecular do trans-resveratrol é parecida com a do dietilestilbestrol, sendo constatado que o trans-resveratrol é um fitoestrógeno (Bitterman *et al.*, 2003), portanto, poderia desempenhar um efeito relevante no sistema cardiovascular.

Dutra *et al.* (2004) demonstrou os efeitos do trans-resveratrol sobre a modulação do metabolismo intermediário, o ciclo de vida e a lipoperoxidação em machos e fêmeas de *D. melanogaster*. Sobre o metabolismo de carboidratos o trans-resveratrol, administrado a partir do 1º dia do ciclo de vida adulta, foi capaz de alterar o perfil metabólico em machos e fêmeas. Fêmeas tratadas com 1 μM de trans-resveratrol diminuíram em 2,7 vezes os estoques de glicogênio aos 21 dias de vida, bem como as reservas protéicas (três vezes menor), contudo, aumentaram os níveis de lipídios totais e triacilgliceróis (Dutra *et al.*, 2004). Foi sugerido que a quebra do glicogênio e/ou a diminuição da síntese de glicose desvie carbonos para as rotas metabólicas envolvidas com a síntese de lipídios, pois o

tratamento com trans-resveratrol potencializou o armazenamento das reservas lipídicas ao longo do tempo, chegando a valores 200% maiores aos 21 dias de experimento. O trans-resveratrol também alterou a fecundidade das fêmeas, reduzindo o índice de fertilidade. Este dado sugere que a manutenção das reservas de lipídios ocorre pelo menor gasto energético com a manutenção da reprodução, já que os lipídios são a principal fonte de energia utilizada no período reprodutivo. A lipoperoxidação é aproximadamente 100 vezes maior nos machos do que nas fêmeas. Nas fêmeas, o trans-resveratrol administrado desde o primeiro dia de vida adulta é capaz de reduzir a lipoperoxidação aos 7 e 21 dias do ciclo de vida, assemelhando-se ao dano encontrado no primeiro dia de vida adulta. Já nos machos o trans-resveratrol é capaz de reduzir o dano oxidativo aos 14 e 21 dias de vida adulta, a um valor duas vezes mais baixo.

2.3. INSETOS COMO MODELO DE ESTUDOS METABÓLICOS

Os insetos são uma das mais eficazes criaturas do nosso ambiente, cuja vida está entrelaçada com a do homem, fascinando muitos e sendo considerados por outros somente como uma barreira às atividades e desejos humanos. (Pansera *et al.*, 2000).

Estudos têm demonstrado que os fatores ambientais possuem influência crucial sobre a longevidade de insetos (Lints & Burgois, 1985). Ao nascer, cada espécie apresenta um projeto genômico que faz com que os indivíduos tenham um determinado tempo de vida. Entretanto alterações ambientais podem modificar para mais ou para menos sua longevidade (Lints, 1983).

Na literatura existem poucos trabalhos realizados com animais de ciclo de vida curto, como por exemplo, *Drosophila melanogaster*, e que envolvam os genes do envelhecimento e a atividade fisiológica das proteínas codificadas por estes genes. Através de estudos genéticos feitos com modelos biológicos como a levedura, nematodos, moscas e camundongos foram descobertos vários genes que têm a capacidade de prolongar a vida quando manipulados (por mutações ou superexpressão). Estes genes incluem a *superóxido dismutase* (*scavenger* de radicais livres), e o *methuselah* (receptor em potencial para acoplamento da proteína G) em *Drosophila melagonaster*; o *p66^{shc}* que participa da resposta ao estresse oxidativo em camundongos. E os genes *clk-1* (envolvido com a síntese de ubiquinona), e um grupo de genes envolvidos com a via de sinalização do receptor de

insulina: *daf-2*, *age-1* e *daf-16* em *C. elegans* (Bitterman, 2003). Muitas mutações gênicas que produzem aumento da expectativa de vida também conferem o aumento da resistência ao estresse oxidativo (Johnson *et al.*, 1999). Estes dados fornecem apoio para a teoria de que os radicais livres levam ao envelhecimento, pois as EROs acumuladas ao longo da vida provocam danos oxidativos a macromoléculas (incluindo ácidos nucleicos, proteínas e lipídios) e estão correlacionadas ao processo de envelhecimento e morte (Harman, 1956; Beckman & Ames, 1998).

Lints (1988) lista como vantagens do uso de *Drosophila* em estudos de envelhecimento a alta capacidade reprodutiva deste organismo, seu curto tempo de geração, pequeno tamanho, cultivo fácil e barato, pequeno número de cromossomos, alta definição dos cromossomos politênicos, grande número de bem conhecidas e igualmente bem mapeadas mutações (mais de 3000, segundo Lindsley & Zimm, 1992) e curta longevidade. Além disso, com exceção das células germinativas, o adulto é composto unicamente por células pós-mitóticas, o que permite estimar a contribuição de modificações epigenéticas ao processo de senescência, particularmente a detecção de eventos modificadores não enzimáticos como racemização, desaminação e glicosilação de proteínas (Finch, 1990).

Em *Drosophila melanogaster*, muitos estudos têm revelado que o tempo de vida pode ser alterado por genes principais (Lints, 1978,1983; Lints & Bourgois, 1985). Embora seja postulado que a longevidade estaria sob controle poligênico em *Drosophila*, há indícios de que os genes localizados no terceiro cromossomo e no cromossomo sexual seriam os que exerceriam a maior influência sobre o tempo de vida desta mosca (Luckinbill *et al.*, 1988; Yonemura *et al.*, 1989,1990). Estes genes para longevidade foram chamados por Yonemura *et al.* (1991) de sistemas Ju-my (Jm). Os genes Jm parecem afetar a velocidade de desenvolvimento pré-imaginal de *Drosophila melanogaster* (Yonemura *et al.*, 1991). Estes autores sugerem que indivíduos de *Drosophila* portadores do alelo Jm A2 (um gene autossômico que produziria fenótipos mais longevos) eclodem mais rapidamente, o que contribuiria para uma associação entre precocidade e longevidade aumentada. Entretanto, ao contrário destes resultados, Nascimento (1992) e Da Cruz (1995), estudando populações selecionadas para velocidade de desenvolvimento, encontraram uma relação não-linear entre velocidade de desenvolvimento e longevidade. Estudos recentes sobre o

envelhecimento em *Drosophila* têm como foco os aspectos evolutivos (Hutchinson & Rose, 1991; Roper *et al.* 1993; Chippindale *et al.* 1994) e o desenvolvimento (Yonemura *et al.* 1991, Buck *et al.*, 1993b; Da Cruz *et al.* 1995). Em genética do desenvolvimento, um destaque considerável tem sido dado à velocidade de desenvolvimento, que influencia diversos aspectos da fisiologia e da ontogenia de *Drosophila*.

A velocidade em que as diferentes fases de desenvolvimento dos insetos ocorrem está diretamente associada com os padrões de diferenciação dos organismos durante a ontogenia. Ela determina a *intensidade* com que os diferentes sistemas fisiológicos e bioquímicos são formados, mudando, desta forma, muitas características importantes no processo adaptativo do organismo, portanto é um relevante componente seletivo para a espécie (Gilbert, 1994). Estudo de Lints & Lints (1971a) sugere que a duração do desenvolvimento em *Drosophila* poderia controlar a duração da vida dos adultos. Seus dados mostraram que a longevidade em moscas das frutas foi negativamente correlacionada com temperatura e positivamente com a duração do desenvolvimento. Em *Drosophila*, outros aspectos da ação do ambiente sobre a longevidade e a senescência têm sido investigados. Yonemura *et al.* (1991) demonstraram que o tempo de vida em *Drosophila* aumenta com o decréscimo de temperatura, sendo o prolongamento da vida atribuído à ação de genes autossômicos presentes nesta espécie.

Populações de *Drosophila melanogaster* Oregon-R selecionadas durante 29 anos para extremos de velocidade de desenvolvimento precoce (OP) ou tardia (OT) e população controle sem seleção (OC), caracterizam-se por apresentar diferentes conjuntos genotípicos. Estes conferem a essas populações: 1) isolamento reprodutivo incipiente devido à inferioridade do híbrido envolvendo fêmeas tardias (Loreto & Oliveira, 1988a), 2) diferentes padrões eletroforéticos de ativação de produtos gênicos, a cronologia dos mesmos e intensidade geral de coloração para oito sistemas enzimáticos (Oliveira & Cordeiro, 1982a, 1982b, 1984, Loreto & Oliveira, 1988b), além de desbalanço hormonal (Loreto *et al.*, 1988; Jung, 1992). Além disso, dois principais genes controlam a velocidade de desenvolvimento, sendo o recessivo responsável pelo desenvolvimento lento ou tardio (Oliveira & Cordeiro, 1981). Este gene para tempo de desenvolvimento lento foi mapeado

em II. 63.8 (Oliveira *et al.* 1991) e o principal gene para a precocidade foi localizado em III. 46.55 por Correa (1994).

Nascimento (1992) e Da Cruz *et al.* (1995), estudando o efeito da seleção para velocidade de desenvolvimento na longevidade dessas populações, obtiveram evidências significativas em favor da hipótese de que diferentes regimes de seleção produziram diferenças correspondentes na longevidade dos indivíduos, sendo a população tardia significativamente mais longeva que as demais. Outro achado interessante é que o caráter longevidade apresenta influência de um fator materno relacionado à fêmea tardia (Nascimento, 1992). Cabe salientar também, que a expressão dos fenótipos para longevidade nessas populações é fortemente influenciada pelos reguladores de velocidade de desenvolvimento, uma vez que a magnitude da resposta à seleção para extremos de longevidade depende do tipo de seleção para a velocidade de desenvolvimento previamente realizada (Da Cunha *et al.* 1995). Entre os genes que apresentaram fixação de diferentes alelos nestas populações, encontra-se o gene codificador da isocitrato desidrogenase dependente de NADP (IDH-NADP), que está localizado no terceiro cromossomo (Fox, 1971).

Zou *et al.* (2000), utilizando *D. melanogaster* como modelo biológico, verificaram que os genes envolvidos com a reprodução (família Acp), o metabolismo (genes envolvidos na glicólise), o *turnover* de proteínas, a cadeia respiratória (ciclo do ácido tricarboxílico nas mitocôndrias) e os processos de detoxificação diminuem a sua expressão com o envelhecimento. Os autores, utilizando o paraquat como um indutor de estresse oxidativo, verificaram uma diminuição da expressão gênica de aproximadamente 1,8 vezes em genes envolvidos com o metabolismo dos ácidos graxos (ácido graxo desaturase, ácido graxo CoA ligase, acetyl-Coa carboxilase), enquanto que os genes envolvidos com as defesas antioxidantes, como a glutatona *S*-transferase, o triglicérido-lipase e a hidroxiacilglutaciona hidrolase, aumentaram a expressão na mesma proporção.

Sabe-se que o metabolismo de ácidos graxos é a maior fonte de geração de radicais livres nas células. Assim foi sugerido que a diminuição da expressão dos genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos seria um mecanismo celular de defesa ao estresse oxidativo via diminuição da geração de radicais livres (Zou *et al.*, 2000).

A composição e a disponibilidade de alimentos são fatores críticos para a sobrevivência e a reprodução das diferentes espécies, modulando a sua longevidade e alterando o comportamento reprodutivo. No caso dos insetos, a quantidade e a qualidade dos alimentos ingeridos afetam o desenvolvimento tanto na fase imatura como na fase adulta (Slanki & Scriber, 1985).

Na fase adulta, a quantidade e a composição da dieta ingerida são importantes para a produção de óvulos, para a habilidade no acasalamento, para a sobrevivência, para a capacidade de dispersão e para o desenvolvimento de músculo e da cutícula (Dadd, 1985; Slanki & Scriber, 1985; Zuculoto, 1988).

A maioria dos insetos da família *Tetrifidea*, como os gêneros *Anastrepha*, *Ceratidis* e *Bactrocera*, apresentam um hábito alimentar anautógeno, isto é, necessitam constantemente de água e de carboidratos, mas as proteínas também são necessárias na fase adulta. Além disto, este grupo de insetos requer ingestão regular de vitaminas, sais minerais e esterol para a produção normal de óvulos (Webster *et al.*, 1979 e Tzanakakis *et al.*, 1967). Estas moscas permanecem no modo de espera quando são alimentadas somente com açúcar, já quando são alimentadas com proteína, mudam para o modo reprodutivo, vivendo mais do que aquelas que permaneceram no modo de espera.

Assim, o modo de espera para a fase reprodutiva, com um tempo de vida alongado é observado em diferentes organismos, parece atuar como uma estratégia fisiológica que possibilita a preservação do organismo frente a situações de escassez de alimento, assegurando a sobrevivência e a perpetuação da espécie.

Em outros insetos, incluindo a *D. melanogaster* (mosca-das-frutas), a longevidade também pode ser aumentada quando a ingestão de proteínas na dieta é adequada (Tzanakakis *et al.*, 1967; Souza *et al.*, 1978; Jones, 1988; Ferraz, 1994).

Nos insetos os lipídios da dieta são a maior fonte energética (Shapiro, 1988). O catabolismo e o anabolismo de reservas de lipídios nos insetos têm sido correlacionados, entre outros fatores, ao estado nutricional do organismo e ao controle da temperatura corporal (Chapman, 1998). Em geral, muitas espécies de insetos seguem um esquema

típico: sob um balanço energético negativo, os insetos mobilizam suas reservas energéticas e sob um balanço energético positivo, os insetos mantêm seus níveis lipídicos ou acumulam reservas (Keeley, 1978).

Em *Ceratitis capitata*, Nestel *et al.* (2003) verificaram que os animais utilizavam de forma diferencial os lipídios durante a transição da fase larval à fase adulta. Langley (1970) observou uma atividade constante da utilização de lipídios totais durante a metamorfose. Entretanto, Municio *et al.* (1980) e Pagani *et al.* (1980) demonstraram uma pequena diminuição nos lipídios totais durante a fase de pré-pupa e as fases pupais. Os autores mostraram que esta pequena diminuição durante a primeira metade da metamorfose foi seguida de uma utilização drástica dos lipídios horas antes da emergência para a fase adulta.

Nestel *et al.* (2003), em *Ceratitis capitata*, constataram um aumento significativo nos lipídios totais 8 horas antes da formação das pupas e 20 horas depois da formação das pupas; após os lipídios começaram a ser consumidos. Esta diminuição na reserva dos lipídios totais coincidiu com a degradação do corpo gorduroso, evidenciado por secções histológicas do tecido pupal. Os níveis dos triglicerídeos diminuíram (55%) durante a transição da pré-pupa para pupa (0 hora), sugerindo que os triglicerídeos foram utilizados como substrato energético quando a larva não pode se alimentar.

Os resultados sugerem que os lipídios totais e em especial os triglicerídeos são armazenados pelos animais durante o desenvolvimento pupal e consumidos na emergência do imago, nas primeiras atividades de vôo, e na procura pelo alimento nos primeiros quatro dias da vida do adulto.

Nestel *et al.* (2004; 2005) mostraram, em *C. capitata*, que as pupas regulam as reservas de lipídios para a emergência do adulto, com fontes provenientes da histólise larval ou da dieta.

Em *Anastrepha serpentina*, Jacome *et al.* (1995), analisando as reservas de lipídios entre o 4º e 6º dias após a emergência do adulto, sugeriram que durante estes dias iniciais, as reservas de lipídios podem ser usadas como uma fonte energética para o desenvolvimento dos tecidos reprodutivos e endócrinos e para as atividades do vôo.

Alguns estudos metabólicos realizados com moscas-das-frutas mostram que estes insetos conseguem transformar proteínas e carboidratos em lipídios, os quais são utilizados na estruturação da membrana celular, como isolante térmico, no fornecimento de fontes de ácidos graxos essenciais e de esteróis envolvidos na reprodução e na síntese de hormônios como a ecdisona (Chapman, 1998).

A *Drosophila melanogaster* é utilizada em muitos estudos genéticos como modelo experimental; tendo como características: tamanho reduzido, fácil cultivo, pequeno número de cromossomos, ciclo de vida curto e índice de natalidade elevado. A *D. melanogaster* é considerada um excelente modelo biológico pelo fato de que muitos dos mecanismos genéticos demonstrados no homem foram primeiro descritos neste inseto. Outro fator importante é que todos os genes desse animal já foram mapeados (Panizzi & Parra, 1991).

Recentemente Wood *et al.* (2004) demonstraram, em *Drosophila melanogaster* mutante da linhagem Cartom-S, que o trans-resveratrol aumentaria a longevidade via ativação do gene Sir2 responsável pela abertura ou compactação de diferentes genes na cadeia de DNA. O trans-resveratrol ativaria a expressão gênica de Sir2 que aumentaria a acetilação de diferentes genes, levando a diminuição da expressão gênica de genes responsáveis pelo envelhecimento. Estes autores demonstraram ainda que o trans-resveratrol é capaz de aumentar a longevidade sem afetar a reprodução, o que é altamente benéfico, pois é sabido que a reprodução é um dos causadores de dano oxidativo, aumentando desta forma o envelhecimento.

Mesmo havendo grandes diferenças estruturais e fisiológicas entre *Drosophila* e mamíferos, resultados obtidos em *Drosophila* podem contribuir grandemente para nossa compreensão básica do processo de envelhecimento, como ocorreu no início do século XX em relação aos princípios básicos da genética (Buck, *et al.*, 1993).

Por último, a maioria, senão todas as teorias do envelhecimento, têm sido testadas, confirmadas, rejeitadas ou modificadas a partir de estudos feitos em *Drosophila*. Além disso, com exceção das células germinativas, o adulto é composto unicamente por células pós-mitóticas, o que permite estimar a contribuição de modificações epigenéticas ao processo de senescência, em particular a detecção de eventos modificadores não enzimáticos como racemização, desaminação e glicosilação de proteínas. O fato de o

indivíduo adulto de *Drosophila* ser quase inteiramente composto por células pós-mitóticas tem sido apontado como o principal empecilho para comparações entre este organismo e mamíferos. Porém, é importante lembrar que muitas células importantes no contexto da senescência em mamíferos são células de longa vida pós-mitótica, como os neurônios (Lints, 1998 a;b).

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do trans-resveratrol, principal composto bioativo do vinho e do suco de uva, sobre a longevidade e o metabolismo de glicogênio de *Drosophila melanogaster*. Para tanto foram objetivos específicos:

- 3.1 Determinar a longevidade de animais tratados desde a fase larval com diferentes concentrações de trans-resveratrol (1 μ M, 10 μ M e 20 μ M) diluído em DMSO numa concentração de 0,03%.
- 3.2 Verificar o efeito da concentração de 1 μ M de trans-resveratrol sobre a concentração de glicogênio, a atividade da enzima glicogênio fosforilase na sua forma total e ativa e a expressão gênica da enzima glicogênio fosforilase (na forma total) em diferentes momentos da vida adulta.

Artigo 1

EFEITO DO TRANS-RESVERATROL SOBRE A LONGEVIDADE DE *Drosophila melanogaster*

RESUMO

O trans-resveratrol é uma fitoalexina encontrada em muitas espécies de plantas. Em uvas é responsável pela proteção natural contra doenças, e sua concentração depende da origem geográfica, da variedade, dos métodos de fabricação do vinho; sendo considerado um geroprotetor. O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito do trans-resveratrol na longevidade de *Drosophila melanogaster*. Espécimes de *D. melanogaster* com idade de 10 dias foram colocadas em vidros contendo meio de cultura padrão acrescido de água ou dimetilsulfóxido (DMSO) 0,03%, ou trans-resveratrol nas concentrações de 1, 10 ou 20 μ M para ovoposição durante 24 horas, os ovos foram mantidos no tratamento até a eclosão do adulto. Durante a fase adulta, os animais continuaram a receber os seus respectivos tratamentos. Nas fêmeas verificou-se um aumento de 127% na longevidade quando tratadas com trans-resveratrol 1 μ M e um acréscimo de 72% quando tratadas com DMSO em relação ao grupo controle. Já nos machos observou-se um acréscimo de 50% na longevidade quando tratadas com trans-resveratrol 1 μ M e um aumento de 25% quando tratados com DMSO 0,03% em relação ao grupo controle. Em ambos sexos tratados com Trans-resveratrol 10 e 20 μ M não houve aumento significativo da longevidade. Com base nos resultados podemos sugerir que o trans-resveratrol como outros antioxidantes descritos na literatura tem seus efeitos benéficos na menor dose administrada, podendo nas doses mais elevadas estar atuando como um pró-oxidante.

PALAVRAS-CHAVES: Trans-resveratrol, Longevidade, *Drosophila melanogaster*.

INTRODUÇÃO

Os seres vivos são regidos por um determinismo biológico: nascer, amadurecer, reproduzir, envelhecer e morrer. O tempo e a forma que se processam cada uma destas fases depende de cada indivíduo, da programação genética da espécie e de fatores ambientais (Futuyma, 1992). Sendo assim, os organismos sofrem uma constante influência de fatores bióticos e abióticos durante sua vida; é essa relação entre seres vivos e ambiente, que conduz a evolução das espécies e o uso de diferentes recursos ambientais (Panizzi & Parra, 1991).

As teorias estocásticas definem o envelhecimento como sendo causa de eventos ao acaso, levando ao acúmulo de danos com deterioração orgânica; não existiria um mecanismo pré-determinado. O estresse oxidativo desencadeado pelos radicais livres (espécies reativas de oxigênio (EROs), produzidos durante a respiração aeróbica e por outras vias, seria o principal fator desencadeante do envelhecimento (Harman, 1956).

Fatores genéticos também exercem grande influência sobre a longevidade; a teoria das proteínas ou metabólica postula que mamíferos com estrutura maior apresentam uma longevidade maior do que espécies de menor tamanho, sendo a atividade metabólica inversamente proporcional ao peso corporal. Assim, a associação entre a longevidade e o metabolismo preconiza uma relação causal, pois estudos demonstram que em alguns organismos, alterações metabólicas induzidas por fatores ambientais (temperatura/dieta) poderiam produzir mudanças na longevidade (Lints, 1989).

As defesas antioxidantes contra as EROs produzidas durante a respiração celular podem ter origem endógena (enzimática ou não enzimática) ou exógena, tais como as vitaminas, os carotenóides, os flavonóides, entre outras (Harman, 1994). O aumento do consumo dietético de substâncias antioxidantes ajudaria na manutenção de um adequado balanço antioxidante, que é definido como o balanço entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes no organismo (Halliwell, 1995). Alguns estudos epidemiológicos sustentam os efeitos protetores da dieta rica em antioxidantes, pois o aumento do consumo de frutas e de vegetais está diretamente relacionado com a redução do desenvolvimento de doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer (Kohlmeir *et al.*, 1995; Steinmetz & Potter, 1996; Hininger *et al.*, 1997; Ness & Powles, 1997).

Estudos indicam que a maior fonte dietética responsável pelos efeitos protetores antioxidantes são os compostos polifenólicos (Hertog, 1996; Hertog *et al.*, 1994, 1995, 1997), sendo o trans-resveratrol, que é encontrado no vinho e no suco de uva, identificado como principal composto bioativo. Zini *et al.* (1999) verificaram que o trans-resveratrol atua inibindo a cadeia respiratória, opondo-se a produção de EROs e como scavenger de radicais livres.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da administração de diferentes concentrações de trans-resveratrol sobre a longevidade de *Drosophila melanogaster*. As moscas foram tratadas desde a fase larval até a morte com trans-resveratrol.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS E TRATAMENTOS

Foram utilizadas populações de *Drosophila melanogaster*, de linhagem Oregon-R, mantidas em laboratório em vidros de cultura, a uma temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, com umidade relativa em torno de 70% e com luminosidade constante.

Espécimes de *D. melanogaster* com idade de 10 dias (pais), cultivadas em meio de cultura padrão (10% Farinha de centeio, 5% Açúcar mascavo, 1% de Nipagin (fungicida) e 1% de Agar-Agar conforme Oliveira & Cordeiro, 1981), foram colocadas em vidros contendo: 1) Grupo Controle: meio de cultura padrão acrescido de água, 2) Grupo DMSO: meio de cultura padrão acrescido com dimetilsulfóxido (DMSO - Merck) na concentração de 0,03%, ou 3) Grupo Trans-resveratrol (Sigma): meio de cultura padrão acrescido com trans-resveratrol (diluído em DMSO 0,03%) nas concentrações de 1, 10 ou $20\mu\text{M}$ para ovoposição durante 24 horas (over night), após os pais eram retirados e seus ovos mantidos no tratamento até a eclosão do adulto. Durante a fase adulta os animais continuaram a receber os seus respectivos tratamentos, sendo transferidos duas vezes por semana para renovar o meio de cultura e seu tratamento, até sua morte.

Um grande número de trabalhos na literatura tem descrito a atividade do DMSO como promotor de penetração. Os estudos mostram que este solvente é eficaz tanto para promover a penetração de permeante hidrofílicos como lipofílicos (Williams e Barry, 2004). O DMSO como outros solventes orgânicos tem atividade antioxidante que pode

tanto ser benéfica, quando utilizado em baixas concentrações, como causar danos que vão da toxicidade até a morte quando utilizados em concentrações elevadas. Assim um grupo controle com DMSO na concentração de 0,03% fez-se necessário. Cabe ressaltar que na literatura consultada é o DMSO o solvente comumente utilizado para diluir o trans-resveratrol. Foi utilizada a menor concentração (0,03%) de DMSO citada na literatura, tendo sido encontrados trabalhos que utilizam até 10%.

DETERMINAÇÃO DA LONGEVIDADE

A avaliação da Longevidade foi feita pelo cálculo semanal da sobrevivência, dividindo-se o número de sobreviventes por intervalo de idade pelo tamanho inicial da coorte. Cabe ressaltar que foram realizadas 2 coortes para avaliação da longevidade. Através deste cálculo, foi construída uma tábua de vida a qual nos forneceu informações sobre a expectativa de vida destes indivíduos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise das curvas de longevidade foi utilizado o teste de Kaplan-Meier. Foi adotado o nível de significância de $p \leq 0,05$ e, as análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistical Package for the Social Science Versão 11.5 (SPSS) for Windows.

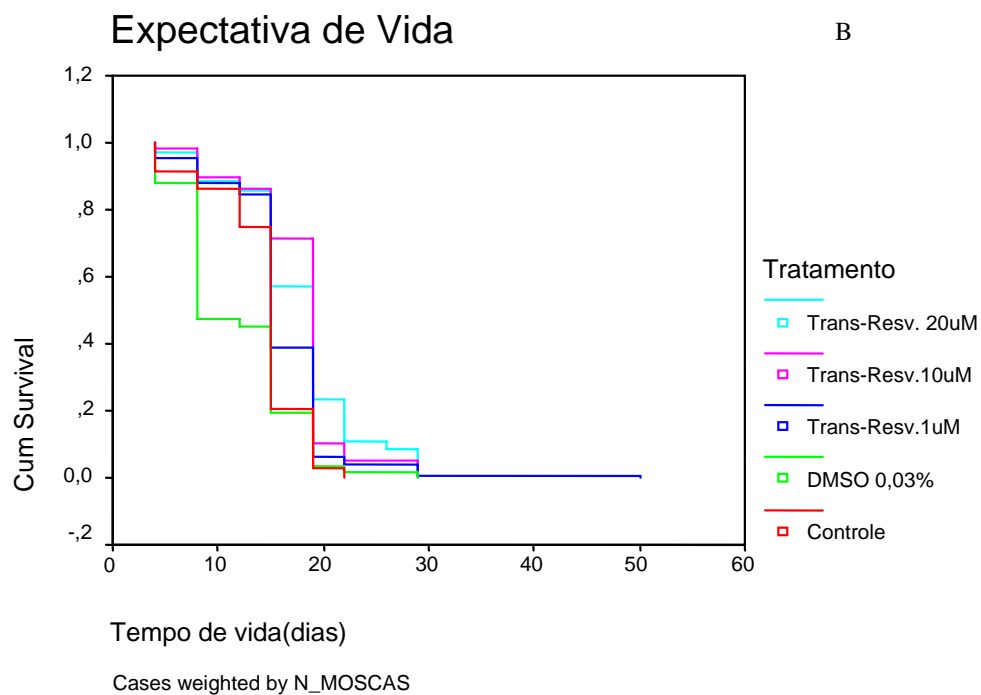
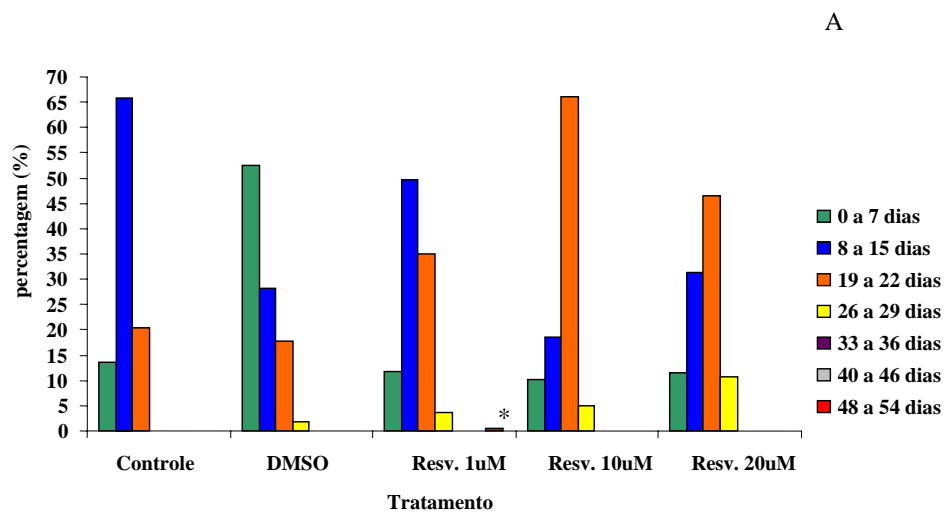
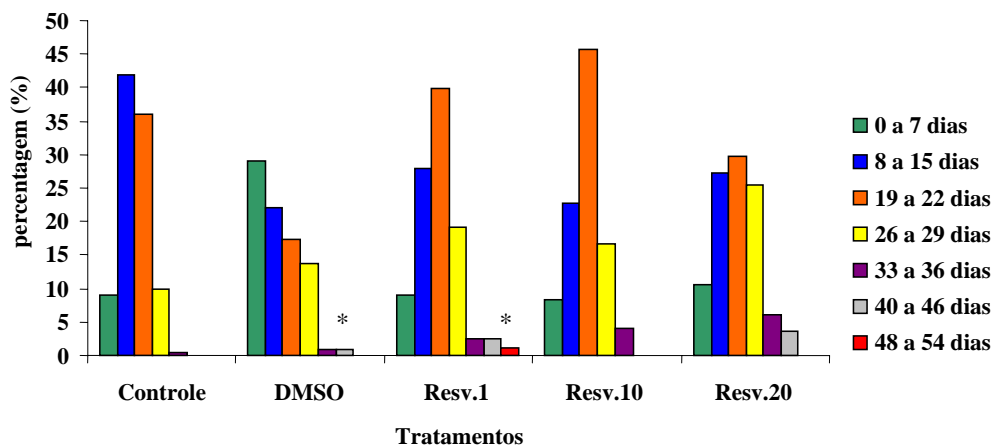


Figura 1. Longevidade de fêmeas tratadas com Trans-resveratrol 1, 10 ou 20 μ M, DMSO 0,03% e Controle. No gráfico A os animais foram agrupados em função dos picos de mortalidade. O gráfico B mostra a curva de expectativa de vida dos animais submetidos aos diferentes tratamentos, * representa diferenças significativas para um $p < 0,05$.

A



Expectativa de Vida

B

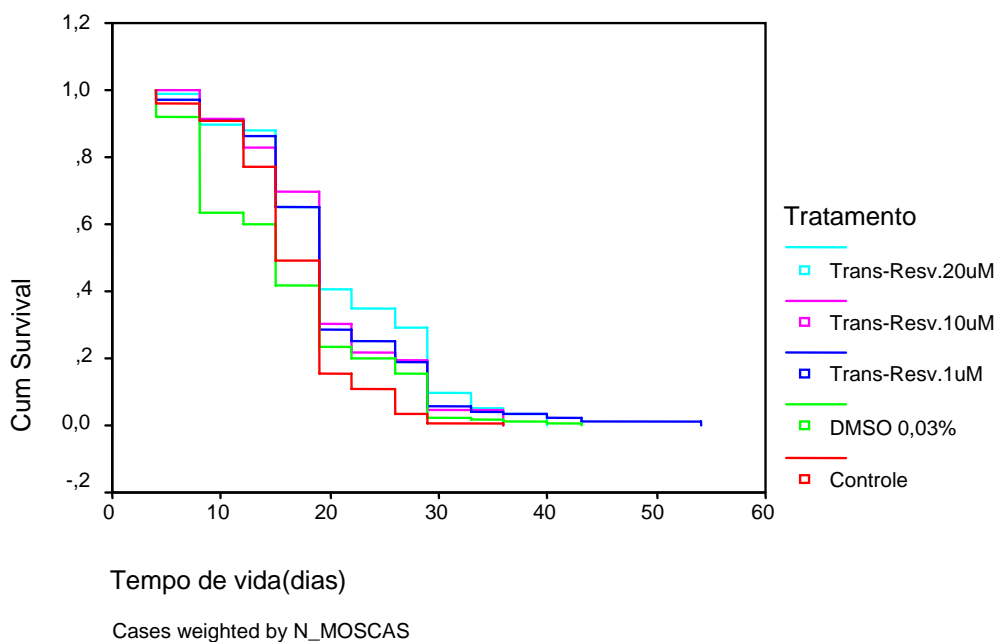


Figura 2: Longevidade de machos tratados com Trans-resveratrol 1, 10 ou 20 μ M, DMSO 0,03% e Controle. No gráfico A os animais foram agrupados em função dos picos de mortalidade encontrados. O gráfico B mostra a curva de expectativa de vida dos animais submetidos aos diferentes tratamentos, * representa diferenças significativas para um $p < 0,05$.

Tratamento	Machos	Fêmeas
Controle	36 dias ^a	22 dias ^a
DMSO 0,03%	43 dias ^b	29 dias ^a
Trans-resveratrol 1µM	54 dias ^b	50 dias ^b
Trans-resveratrol 10µM	36 dias ^a	26 dias ^a
Trans-resveratrol 20µM	40 dias ^a	29 dias ^a

Tabela 1: Longevidade máxima de machos e fêmeas dos diferentes grupos: Controle, DMSO 0,03% e tratados com Trans-resveratrol 1, 10 ou 20µM. Letras diferentes representam diferenças significativas para um $p < 0,05$.

RESULTADOS

Na curva de longevidade de fêmeas (Fig. 1A) constata-se um perfil diferenciado de sobrevivência cumulativa quando compara-se o grupo controle com os grupos tratados com trans-resveratrol nas concentrações de 1, 10 e 20µM e o grupo tratado com DMSO 0,03%. Também a comparação entre o grupo DMSO 0,03% com os grupos tratados com trans-resveratrol mostrou diferença significativa ($P < 0,05$).

O grupo controle apresentou uma longevidade máxima de 22 dias, o grupo DMSO 0,03% de 29 dias e o grupo trans-resveratrol tratado com a concentração de 1µM sobreviveu até os 50 dias de vida (Tabela 1).

Os grupos tratados com trans-resveratrol nas concentrações de 10 e 20µM sobreviveram até os 26 dias e 29 dias, respectivamente (Tabela 1). Estes dados mostram o trans-resveratrol na concentração de 1µM consegue aumentar significativamente ($P < 0,05$) a longevidade máxima em fêmeas, quando comparada àquela observada nos grupos controle e DMSO 0,03% (Fig. 1B).

Em fêmeas o aumento de expectativa de vida máxima de 22 dias no grupo controle para 50 dias no grupo tratado com trans-resveratrol 1µM, representa um acréscimo de 127% na longevidade destes animais. A comparação entre a sobrevivência do grupo de fêmeas tratadas com DMSO 0,03% (29 dias) com o grupo mantido com Trans-resveratrol 1µM (50 dias) demonstra um acréscimo de 72% na longevidade destes animais (Fig. 1A e Tabela 1).

A figura 1B mostra no grupo de fêmeas controle um do pico de mortalidade aos 15 dias e no grupo DMSO aos 8 dias de vida. Nos grupos tratados com Trans-resveratrol em

todas as concentrações verifica-se um deslocamento do pico de mortalidade das fêmeas para a direita, demonstrando um aumento da expectativa de vida (Fig. 1B).

Na curva de longevidade de machos (Fig. 1B) constata-se um perfil diferenciado ($P < 0,05$) de sobrevivência cumulativa quando compara-se o grupo controle com os grupos tratados com trans-resveratrol nas concentrações de 1 e 20 μM . A comparação entre o grupo DMSO 0,03% e os grupos tratados com Trans-resveratrol nas concentrações de 1, 10 e 20 μM também mostra diferença significativa ($P < 0,05$). O grupo controle apresentou uma longevidade máxima de 36 dias, o grupo DMSO 0,03% de 43 dias e o grupo trans-resveratrol 1 μM de 54 dias de vida. Os grupos tratados com Trans-resveratrol nas concentrações de 10 e 20 μM sobreviveram até os 36 e 40 dias, respectivamente.

Estes dados mostram nos machos o trans-resveratrol na concentração de 1 μM conseguiu aumentar a longevidade máxima significativamente ($P < 0,05$), quando comparada ao grupo controle e ao grupo DMSO 0,03% (Fig. 2 e Tabela 1).

Este aumento de expectativa máxima de 36 dias dos machos do grupo controle para 54 dias dos machos do grupo tratado com trans-resveratrol na concentração de 1 μM representa um acréscimo de 50% na longevidade dos animais e quando se compara os 43 dias de sobrevivência do grupo DMSO com os 50 dias de sobrevivência do grupo trans-resveratrol 1 μM encontra-se um acréscimo de 25% na longevidade destes animais.

Na figura 2B mostra que o pico de expectativa de vida dos machos do grupo controle ocorre aos 15 dias de vida, enquanto que no grupo DMSO 0,03% apresenta-se aos 8 dias de vida. Contudo, nos grupos tratados com Trans-resveratrol em todas as concentrações verifica-se se um deslocamento do pico de mortalidade para a direita, demonstrando um aumento da expectativa de vida como observado nas fêmeas.

DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que o trans-resveratrol na dose de 1 μM é capaz de aumentar significativamente a longevidade de machos e fêmeas de *D. melanogaster* tratados a partir das primeiras fases de desenvolvimento ontogenético.

Trabalho anterior realizado em *Drosophila melanogaster* tratadas após a eclosão da idade adulta com Trans-resveratrol na concentração de 1 μM diluído em DMSO 3%, a longevidade máxima do grupo controle foi de 34 dias e aquela dos grupos DMSO 3% e

trans-resveratrol 1 μ M de 33 dias, demonstrando que em fêmeas o trans-resveratrol não consegue aumentar a expectativa máxima de vida quando o tratamento inicia somente após a eclosão da idade adulta (Dutra, 2004). Contudo, quando as fêmeas de *D. melanogaster* foram tratados desde as fases larvais até a fase adulta (mesmo protocolo utilizado no presente trabalho), Dutra (2004) encontrou um perfil diferenciado: o grupo controle apresentou uma longevidade máxima de 34 dias, o grupo DMSO 3% de 35 dias e o grupo trans-resveratrol 1 μ M de 43 dias. Portanto, em fêmeas o tratamento com trans-resveratrol 1 μ M potencializa a longevidade em 26% quando comparada aquela do grupo controle apenas quando os animais são tratados desde as fases iniciais de seu desenvolvimento.

Talvez este fato possa ser explicado por ser a fase larval o período em que os animais podem sofrer uma reprogramação genética, podendo alterar o tempo de vida que está programado geneticamente para a espécie em questão, sendo esta reprogramação refletida na vida adulta dos animais. Cabe salientar que após a eclosão do imago, isto é durante a vida adulta a *D. melanogaster* caracteriza-se por ser um animal pós-mitótico (Da Cunha, 2000).

Neste trabalho a menor dose (1 μ M) de trans-resveratrol utilizada foi a mais efetiva em aumentar a longevidade máxima tanto em fêmeas como em machos. Nas concentrações mais elevadas de trans-resveratrol (10 e 20 μ M) a longevidade máxima tanto de machos como de fêmeas foi inferior aquela verificada no grupo DMSO 0,03%. Estes resultados são concordantes com os dados da literatura que demonstraram, em diferentes modelos animais, que concentrações elevada de diferentes substâncias antioxidantes não conferem aumento de longevidade aos organismos, apesar de seus efeitos sobre diferentes rotas metabólicas e ativação de genes envolvidos em mecanismos de reparo de dano celular (Miquel et al., 1982; Driver & Georgeou, 2003).

Valenzano et al. (2006) investigaram o efeito do trans-resveratrol sobre a longevidade de peixes da espécie *Nothobranchius furzeri*, obtendo resultados semelhantes ao presente estudo, onde os animais tratados em sua dieta com uma concentração de 0,5 μ M apresentaram uma longevidade máxima maior (21 semanas) que os animais que receberam uma dosagem de 2,5 μ M (18 semanas).

Segundo a literatura existem poucos trabalhos sobre o efeito de frutas e compostos antioxidantes sobre a longevidade e o envelhecimento de *D. melanogaster*. Um destes

estudos envolveu a análise da influência da vitamina E no tempo de vida deste modelo experimental. O efeito da vitamina E sobre o aumento da expectativa de vida tem sido relatado em estudos de Miquel et al. (1982) e de Driver & Georgeou (2003). Estes últimos autores encontraram efeitos variáveis da vitamina E sobre a longevidade de *D. melanogaster*, pois na concentração de 20 µg/ml o tempo de vida das moscas aumentou em cerca de 16%. Entretanto, doses inferiores ou superiores não apresentaram efeitos significativos sobre o tempo de vida dessa mosca. Driver & Georgeou (2003) sugerem que a vitamina E determina ações antagonistas conforme a concentração utilizada, assim o balanço entre os efeitos tóxicos e os benéficos determinaria o seu efeito sobre o tempo de vida da mosca.

A teoria do efeito da formação de radicais livres sobre o envelhecimento tem sido amplamente testada e confirmada por dados experimentais (Miquel et al., 1982; Driver & Georgeou, 2003). Contudo, a concentração de antioxidante utilizada é determinante para o seu efeito sobre a longevidade do animal. Em doses elevadas substâncias antioxidantes teriam um efeito contrário, sendo pró-oxidantes (produção de radicais livres desequilibrada à produção e ou aporte de defesas antioxidantes) (Miquel et al., 1982; Driver & Georgeou, 2003).

Resultado semelhante ao verificado neste trabalho foi constatado por Carvalho et al. (2004). Os autores trataram *D. melanogaster* com um meio de cultivo contendo 10% de maçã e observaram um aumento na longevidade destes animais, porém quando foi adicionado 20% de maçã no meio de cultivo os animais apresentaram uma longevidade semelhante àquela das moscas controle. Segundo os autores, a dose de 20% foi possivelmente uma dose excessiva de compostos bioativos para os animais que talvez tenham atuado como pró-oxidantes.

Recentemente Howitz (2003) em *S. cerevisiae* e Wood et al. (2004) em *D. melanogaster* da linhagem Cartom-S demonstraram que o trans-resveratrol aumenta a longevidade via da ativação do gene Sir2, que é o responsável pela compactação de diferentes genes na cadeia de DNA. O trans-resveratrol ativaria a expressão gênica de Sir2 aumentando a acetilação de diferentes genes incrementando a compactação do DNA e levando a diminuição da expressão gênica de genes responsáveis pelo envelhecimento. Os

autores, também, demonstraram que o trans-resveratrol é capaz de aumentar a longevidade sem afetar a reprodução, o que é altamente benéfico, pois se acredita que a reprodução é um dos causadores de dano oxidativo, aumentando conseqüentemente o envelhecimento. A concentração de trans-resveratrol utilizado em *S. cerevisiae* foi à mesma utilizada neste trabalho, contudo, a dose utilizada por Wood et al. (2004) em *D. melanogaster* foi 10 vezes superior à administrada neste trabalho. Estudos futuros sobre expressão gênica de SIR2 serão necessários para uma melhor compreensão dos resultados obtidos neste trabalho.

A utilização de *D. melanogaster* como modelos experimentais para o estudo dos processos de envelhecimento pode apresentar algumas limitações. As células somáticas desta mosca quando adulta são pós-mitóticas, ou seja, não realizam o processo de divisão, o que em princípio é tido como uma limitação, pois as células de mamíferos realizam o processo de divisão e em conseqüência o processo de *turnover* (o que não ocorre em neurônios). Em contrapartida a *D. melanogaster* permite estimar a contribuição de modificações epigenéticas ao processo de senescência, particularmente a detecção de eventos modificadores não enzimáticos como racemização, desaminação e glicosilação de proteínas, o que pode esclarecer vários aspectos antes de começar uma investigação do mesmo processo em vertebrados (Lee et al., 2001).

Os resultados deste trabalho demonstram que o tratamento com trans-resveratrol 1µM aumentou significativamente a longevidade de fêmeas e de machos, sugerindo que o tratamento desde as fases primordiais do desenvolvimento possa causar uma reprogramação genética. Verificou-se também que o tratamento com DMSO 0,03% aumentou a longevidade somente em machos, porém antecipou o pico de mortalidade em ambos os sexos.

Concluindo, o tratamento com trans-resveratrol aumentou longevidade do modelo experimental investigado, *Drosophila melanogaster*. Muitos estudos têm demonstrado que o aumento do dano oxidativo influencia a longevidade dos organismos e que a composição da dieta com a presença de fatores antioxidantes, como, por exemplo, o trans-resveratrol, minimizaria os efeitos deletérios do dano oxidativo.

REFERÊNCIAS

- CARVALHO, D., 2004. **AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MAÇÃ FUJI *IN NATURA* E DESIDRATADA NO TEMPO DE VIDA E EM INDICADORES DO METABOLISMO E DA FISIOLOGIA DE *Drosophila melanogaster***. THESIS OF DOCTORATE, COURSE OF GERIATRIA E GERONTOLOGIA, PONTIFÍCA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL.
- DA CUNHA, G.L., 2000. **MODULAÇÃO DO METABOLISMO ENERGÉTICO E DANO OXIDATIVO SOB COMPETIÇÃO LARVAL EM POPULAÇÕES DE DROSOPHILA MELANOGASTER SELECIONADAS PARA EXTREMOS DA VELOCIDADE DE DESENVOLVIMENTO E LONGEVIDADE EM DIFERENTES IDADES**. THESIS OF DOCTORATE, COURSE OF GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL.
- DRIVER, C., GEORGEOU A., 2003 **VARIABLE EFFECTS OF VITAMIN E ON DROSOPHILA LONGEVITY**. BIOGERONTOLOGY 4: 91-95.
- DUTRA, B.K., 2004. **EFEITO DO TRANS-RESVERATROL NO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO NO DANO OXIDATIVO E NA LONGEVIDADE DE DROPHILA MELANOGASTER EM DIFERENTES IDADES**. WORK OF CONCLUSION OF COURSE OF PHARMACIA, PONTIFÍCA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL.
- HALLIWELL, B., 1995 **ANTIOXIDANT CHARACTERIZATION - METHODOLOGY AND MECHANISM**. BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY 49 (10), 1341-1348.
- HARMAN, D., 1956. **AGING - A THEORY BASED ON FREE-RADICAL AND RADIATION-CHEMISTRY**. JOURNALS OF GERONTOLOGY 11 (3), 298-300.
- HARMAN, D., 1994. **AGING - PROSPECTS FOR FURTHER INCREASES IN THE FUNCTIONAL LIFE-SPAN**. AGE 17 (4), 119-146.
- HERTOG, M.G.L., DEVRIES, A., OCKE, M.C., SCHOUTEN, A., BUENODEMESQUITA, H.B., VERHAGEN, H., 1996 **OXIDATIVE DNA**

- DAMAGE IN HUMANS: COMPARISON BETWEEN HIGH AND LOW HABITUAL FRUIT AND VEGETABLE CONSUMPTION. BIOMARKERS 2 (4), 259-262.**
- HERTOG, M.G.L., FESKENS, E.J.M., HOLLMAN, P.C.H., KATAN, M.B., KROMHOUT, D., 1994. **DIETARY FLAVONOIDS AND CANCER RISK IN THE ZUTPHEN ELDERLY STUDY. NUTR. AND CANCER-AN INT J 22 (2), 175-184.**
- HERTOG, M.G.L., 1997. FESKENS, E.J.M., KROMHOUT D. **ANTIOXIDANT FLAVONOIDS AND CORONARY HEART DISEASE RISK. LANCET 349 (9053), 699-699.**
- HERTOG, M.G.L., KROMHOUT, D., ARAVANIS, C., BLACKBURN, H., BUZINA, R., FIDANZA, F., GIAMPAOLI, S., JANSEN, A., MENOTTI, A., NEDELJKOVIC, S., PEKKARINEN, M., SIMIC, B.S., TOSHIMA, H., FESKENS, E.J.M., HOLLMAN, P.C.H., KATAN, M.B., 1995. **FLAVONOID INTAKE AND LONG-TERM RISK OF CORONARY-HEART-DISEASE AND CANCER IN THE 7 COUNTRIES STUDY. ARCH. INT MED 155 (4), 381-386.**
- HININGER, I., CHOPRA, M., THURNHAM, D.I., LAPORTE, F., RICHARD, M.J., FAVIER, A., ROUSSEL, A.M., 1997. **EFFECT OF INCREASED FRUIT AND VEGETABLE INTAKE ON THE SUSCEPTIBILITY OF LIPOPROTEIN TO OXIDATION IN SMOKERS. EUR J CLIN N 51 (9), 601-606.**
- HOWITZ, K.T., BITTERMAN, K.J., COHEN, H.Y., LAMMING, D.W., LAVU, S., WOOD, J.G., ZIPKIN, R.E., CHUNG, P., KISIELEWSKI, A., ZHANG, L., SCHERER, B., SINCLAIR, D.A., 2003. **SMALL MOLECULE ACTIVATORS OF SIRTUINS EXTEND SACCHAROMYCES CEREVISIAE LIFESPAN. NATURE 425, 191-196.**
- KOHLMEIER, L., HASTINGS, S.B., 1995. **EPIDEMIOLOGIC EVIDENCE OF A ROLE OF CAROTENOIDS IN CARDIOVASCULAR-DISEASE PREVENTION. AM. J. CLIN. NUTR. 62 (6), S1370-S1376 SUPPL. S.**
- LEE, S.H., OE, T., BLAIR, I.A., 2001. **VITAMIN C-INDUCED DECOMPOSITION OF LIPID HYDROPEROXIDES TO ENDOGENOUS GENOTOXINS. SIENCE 292, 2083-2086.**

- LINTS, F.A., 1989. **THE RATE OF LIVING THEORY REVISITED.** EXP GERONTOL 35, 36-57.
- MIQUEL, J.J., ECÔNOMOS, A.C., 1982. **ANTIOXIDANTS, METABOLIC RATE AND AGING IN DROSOPHILA.** ARCH.EXP GERONTOL 1, 159-165.
- NESS, A.R., POWLES, J.W., 1997 **FRUIT AND VEGETABLES, AND CARDIOVASCULAR DISEASE. A REVIEW.** INTERNATIONAL JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY 26 (1), 1-13.
- OLIVEIRA, A.K., CORDEIRO, A.R., 1981 **GENETIC CONTROL OF DEVELOPMENTAL RATE AND A MOTHER FACTOR IN DROSOPHILA MELANOGASTER.** REV. BRAS. BIOL. 41, 635-644.
- PANIZZI, A.R., PARRA, J.R.P., 1991. **ECOLOGIA NUTRICIONAL DE INSETOS E SUAS IMPLICAÇÕES NO MANEJO DE PRAGAS.** ED. SÃO PAULO pp.35.
- STEINMETZ, K.A., POTTER, J.D., 1996 **VEGETABLES, FRUIT, AND CANCER PREVENTION. A REVIEW.** J. AM. DIET. ASSOC. 96 (10), 1027-1039.
- VALENZANO, D.R., TERZIBASI, E., GENADE, T., CATTANEO, A., DOMENICI, L., CELLERINO, A., 2006 **RESVERATROL PROLONGS LIFESPAN AND RETARDS THE ONSET OF AGE RELATED MARKERS IN A SHORT-LIVED VERTEBRATE.** CURR. BIOL. 16, 296–300.
- WILLIAMS, A.C., BARRY, B.W., 2004 **PENETRATION ECHANCERS.** ADV. DRUG DELIVER. REV. 56, 603-618.
- WOOD, J.G., ROGINA, B., LAVU, S., HOWITZ, K., HELFAND, S.L., TATAR, M., SINCLAIR, D., 2004. **SIRTUIN ACTIVATORS MIMIC CALORIC RESTRICTION AND DELAY AGEING IN METAZOANS.** NATURE 430, 686-689.
- ZINI, R., MORIN, C., BERTELLI, A., TILLEMENT, J.P., 1999 **EFFECTS OF RESVERATROL ON THE RAT BRAIN RESPIRATORY CHAIN.** DRUGS EXP CLIN RES 25 (2-3), 87-97.

EFEITO DO TRANS-RESVERATROL SOBRE O METABOLISMO DE GLICOGÊNIO EM *Drosophila melanogaster*

Resumo

O trans-resveratrol é uma fitoalexina natural encontrada em uvas, amoras, amendoim e muitas espécies de plantas, a qual é responsável pela proteção natural da uva contra doenças, onde sua concentração depende da origem geográfica, da variedade, dos métodos de fabricação do vinho. O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito do trans-resveratrol no metabolismo de carboidratos (glicogênio e atividade da enzima Glicogênio Fosforilase na sua forma ativa e total) de *Drosophila melanogaster* em diferentes idades (0, 7, 14, 18 e 21 dias). Espécimes de *D. melanogaster* foram colocadas em meio de cultura padrão adicionado de água ou dimetilsufóxido 0,03% (DMSO) ou ainda, trans-resveratrol na concentração de 1 μ M dissolvido em DMSO (0,03%) para ovoposição; seus ovos foram mantidos até a eclosão, durante a fase adulta os animais continuaram a receber os seus respectivos tratamentos. Os resultados indicam que tanto o tratamento com DMSO como com o trans-resveratrol modularam o metabolismo de carboidratos em fêmeas e em machos de forma diferenciada, o grupo do trans-resveratrol apresentou em ambos os sexos uma maior atividade enzimática no último período estudado; contudo, o trans-resveratrol não foi capaz de alterar a expressão gênica da enzima pesquisada (GFT), estes resultados podem sugerir que o trans-resveratrol, molécula que foi capaz de prolongar a vida dos animais utilizados neste estudo, esteja produzindo efeitos modulatórios através de seus metabólitos que atuam em cascatas de sinalizadores intracelulares, como por exemplo a desfosforilação da Akt, enzima diretamente ligada com o metabolismo de carboidratos através da glicogênio sintase, bem como possa modular a expressão de enzimas relacionadas a diferentes processos celulares. Esses efeitos metabólicos podem também ser responsáveis pelo aumento no período de vida.

PALAVRAS-CHAVES: Trans-resveratrol, DMSO, *Drosophila melanogaster*, Metabolismo de Glicogênio, Glicogênio Fosforilase

INTRODUÇÃO

O trans-resveratrol foi primeiramente detectado em uvas (*Vitis vinifera*) por Langcake & Pryce em 1976. Os autores verificaram que a produção deste composto pela planta deve-se a um mecanismo de proteção contra o ataque de fungos (principalmente *Botritis cinerea*) ou devido à exposição à luz ultravioleta. Posteriormente, Siemann & Creasy (1992) detectaram a presença do trans-resveratrol no vinho, sugerindo que essa substância seria o composto biologicamente ativo do vinho tinto. A partir de então começaram os estudos científicos sobre os efeitos biológicos do trans-resveratrol.

O trans-resveratrol age sobre os sistemas biológicos, já foi determinado que este anti-oxidante atua na inibição da peroxidação de lipídios (LDL, membranas), como quelante de cobre, como antioxidante bloqueador das reações com radicais livres, no aumento da síntese de eicosanóides, na inibição da agregação plaquetária, como potente antiinflamatório, como vasorelaxante, na modulação do metabolismo lipídico, na inibição da angiogênese, como anticancerígena, na inibição da atividade da ciclooxigenase (Ji Il, 2002). Também possui atividade estrogênica (Ji Il, 2002).

Zou *et al.* (2000), utilizando *D. melanogaster* como modelo biológico, verificaram que os genes envolvidos com a reprodução (família *Acp*), o metabolismo (genes envolvidos na glicólise), o *turnover* de proteínas, a cadeia respiratória (ciclo do ácido tricarboxílico nas mitocôndrias) e com os processos de detoxificação diminuem a sua expressão com o envelhecimento.

Em mamíferos, Lee *et al.* (1999), examinando eventos moleculares associados ao envelhecimento, analisaram a resposta transcricional de 6347 genes do músculo gastrocnêmio de camundongos. Estes autores verificaram que os efeitos do envelhecimento estão associados a alterações nos níveis de expressão de mRNA, tendo como reflexo mudanças marcantes na expressão gênica e na estabilidade do mRNA.

Hoje existem dezenas de mutações que sabidamente têm a capacidade de aumentar o período de vida em numerosos modelos biológicos (Bitterman *et al.*, 2003). Muitos dos genes envolvidos com a longevidade têm ação sobre o metabolismo intermediário e a superexpressão ou mutação desses genes leva ao aumento da expectativa de vida (Bitterman *et al.*, 2003). Dentre estes genes muitos estão diretamente envolvidos com a via de sinalização do metabolismo da glicose (CDC25, CYR1, GPR1, GPA2, RAS1, RAS2,

TPK1), com a biossíntese de NAD (NPT1, NMA1/2, PNC1, SIR2) e com a defesa antioxidante (SOD1/ SOD2 – citosólica, superóxido desmutase mitocondrial, *UTH1*- gene responsivo ao estresse oxidativo, mas ainda com função desconhecida) (Bitterman *et al.*, 2003).

Muitas mutações gênicas que levam ao aumento da expectativa de vida também conferem resistência ao estresse oxidativo (Johnson *et al.*, 2002). Estes dados fornecem apoio para a teoria de que os radicais livres (ROS) levam ao envelhecimento, pois quando acumulados ao longo da vida provocam danos oxidativos às macromoléculas (incluindo ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos) que levariam ao processo de envelhecimento e de morte (Harman, 1956; Beckman & Ames, 1998).

Beckman & Ames (1998) demonstraram que houve uma acentuada diminuição na expressão e na atividade de proteínas regulatórias do metabolismo intermediário durante o processo de envelhecimento. Genes associados com a bioenergética, com o *turnover* mitocondrial (adenosina 5'-triphosphate sintase A cadeia e o NADP transidrogenase), com a gênese mitocondrial, com a manutenção do DNA mitocondrial, têm sua expressão diminuída em cerca de duas vezes com o envelhecimento (Beckman & Ames, 1998).

Os genes envolvidos na via glicolítica e na via gliconeogênica (frutose-bifosfato aldolase e glicose-6-fosfato isomerase), no metabolismo do glicogênio, no *shunt* do glicerofosfato, no metabolismo de lipídios (esqualeno-sintase e estearoi-coenzima A desaturase) e no metabolismo de proteínas (EF-1-gama, 20S subunidade proteasoma, 26S componente proteasome TBP1, ubiquitina-tiolesterase, Unp ubiquitina-protease específica) também têm sua expressão diminuída com o envelhecimento (Beckman & Ames, 1998).

Tomalsky *et al.* (2001) verificaram em insetos holometabolos que o glicogênio serve como reserva de glicose para a utilização em diferentes pontos do ciclo de vida. Nos insetos, o glicogênio é mais abundante no corpo gorduroso, intestino e nos músculos das asas, embora também esteja depositado em outros tecidos com exceção da hemolinfa, onde os carboidratos estão representados pela trealose.

Estudo feito com populações de *D. melanogaster* longevas submetidas a baixas temperaturas mostrou que estes animais possuem uma maior reserva de glicogênio o que

está associada à produção de glicerol que auxilia a mosca a resistir às baixas temperaturas (Foley & Luckinbill, 2001). Por tal motivo, além do possível papel do glicogênio na atividade muscular relacionada ao vôo, à cópula e a ovoposição, a maior concentração acumulada deste polissacarídeo poderia auxiliar as moscas na sobrevivência aos ambientes hostis (Foley & Luckinbill, 2001).

Dutra et al. (2004) demonstrou os efeitos do trans-resveratrol sobre a modulação do metabolismo intermediário, do ciclo de vida e na lipoperoxidação em machos e fêmeas de *D. melanogaster*. Sobre o metabolismo de carboidratos o trans-resveratrol, administrado a partir do 1^o dia do ciclo de vida adulta, foi capaz de alterar o perfil metabólico em machos e fêmeas. Fêmeas tratadas com 1 μ M de trans-resveratrol diminuíram em 2,7 vezes os estoques de glicogênio aos 21 dias de vida, bem como as reservas protéicas (três vezes menor), contudo, aumentaram os níveis de lipídios totais e triacilgliceróis (Dutra *et al.*, 2004). Os autores sugerem que a quebra e/ou diminuição na síntese do glicogênio desvie carbonos para as rotas metabólicas envolvidas na síntese de lipídios, pois o tratamento com trans-resveratrol potencializou o armazenamento das reservas lipídicas, chegando a valores 200% mais elevados aos 21 dias de vida. O trans-resveratrol também alterou a fecundidade das fêmeas, reduzindo o índice de fertilidade. Este dado sugere que a manutenção das reservas de lipídios ocorre pelo menor gasto energético com a manutenção da reprodução, já que os lipídios são a principal fonte de energia utilizada no período reprodutivo (Dutra et al., 2004).

A lipoperoxidação é aproximadamente 100 vezes maior nos machos de *D. melanogaster* do que nas fêmeas. Nas fêmeas, o trans-resveratrol administrado desde o primeiro dia de vida adulta é capaz de reduzir a lipoperoxidação aos 7 e 21 dias do ciclo de vida, chegando a valores semelhantes àqueles verificados no primeiro dia de vida adulta. Já nos machos o trans-resveratrol é capaz de reduzir o dano oxidativo aos 14 e 21 dias de vida adulta, a um valor duas vezes mais baixo que o inicial (Dutra et al., 2004).

Em alguns insetos a glicogênio fosforilase tem sido isolada e purificada em diferentes tecidos, tendo sido constatada duas formas inconversíveis: a forma fosforilada a, cuja atividade é independente de 5'-AMP, e a forma desfosforilada b, que é ativa somente na presença de níveis elevados de 5'-AMP (Steele, 1982; Meyer-Fernandes *et al.*, 2000).

Geralmente as fosforilases dos insetos e dos vertebrados apresentam propriedades similares (Childress & Sacktor, 1970; Applebaum & Schlesinger, 1973; Dombradi *et al.*, 1985; Morishima & Sakurai, 1985; Vaandrager *et al.*, 1986; Van Marrewijk *et al.*, 1988; Ga'de, 1991; Burkhardt & Wegener, 1994; Arrese *et al.*, 1995). Em *Manduca sexta*, a fosforilase b tem sido purificada do músculo da asa do adulto (Burkhardt & Wegener, 1994) e do corpo gorduroso da larva (Arrese *et al.*, 1995).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do Trans-resveratrol, na concentração de 1µM, sobre os níveis de glicogênio, a atividade e a expressão gênica da enzima glicogênio fosforilase no ciclo de vida adulta de *Drosophila melanogaster*.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS E TRATAMENTOS

Foram utilizadas populações de *Drosophila melanogaster*, de linhagem Oregon-R, mantidas em laboratório, em vidros de cultura, a uma temperatura de 25±1°C, com umidade relativa de 70% e com luminosidade constante (24 horas de luz). Espécimes de *D. melanogaster* foram cultivadas em meio de cultura padrão, o qual contém 10% farinha de centeio, 5% açúcar mascavo, 1% de Nipagin (fungicida) e 1% de agar-agar, conforme descrito por Oliveira & Cordeiro (1981).

Os animais foram colocados em vidros contendo meio de cultura padrão com água (grupo Controle), ou com dimetilsulfóxido (DMSO - Merck) na concentração de 0,03%, ou com trans-resveratrol (Sigma) (1µM) diluído em DMSO (0,03%) para “ovoposição” durante 24 horas (overnight). Após os indivíduos eram retirados e seus ovos mantidos até a eclosão do adulto. Durante a fase adulta os animais continuaram a receber os seus respectivos tratamentos, sendo transferidos duas vezes por semana para novos vidros de cultura a fim de renovar o meio e o tratamento até sua morte. Cabe ressaltar que foram realizadas 5 coortes para avaliação do metabolismo. Os animais foram coletados nas idades de 0, ou seja, menos de um dia após a emersão em adulto, 7, 14 e 21 dias após a emersão do imago (vida adulta), para as análises bioquímicas.

Antes do início das dosagens bioquímicas, os animais foram crioadestesiados e separados por sexo. Os animais foram utilizados sempre no mesmo horário e em seguida congelados, ficando em freezer (-80°C) até serem analisados.

Um grande número de trabalhos na literatura tem descrito a atividade do DMSO como promotor de penetração. Os estudos mostram que este solvente é eficaz tanto para promover a penetração de permeante hidrofílicos como lipofílicos (Williams e Barry, 2004). O DMSO, como outros solventes orgânicos, tem atividade antioxidante que pode tanto ser benéfica, quando utilizado em baixas concentrações, como causar danos que vão da toxicidade até a morte quando utilizados em concentrações elevadas. Assim um grupo controle com DMSO na concentração de 0,03% fez-se necessário. Cabe ressaltar que na literatura consultada é o DMSO o solvente comumente utilizado para diluir o trans-resveratrol. Foi utilizada a menor concentração (0,03%) de DMSO citada na literatura, tendo sido encontrados trabalhos que utilizam até 10%.

DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

1. Glicogênio

O glicogênio foi extraído de uma amostra de 20 animais e determinado em quintuplicata segundo o método de Van Handel (1965), sendo o glicogênio quantificado como glicose (método da glicose oxidase), após hidrólise ácida (HCl) e neutralização (Na₂CO₃) (Geary *et al.*, 1981). A glicose foi quantificada utilizando-se o Kit de Glicose Oxidase (Labest). Os resultados são expressos em mg/g de animais.

2. Proteína

A concentração de proteínas totais foi determinada em quintuplicata pelo método de Lowry *et al.* (1951) utilizando-se a albumina bovina como padrão (Sigma). Os resultados são expressos em mg/ml de homogeneizado.

3. Glicogênio Fosforilase

A atividade Glicogênio Fosforilase foi medida *in vitro* no sentido da síntese de glicogênio na presença de altas concentrações de glicose-1-fosfato. O Pi quantificado foi liberado da glicose-1-fosfato quando da sua ligação à molécula de glicogênio ou de UDPG.

A atividade da enzima glicogênio fosforilase foi medida em amostra de 10 animais em quintuplicata, pelo método de Scapin & Di Giuseppe (1993) modificado por Oliveira *et al.* (2001). Para a determinação da atividade da enzima glicogênio fosforilase total (GFT), a mistura para ensaio continha NaF 100mM, EDTA 5mM, citrato de sódio 20mM, AMP 2mM, tendo o meio final pH 6,5. Para medida da atividade da enzima glicogênio fosforilase a (GFA) utilizou o meio descrito acima, porém adicionado de cafeína 0,5mM. Do homogeneizado centrifugado (800g) retirou-se 50µl e incubou-se a 30°C por 30 minutos com agitação constante em 100µl da mistura de reação para GFT ou GFA. A reação foi iniciada pela adição de glicose-1-fosfato 50mM e interrompida pela adição de 200µl de TCA 10% gelado. A atividade é expressa em nmoles de Pi liberado da glicose-1-fosfato .mg⁻¹proteína.min⁻¹

4. Expressão Gênica

O RNA total foi extraído segundo método Chomczynski e Sacchi (1987), usando para extração guanidina tiocianato fenol clorofórmio.

Foram feitas as avaliações dos níveis de mRNA da enzima Glicogênio Fosforilase na forma total (GFT). Uma quantidade de 5µg de mRNA total, foram transcritos reversamente com a utilização do kit para a síntese de cDNA SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Na reação de PCR foi utilizado 1µl de cDNA para um volume final de 50 µl usando o kit PCR supermix (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Um par de oligonucleotídeos específicos, desenhados a partir da seqüência do cDNA da glicogênio fosforilase de *Drosophila melanogaster* (NM164453) (3'-ACCTGCACTACACCCTGGTC-5' / 5'-TGAGCTGGAGTCCTCATCCT-3') produziu um fragmento com um tamanho de 186 pb. Um par de oligonucleotídeos do 28S de *Drosophila melanogaster* (AF191295) (3'-GCGAAAAGAAAACAGTTCAGC-5' / 3'-GAAGGACTTAAATCGTTAATTTCTCA-5') produziu um fragmento com um tamanho de 111pb o qual foi utilizado como o normalizador das análises.

O PCR foi feito em um termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.) que consistia para a glicogênio fosforilase de 25 ciclos de desnaturação a 94⁰C por 1min, anelamento a

59°C por 1min e extensão a 72°C por 1min e para o 28S de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento a 55°C por 1min e extensão a 72°C por 1min.

Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1,3 % contendo Brometo de Etídio e quantificados por densitometria óptica através do equipamento ImageMaster® VDS (Pharmacia Biotech).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. Os resultados obtidos ao longo da vida adulta foram avaliados por análise de variância de uma via com teste de comparação de Bonferroni e a comparação entre os sexos e entre os diferentes tratamentos por ANOVA de duas vias. Foi adotado o nível de significância de $p < 0,05$ e as análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistical Package for the Social Science Versão 11.0 (SPSS) for Windows.

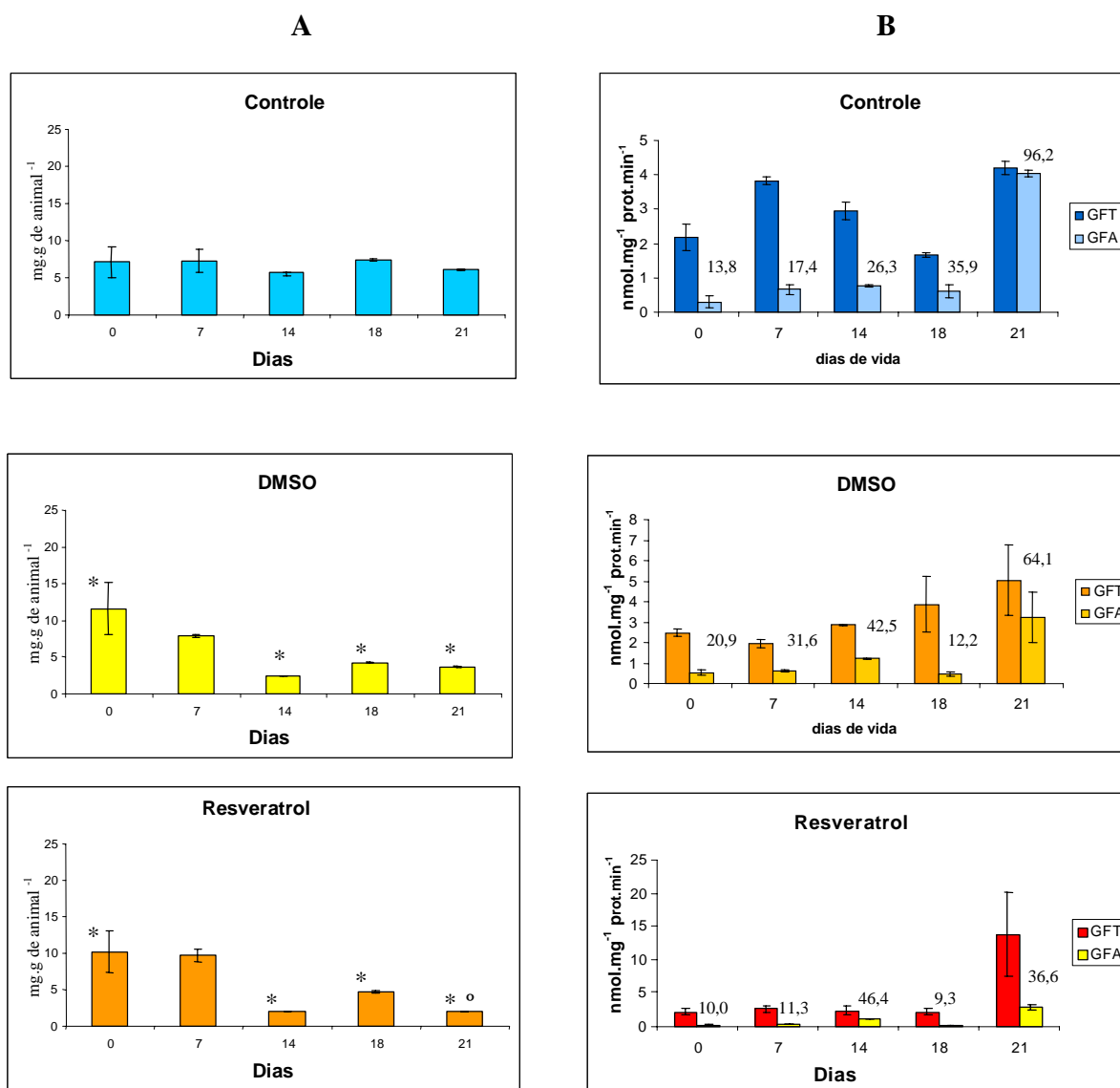


Figura 1: Efeito do trans-resveratrol (1 μ M) sobre a concentraço de glicogenio (A) e atividade da glicogenio fosforilase nas formas total (GFT) e na forma ativa (GFA) (B) em femeas de *D. melanogaster* durante o ciclo de vida adulta. Os numeros representam a porcentagem da forma ativa em relaao a forma total da enzima glicogenio fosforilase. Foi realizado um grupo com DMSO 0,03%. * representa diferenas significativas em relaao ao grupo Controle e ° representa diferenas significativas em relaao o grupo DMSO, com um $p < 0,05$.

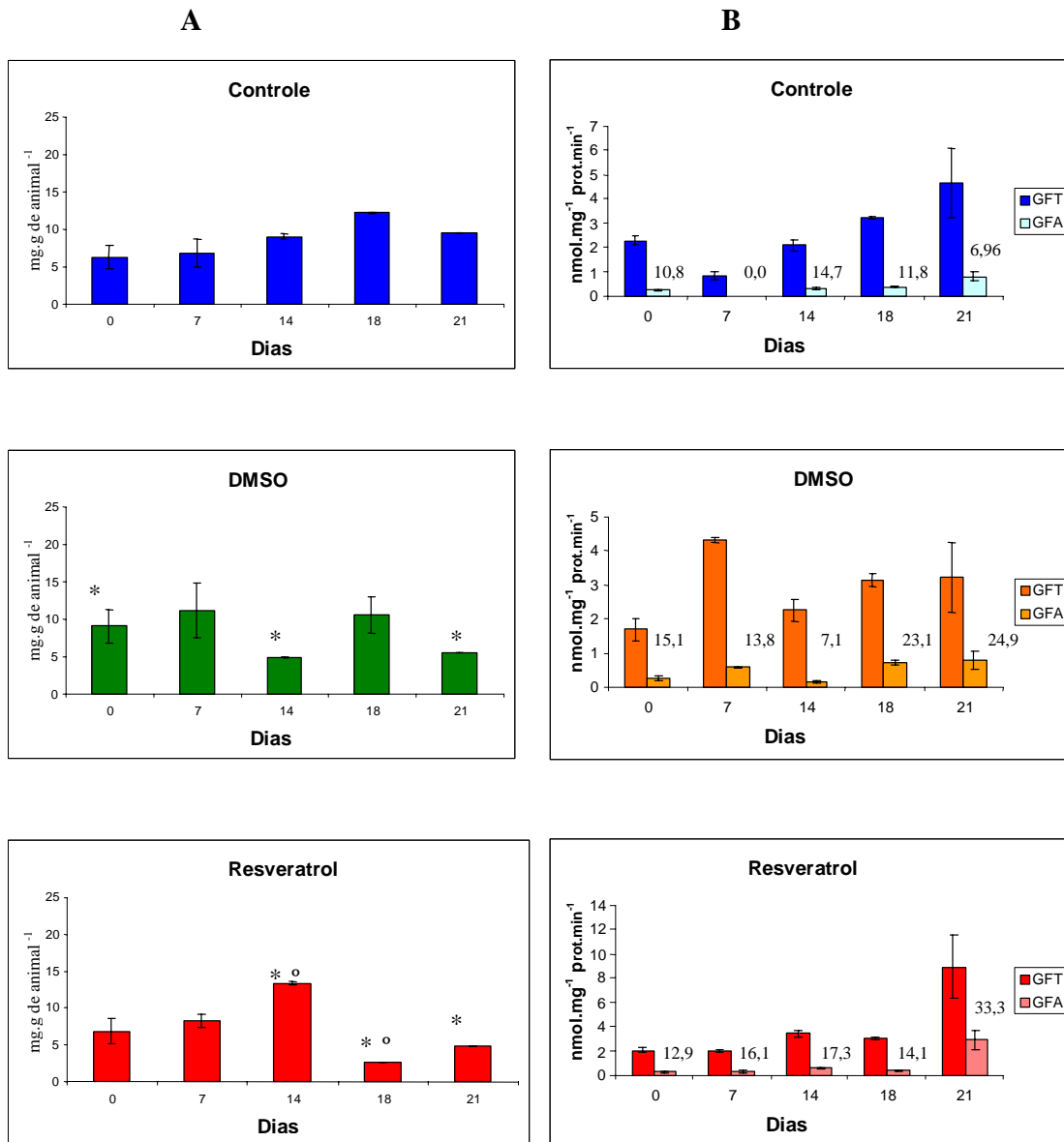


Figura 2: Efeito do trans-resveratrol (1µM) sobre a concentração de glicogênio (A) e atividade da glicogênio fosforilase nas formas total (GFT) e na forma ativa (GFA) (B) em machos de *D. melanogaster* durante o ciclo de vida adulta. Os números representam a porcentagem da forma ativa em relação à forma total da enzima glicogênio fosforilase. Foi realizado um grupo controle com DMSO 0,03%. Cada amostra continha 10 moscas de cada grupo. As barras verticais representam à média \pm erro padrão. * representa diferenças significativas em relação ao grupo Controle e ^o representa diferenças significativas em relação o grupo DMSO, com um $p < 0,05$.

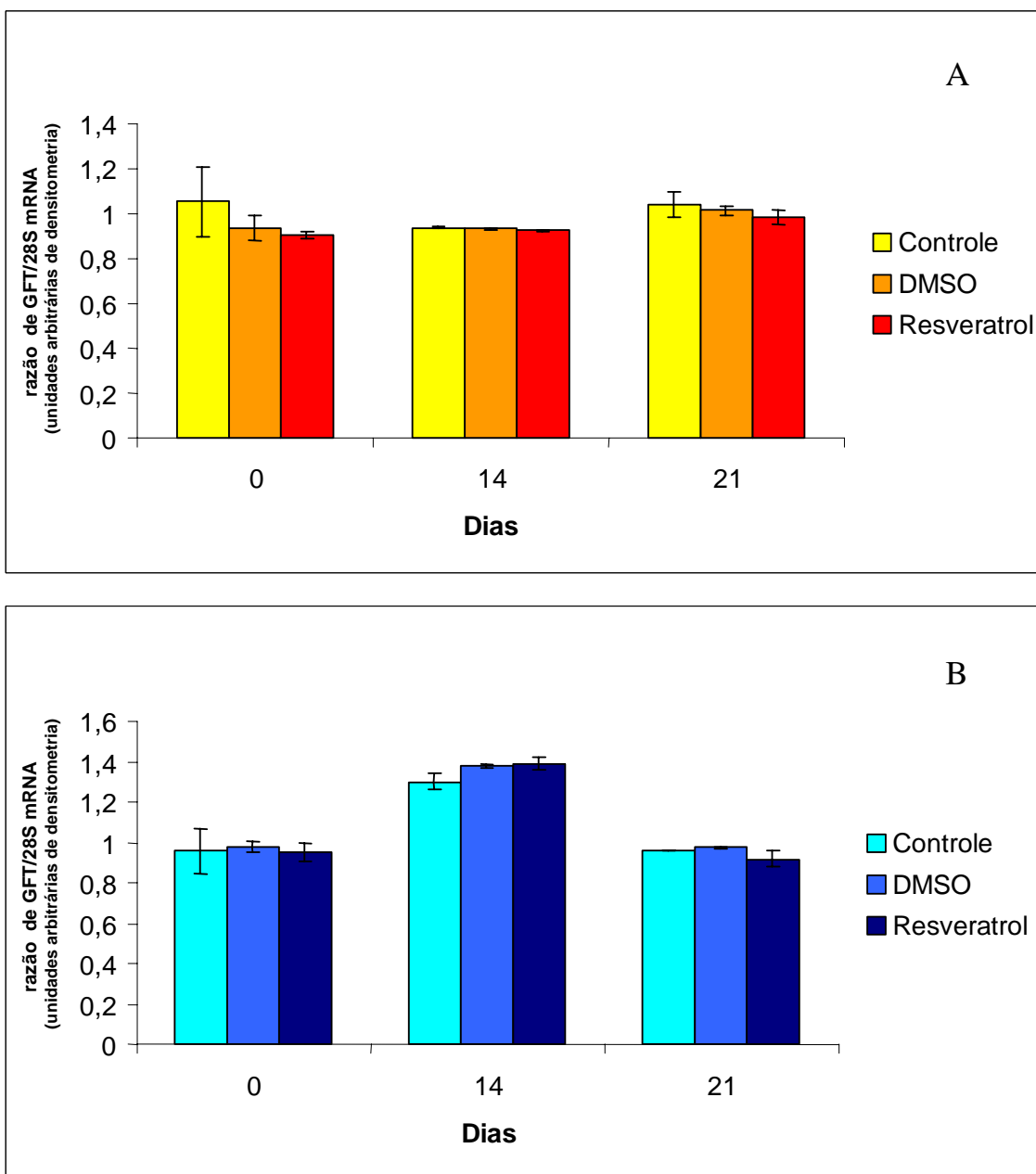


Figura 3: Expressão mRNA da enzima glicogênio fosforilase em fêmeas (A) e machos (B) de *D. melanogaster* ao longo de seu período de vida adulta. Os animais foram tratados desde a fase larval com água (Controle), DMSO 0,03% (DMSO) ou trans-resveratrol 1 μ M (Trans-resveratrol). O gen normalizador utilizado foi o 28S (C).

RESULTADOS

Em fêmeas do grupo controle pode-se verificar que não houve variação significativa ao longo do ciclo de vida adulta nos níveis de glicogênio (Fig. 1A)

As fêmeas tratadas com DMSO 0,03% e trans-resveratrol começam o ciclo de vida adulta com níveis significativamente ($P<0,05$) mais elevados de glicogênio ($10-11 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de animal ao zero dia) que as moscas controle. Entretanto, os valores de glicogênio diminuem significativamente ($P<0,05$) aos 14 dias de vida nos grupos tratamentos com DMSO 0,03% e com trans-resveratrol. Aos 18 dias constata-se uma elevação de cerca de 2 vezes na concentração de glicogênio dos dois grupos, contudo, os valores ainda são significativamente ($P<0,05$) mais baixos que os iniciais. Entretanto, aos 21 dias no grupo tratado com trans-resveratrol ocorre uma redução significativa ($P<0,05$) dos valores de glicogênio. Nos animais tratados com DMSO 0,03% os valores de glicogênio aos 21 dias são semelhantes àqueles verificados aos 14 dias de vida.

Nos animais controle observa-se que a atividade da GFT ao zero dia de vida pós-imago, está em torno de $2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína. Estes valores aumentam cerca de 2 vezes ($P<0,05$) entre os 7 e 14 dias de vida, diminuindo significativamente ($P<0,05$) aos 18 dias de vida. Aos 21 dias de vida, a atividade da GFT aumenta ($p<0,05$) a valores semelhantes àqueles constatados aos 7 dias de vida (Fig. 1B).

A atividade da GFA no início do ciclo de vida é de cerca de $0,3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína; aos 7 dias de vida os valores aumentam cerca de duas vezes ($P<0,05$) e mantêm-se estáveis até os 18 dias. Aos 21 dias de vida a atividade da GFA aumenta sete vezes ($P<0,05$) em relação aos 18 dias de vida e 14 vezes ($P<0,05$) em relação ao 0 dia de vida (Fig. 1B).

A atividade da GFT de animais tratados com DMSO 0,03% após a emersão do imago é de cerca de $2,4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína. Aos 18 dias esta atividade aumenta significativamente ($P<0,05$) para cerca de $4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína) até alcançar aos 21 dias do ciclo de vida valores 2 vezes ($P<0,05$) maiores que aqueles verificados ao 0 dia de vida (Fig. 1B).

A atividade da GFA mantém-se estável entre os dias 0 e 7. Aos 14 dias a atividade da GFA aumenta 2 vezes ($P<0,05$), retornando a valores semelhantes aos iniciais aos 18

dias de vida. Contudo, aos 21 dias de vida atinge valores significativamente ($P < 0,05$) mais elevados que aqueles constatados nos períodos de vida anteriores (Fig.1B).

As fêmeas tratadas com trans-resveratrol no início do ciclo de vida apresentam valores de atividade da glicogênio fosforilase total de cerca de $2,1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína, mantendo-se estáveis até os 18 dias do ciclo de vida. Aos 21 dias de vida a atividade da GFT em moscas tratadas com trans-resveratrol eleva-se 4 vezes ($P < 0,05$).

Já a forma ativa da glicogênio fosforilase apresenta valores em torno de $0,2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína ao zero dia de vida, aumentando significativamente ($P < 0,05$) aos 14 dias de vida, retornando a valores semelhantes ao 0 dia de vida aos 18 dias ($P < 0,05$). Contudo, aos 21 a atividade volta a subir significativamente ($P < 0,05$), atingindo valores 3 vezes mais elevados que aqueles constatados nos outros tempos de vida (Fig.1B).

Nos machos do grupo controle a concentração de glicogênio aumenta gradualmente até os 18 dias de vida. Aos 18 dias de vida os valores de glicogênio atinge níveis 2 vezes ($P < 0,05$) maiores que aqueles verificados no dia 0 de vida, mantendo-se elevados até o final do período experimental (21 dias) (Fig.2A).

Os animais tratados com DMSO 0,03% começam o ciclo de vida com níveis de glicogênio significativamente ($P < 0,05$) maiores que aqueles verificados em machos do grupo controle aos 0 dia. Constata-se aos 14 e 21 dois momentos de redução em cerca de 50% ($P < 0,05$) da concentração de glicogênio (Fig. 2A).

Os machos tratados com trans-resveratrol apresentam níveis de glicogênio semelhantes ao do grupo controle ao 0 dia de vida. Aos 14 dias de vida a concentração de glicogênio aumenta significativamente ($P < 0,05$); diminuindo a valores significativamente menores que os verificados entre 0-14 dias de vida aos 18 dias. Aos 21 dias constata-se um aumento de cerca de 50% ($P < 0,05$) nos níveis de glicogênio quando comparados aqueles verificados aos 18 dias de vida (Fig. 2A).

Nos animais controle observa-se que a atividade da GFT diminuiu cerca de 50% ($P < 0,05$) aos 7 dias e aumentando a valores semelhantes aos iniciais aos 14 dias de vida. Contudo, aos 21 dias de vida constata-se valores 50% maiores ($P > 0,05$) na atividade da GFT quando comparados àqueles obtidos ao 0 dia. Ao longo dos 21 dias de vida, a atividade da GFA apresentou um perfil semelhante aquele verificado para a atividade da GFT nos animais controle (Figura 2B).

Nos animais tratados com DMSO 0,03% a atividade da GFT aumentou significativamente ($P < 0,05$) aos 7 dias, mantendo-se sem alterações significativas até o final do período experimental. Nestas moscas a atividade da GFA apresenta 3 picos de aumento significativo quando comparados ao 0 dia de vida: aos 7, 18 e 21 dias de vida (Fig. 2B).

Os machos tratados com trans-resveratrol a atividade da GFT e GFA mantêm-se sem alterações significativas até os 18 dias de vida. Contudo, aos 21 dias de vida verifica-se um aumento significativo ($P < 0,05$) nas atividades da GFT e GFA (Fig. 1B).

Em fêmeas o trans-resveratrol não alterou significativamente a expressão do mRNA da GFT quando comparada aos grupos controle e DMSO 0,03% ao longo do período experimental (Fig. 3A).

Em machos verifica-se um aumento significativo ($P < 0,05$) da expressão do mRNA da GFT aos 14 dias de vida em todos os grupos experimentais. O trans-resveratrol não alterou significativamente a expressão do mRNA da GFT no período experimental estudado (Fig. 3B).

DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que o trans-resveratrol foi capaz de modular o metabolismo de carboidratos em fêmeas e em machos de forma diferenciada; contudo, este composto não foi capaz de alterar a expressão gênica da glicogênio fosforilase total.

Segundo Rauser *et al.* (2005) é possível que diferentes populações de uma mesma linhagem de *Drosophila melanogaster* apresentem índice de fecundidade, mortalidade e idades reprodutivas distintas, pois estas variáveis são influenciadas pelas condições de cultivo adotadas. A população de *D. melanogaster* da linhagem Oregon-R utilizada para o presente estudo tem seu pico reprodutivo aos 14 dias de vida, período no qual as fêmeas utilizam os lipídios e as proteínas para a reprodução e o glicogênio para a manutenção das funções básicas do organismo (Dutra, 2004). Os resultados do grupo controle mostraram que em fêmeas e machos o controle da mobilização e síntese de glicogênio seria determinado pela relação entre a glicogênio sintase e fosforilase nas suas formas ativas, como o ocorre em outros invertebrados e vertebrados (Pereira et. al., 1995; Oliveira et al.,

2001). Contudo, será necessário determinar a atividade da glicogênio sintase nas suas formas ativa e total para confirmar estes resultados.

O trans-resveratrol nas concentrações de 1^{-11} - 10^{-4} M foi capaz de diminuir a atividade da cadeia respiratória em cérebro de ratos, reduzindo o consumo total de oxigênio (Zini *et al.*, 1999). Dutra (2004) sugerem que a inibição da cadeia respiratória por ação do trans-resveratrol alteraria a relação ATP/ADP, favorecendo com isto, uma diminuição da síntese e/ou aumento da degradação do glicogênio com o intuito de disponibilizar esqueletos de carbono para a via glicolítica e estabilizar os níveis de ATP intracelular.

Dutra (2004) trabalhando com *D. melanogaster* propuseram que a glicose provinda da quebra do glicogênio nos indivíduos tratados com trans-resveratrol seria utilizada para a síntese de gorduras. Segundo Nascimento (2002), a mosca-da-fruta, *Anastrepha fraterculus*, converte carboidratos em lipídios quando submetida às dietas com diferentes concentrações de proteínas e carboidratos, ao longo do ciclo de vida adulta.

Neste trabalho, os animais tratados com DMSO 0,03% e com Trans-resveratrol $1\mu\text{M}$ emergem como adultos com uma maior concentração de glicogênio que os animais controle, o que pode beneficiar estes animais no seu ciclo de vida adulto, pois já foi descrito por vários autores a importância deste polissacarídeo para os insetos. Um estudo feito com populações de *D. melanogaster* selecionadas para tempo de vida aumentado e submetidas a baixas temperaturas mostrou que as moscas mais longevas possuem uma maior reserva de glicogênio que está associada à produção de glicerol que auxilia a mosca a resistir às baixas temperaturas. Por tal motivo, além do possível papel do glicogênio na função muscular relacionada com vôo, cópula e ovoposição, a maior quantidade acumulada de glicogênio poderia auxiliar as moscas a sobreviver em ambientes hostis (Foley & Luckinbill, 2001).

Nesta dissertação foi verificado que o trans-resveratrol na concentração de $1\mu\text{M}$ foi capaz de aumentar a longevidade de *D. melanogaster* em 127% e 50%, em fêmeas e machos, respectivamente. Para animais longevos a diminuição das reservas de glicogênio pode ser um fator determinante para a sobrevivência dessas moscas. Diversos autores propõem que as mutações que diminuem a transdução do sinal de insulina/IGF-I em *Drosophila* e *C. elegans* aumentariam a expressão de enzimas como superóxido dismutase, a capacidade de resposta a diferentes tipos de estresse e aumentaria a longevidade (Rissanen *et al.*, 2003; Longo & Finch, 2003; Lamitina *et al.*, 2005; Porte Jr *et al.*, 2005).

Estudos futuros, visando determinar as concentrações de glicogênio e a atividade da glicogênio fosforilase em animais mais longevos serão de fundamental importância.

Dutra *et al.* (2006), estudando o desenvolvimento ontogenético de *Anastrepha fraterculus*, sugerem que estes animais utilizam o glicerol obtido da hidrólise dos triglicerídeos como substrato para a via gliconeogênica. Os autores sugerem também que o glicogênio é a fonte principal da energia para a diferenciação do adulto e como reserva metabólica para a reprodução. Webster *et al.* (1979) mostrou que fêmeas de *Rhagoletis pomonella*, consomem mais carboidratos do que os machos nos primeiros dias de vida adulta, provavelmente pelos movimentos mais intensos do corpo, da produção de ovos e pela procura de hospedeiro. A ingestão dos carboidratos pelas fêmeas aumentou mais na primeira semana da vida do adulto, diminuiu nas segundas e terceiras semanas, e permaneceu então estável até o fim da experiência (45 dias). Canato & Zucoloto (1998) trabalhando com *C. capitata* verificaram que os açúcares são os nutrientes mais importantes para fêmeas adultas, pois substituem a fonte protéica na produção dos ovos, embora a produção de ovos aumente quando os animais ingerem proteínas. Desta forma, os dados acima expostos corroboram com a hipótese de que o glicogênio seria um substrato energético utilizado para aumentar a longevidade e manutenção da espécie em moscas das frutas.

Dutra (2004) verificaram que os machos dos grupos controle e DMSO 3% apresentaram valores de glicogênio significativamente mais altos aos 14 e 21 dias do ciclo de vida, quando comparados ao dia zero. Já nos animais tratados com trans-resveratrol este polissacarídeo se manteve constante até os 14 dias do ciclo de vida, aumentando significativamente ao final do período de estudo. Apesar de o trabalho de Dutra (2004) ter sido realizado com *D. melanogaster* linhagem Oregon-R os resultados encontrados foram distintos dos apresentados no presente estudo porque a autora administrou aos insetos o trans-resveratrol apenas após a eclosão do imago, ou seja, os animais sofreram um tratamento somente na vida adulta e com DMSO em uma concentração 100 vezes maior, enquanto que os dados aqui apresentados são de animais tratados desde as fases primordiais do desenvolvimento ontogenético.

Em nosso estudo, devido ao tratamento dos diferentes grupos (DMSO e trans-resveratrol) ter sido iniciado desde a fase larval, parece ter ocorrido uma modulação do

metabolismo de glicogênio desde as fases primordiais do desenvolvimento, ocorrendo uma reprogramação genética em diversos genes, já que os cromossomos nesta fase estão muitos mais expostos a este controle do que na idade adulta.

Quando observa-se a curva de expressão do mRNA da glicogênio fosforilase em fêmeas e em machos verifica-se que o trans-resveratrol não alterou a expressão gênica desta enzima. Contudo, em machos a expressão do mRNA da glicogênio fosforilase aumenta significativamente em todos os grupos experimentais aos 14 dias de vida. Este aumento da expressão gênica foi seguido pelo aumento da atividade da enzima na forma total em todos os tratamentos experimentais.

Os dados encontrados sugerem que o tratamento com trans-resveratrol alterou a atividade enzimática em fêmeas e machos, contudo, não teve efeito sobre a expressão gênica da glicogênio fosforilase.

Recentes estudos têm levantado à hipótese que os efeitos de flavonóides e outras fitoalexinas como o resveratrol, em baixas concentrações, não seriam por suas ações antioxidantes, mas por seus metabólitos atuando como sinalizadores intracelulares alterando a fosforilação de diversas enzimas relacionadas a diversos processos celulares (Williams et al., 2004). Estudos com resveratrol demonstraram que a molécula inibiria a atividade de proteínas kinase, através da ligação com sítios de ATP, o que produziria mudança na estrutura tridimensional e conduziria a inatividade (Williams et al., 2004).

Outra hipótese possível se deve ao fato do trans-resveratrol diminuir as concentrações de *insulin-like* circulantes e como a enzima glicogênio sintase é estimulada por este hormônio, a diminuição deste estímulo conduziria a desfosforilação da AKT, e com uma conseqüente ativação da GSK-3, o que aumenta a taxa de fosforilação da glicogênio sintase, diminuindo sua atividade (Wiel, 1998; Carvalheira *et al.*, 2002).

Ao final deste trabalho pode-se concluir que o trans-resveratrol afetou o metabolismo de glicogênio de forma diferente em fêmeas e machos, assim como não pode-se negar que o DMSO 0,03% também foi capaz de modular o metabolismo deste polissacarídeo. O trans-resveratrol foi capaz de alterar o metabolismo de glicogênio sem alterar a expressão da enzima estudada (glicogênio fosforilase); o que talvez possa ser explicado pelo fato dos animais terem sido tratados desde as fases iniciais do desenvolvimento ocorrendo assim, uma reprogramação genética neste período. Outra

hipótese é que a dose administrada aos animais seja capaz de modular a forma como os machos e as fêmeas utilizam suas reservas, mas não foi capaz de modular a expressão dos genes que regulam a glicogênio fosforilase.

REFERÊNCIAS

- APPLEBAUM SW., SCHLESINGER HM., 1973. **REGULATION OF LOCUST FATBODY PHOSPHORYLASE**. *BIOCHEM. J.*; 135, 37–41.
- ARRESE EL., ROJAS-RIVAS BI., WELLS MA., 1995. **PURIFICATION AND PROPERTIES OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE FROM THE FAT BODY OF LARVAL *MANDUCA SEXTA***. *INSECT BIOCHEM. MOLEC. BIOL.*; 25, 209–216.
- BECKMAN KB, AMES BN., 1998. **THE FREE RADICAL THEORY OF AGING MATURES**. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*; 78 (2), 547-581.
- BITTERMAN KJ; MEDVEDIK O; SINCLAIR DA., 2003. **LONGEVITY REGULATION IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. LINKING METABOLISM, GENOME STABILITY, AND HETEROCHROMATIN**. *MICROB. MOL. BIOL. REV.* SEPT ; pp. 376-399.
- BURKHARDT G., WEGENER G., 1994. **GLYCOGEN PHOSPHORYLASE FROM FLIGHT MUSCLE OF THE HAWK MOTH, *MANDUCA SEXTA*. PURIFICATION AND PROPERTIES OF THREE INTERCONVERTIBLE FORMS AND THE EFFECT OF FLIGHT ON THEIR INTERCONVERSION**. *J. COMP. PHYSIOL.* B164: 261–271.
- CANATO CM., ZUCOLOTO FS., 1998. **FEEDING BEHAVIOR OF *CERATITIS CAPITATA* (DIPTERA: TEPHRITIDAE). INFLUENCE OF CARBOHYDRATE INGESTION**. *J. INSECT. PHYSIOL.*; 44, 149-155.
- CAVALHEIRA JBC., ZECCHIN HG., SAAD, MJA., 2002. **VIAS DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA**. *ARQ BRAS ENDOCRINOL METAB*; VOL 46 N° 4.
- CHILDRESS CC., SACKTOR B., 1970. **REGULATION OF GLYCOGEN METABOLISM IN INSECT FLIGHT MUSCLE. PURIFICATION AND PROPERTIES OF PHOSPHORYLASES *IN VITRO* AND *IN VIVO***. *J. BIOL. CHEM.*; 11: 2927–2936.
- CHOMCZYNSKI P, SACCHI N., 1987. **SINGLE-STEP METHOD OF RNA ISOLATION BY ACID GUANIDINIUM THIOCYANATE-PHENOL-CHLOROFORM EXTRACTION**. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*; 162: 156 –159.

- DOMBRADI V., HADJU J., FRIEDRICH P., BOT G., 1985. **PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE FROM *DROSOPHILA MELANOGASTER***. *INSECT BIOCHEM.*; 15: 403–410.
- DUTRA BK., 2004. **EFEITO DO TRANS-RESVERATROL NO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO NO DANO OXIDATIVO E NA LONGEVIDADE DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* EM DIFERENTES IDADES**. TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE FARMÁCIA DA PUCRS, BRAZIL.
- DUTRA BK., FERNANDES FA., QUADROS FC., NASCIMENTO JC., OLIVEIRA GT. **ANALYSIS OF INTERMEDIATE METABOLISM THROUGHOUT THE ONTOGENETIC DEVELOPMENT OF *ANASTREPHA FRATERCULUS* (WIEDMAN,1830) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) (IN PRESS)**. *COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY A- MOLECULAR AND INTEGRATIVE PHYSIOLOGY*, 2006.
- FERNANDES FA., DUTRA BK., SCHEIN V., OLIVEIRA GT., DA SILVA RSM., 2005. **EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TRANS-RESVERATROL SOBRE LONGEVIDADE DE *DROSOPHILA MELANOGASTER***. XX REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADE DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, FESBE.
- FOLEY PA., 2001. LUCKINBILL LS. **THE EFFECTS OF SELECTION FOR LARVAL BEHAVIOR ON ADULT LIFE-HISTORY FEATURES IN *DROSOPHILA MELANOGASTER***. *EVOLUTION*; 55 (12): 2493-2502.
- GÄRDE G., 1991. **GLYCOGEN PHOSPHORYLASE IN THE FAT BODY OF TWO COCKROACH SPECIES, *PERIPLANETA AMERICANA* AND *NAUPHOETA CINEREA*. ISOLATION, PARTIAL CHARACTERIZATION OF THREE FORMS AND ACTIVATION BY HYPERTREHALOSAEMIC HORMONES**. *Z. NATURFORSCH.*; 46: 149–162.
- GEARY N., LANGHANS W., SCHARRER E., 1981. **METABOLIC CONCOMITANTS OF GLUCAGON-INDUCED SUPPRESSION OF FEEDING IN THE RAT**. *AM. J. PHYSIOL.*; 241: R330–R335.

- HARMAN D., 1956. **AGING - A THEORY BASED ON FREE-RADICAL AND RADIATION-CHEMISTRY.** JOURNALS OF GERONTOLOGY; 11 (3): 298-300.
- JI LL., 2002. **INCREASING HEALTHY LIFE SPAN. CONVENTIONAL MEASURES AND SLOWING THE INNATE AGING PROCESS.** ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES; 959: 82-92.
- JOHNSON TE, HENDERSON S, MURAKAMI S, DE CASTRO E, DE CASTRO SH, CYPSEY J, RIKKE B, TEDESCO P, LINK C., 2002. **LONGEVITY GENES IN THE NEMATODE CAENORHABDITIS ELEGANS ALSO MEDIATE INCREASED RESISTANCE TO STRESS AND PREVENT DISEASE.** JOURNAL OF INHERITED METABOLIC DISEASE; 25 (3): 197-206.
- LAMITINA ST, STRANG K., 2005. **TRANSCRIPTIONAL TARGETS OF DAF-16 INSULIN SIGNALING PATHWAY PROTECT C. ELEGANS FROM EXTREME HYPERTONIC STRESS.** AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY – CELL PHYSIOLOGY; 288: C467-C474.
- LANGCAKE P, PRYCE RJ., 1976. **PRODUCTION OF RESVERATROL BY VITIS-VINIFERA AND OTHER MEMBERS OF VITACEAE AS A RESPONSE TO INFECTION OR INJURY.** PHYSIOL PLANT PATHOLOGY; 9 (1): 77-86.
- LEE CK, KLOPP RG, WEINDRUCH R, PROLLA TA., 1999. **GENE EXPRESSION PROFILE OF AGING AND ITS RETARDATION BY CALORIC RESTRICTION.** SCIENCE; 285 (5432): 1390-1393.
- LEE SH., OE T., BLAIR IA., 2001. **VITAMIN C-INDUCED DECOMPOSITION OF LIPID HYDROPEROXIDES TO ENDOGENOUS GENOTOXINS.** SIENCE; 292: 2083-2086.
- LONGO VD, FINCH CE., 2003. **EVOLUTIONARY MEDICINE. FROM DWARF MODEL SYSTEMS TO HEALTHY. CENTENARIANS;** 299:1342-46.
- LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FAU A.L., RANDAL R.J., 1951. **PROTEIN MENASUREMENTS WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT.** J. BIOL. CHEM.; 183: 265-275.

- MASORO E.J., 1992. **POTENTIAL ROLE OF THE MODULATION OF FUEL USE IN THE ANTIAGING ACTION OF DIETARY RESTRICTION.** ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES; 663: 403-41.
- MEYER- FERNANDES J., ARRESE EL., WELLS MA., 2000. **ALLOSTERIC EFFECTORS AND TREHALOSE PROTECT LARVAL *MANDUCA SEXTA* FAT BODY GLYCOGEN PHOSPHORYLASE B AGAINST THERMAL DENATURATION.** INSECT BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY; 30: 473–478.
- MORISHIMA I., SAKURAI S., 1985. **PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE B FROM FAT BODY OF THE SILK WORM *BOMBYX MORI*.** COMP. BIOCHEM. PHYSIOL. 81B: 453–458.
- OLIVEIRA AK., CORDEIRO AR., 1981. **GENETIC CONTROL OF DEVELOPMENTAL RATE AND A MOTHER FACTOR IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*.** REV. BRAS. BIOL. 41: 635-644.
- OLIVEIRA GT., ROSSI IC., DA SILVA RSM., 2001. **CARBOHYDRATES METABOLISM DURING ANOXIA IN POST –ANOXIA RECOVERY IN *CHASMAGNATHUS GRANULATA* CRABS MAINTAINED ON HIGH PROTEIN OR CARBOHYDRATE RICH DIETS.** MAR. BIOL.; 139: 335-342.
- PEREIRA C, VIAJAYAN MM, STOREY KB, JONAS RA, MOON TW., 1995. **ROLE OF GLUCOSE AND INSULIN ACTIVITIES IN RAINBOW TROUT HEPATOCYTES.** JOURNAL OF COMPARATIVE PHYSIOLOGY B; 165: 62-70.
- PORTE JR P, BASKIN DG, SCHWARTZ MW., 2005. **INSULIN SIGNALING IN THE CENTRAL NERVOUS SUSTEM.** DIABETES; 54: 1264-1276.
- RAUSER CL., ABDEL-AAL Y, SHIEH JA., SUEN CW., MUELLER LD., ROSE M., 2005. **LIFELONG HETEROGENEITY IN FECUNDITY IS INSUFFICIENT TO EXPLAIN LATE-LIFE FECUNDITY PLATEAUS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*.** EXPERIMENTAL GERONTOLOGY; 40: 660–670.
- RISSANEN HT, VOUTILAINEN S, VIRTANEN KJ, VENHO B, VANHARANTA MI, SALONEN YJ., 2003 **LOW INTAKE OF FRUITS, BERRIES AND**

- VEGETABLE IS ASSOCIATED WITH EXCESS MORTALITY IN MEN. THE KUOPIO ISCHAEMIC HEART DISEASE RISK FACTOR (KIHD) STUDY.** NUTRITIONAL EPIDEMIOLOGY; 133: 199-204.
- SCAPIN S, DI GIUSEPPE G., 1993. **GLYCOGEN-PHOSPHORYLASE ACTIVITY IN THE LIVER OF THE FROG RANA-ESCULENTA.** COMP BIOCHEM PHYSIOL B-BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY; 105 (2): 401-407.
- SIEMANN EH, CREASY LL., 1992. **CONCENTRATION OF THE PHYTOALEXIN RESVERATROL IN WINE.** AMER J ENOL VITIC; 43 (1): 49-52.
- STEELE, JE., 1982. **GLYCOGEN PHOSPHORYLASE IN INSECTS.** INSECT BIOCHEM. 12: 131-147.
- TOLMASKY, DS., 2001. **SYNTHESIS AND MOBILIZATION OF GLYCOGEN RESERVES DURING METAMORPHOSIS OF THE MEDFLY *CERATITIS CAPITATA*.** ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS; 392: 38-47.
- VAANDRAGER S.H., VAN MARREWIJK W.J.A., BEENAKKERS A.M.TH., 1986. **GLYCOGEN PHOSPHORYLASE ACTIVITY IN FLIGHT MUSCLES OF *LOCUSTA MIGRATORIA* AT REST AND DURING FLIGHT. ISOLATION OF THREE FORMS OF THE MUSCLE ENZYME.** INSECT BIOCHEM.; 16: 749-756.
- VAN HANDEL E., 1965. **ESTIMATION OF GLYCOGEN IN SMALL AMOUNT SOFT TISSUE.** ANALISTICAL BIOCHEMISTRY; 11: 256-265.
- VAN MARREWIJK WJA., VAN DEN BROEK ATHM. , 1988. **BEENAKKERS, A.M.TH. ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE FROM FAT BODY OF THE *LOCUSTA MIGRATORIA*.** INSECT BIOCHEM. 18: 37-44.
- WEBSTER RP, STOFFOLANO JG, PROKOPY RJ., 1979. **LONG TERM INTAKE OF PROTEINS AND SUCROSE IN RELATION TO REPRODUCTIVE BEHAVIOR OF WILD AND LABORATORY CULTURED RHAGOLETIS POMENELLA.** ANN. ENT. SOC.AM; 72: 41-46.
- WIEL AV., 1998. **ALCOHOL AND INSULIN SENSITIVITY.** NETHERLANDS JOURNAL OF MEDICINE; 52: 91-94.

- WILLIAMS AC., BARRY BW., 2004. **PENETRATION ENHANCERS**. ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS; 56: 603-618.
- WILLIAMS RJ., SPENCER JPE., RICE-EVANS C. 2004. **SERIAL REVIEW: FLAVONOIDS AND ISOFLAVONES (PHYTOESTROGENS): ABSORPTION, METABOLISM, AND BIOACTIVITY**. FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE; 36 (7): 838 – 849.
- ZINI R, MORIN C, BERTELLI A, TILLEMENT, JP., 1999. **EFFECTS OF RESVERATROL ON THE RAT BRAIN RESPIRATORY CHAIN**. DRUGS EXP CLIN RES; 25 (2-3): 87-97.
- ZOU S, MEADOWS S, SHARP L, JAN LY, JAN YN., 2000. **GENOME-WIDE STUDY OF AGING AND OXIDATIVE STRESS RESPONSE IN *Drosophila melanogaster***. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA; 97 (25): 13726-13731.

CONCLUSÃO GERAL

Muitos estudos têm demonstrado que a longevidade dos organismos é influenciada pela taxa de dano oxidativo e que a dieta é um dos principais fatores que atua e regula estas taxas. No presente estudo foi investigado o efeito do trans-resveratrol sobre o metabolismo de glicogênio e sobre a longevidade de *Drosophila melanogaster* ao longo do ciclo de vida.

Os resultados mostraram:

- que o tratamento com trans-resveratrol 1 μ M aumentou significativamente a longevidade máxima de fêmeas e de machos em relação ao grupo controle, ao DMSO e as demais doses de trans-resveratrol (10 μ M e 20 μ M);
- o fato da dose mais efetiva no aumento da longevidade ter sido a de 1 μ M confirma o que já foi descrito por muitos autores de que as concentrações mais efetivas de antioxidante são as mais baixas, muitas vezes as doses mais elevadas funcionam como pró-oxidantes e não um antioxidantes;
- que tanto o tratamento com DMSO como com trans-resveratrol modularam o metabolismo de carboidratos em fêmeas e machos de forma diferenciada;
- que o DMSO e o trans-resveratrol apesar de serem capazes de modular o metabolismo de glicogênio, não foram capazes de alterar a expressão gênica da enzima pesquisada.

Em síntese o tratamento com trans-resveratrol afetou de modo positivo tanto a longevidade quanto o metabolismo do modelo experimental investigado em ambos os sexos, contudo mais estudos são necessários para que se comprove quais são o mecanismo de ação e os efeitos que esta fitoalexina causa no metabolismo.

REFERÊNCIAS GERAIS

- ARKING R. 1998. **BIOLOGY OF AGING: OBSERVATIONS AND PRINCIPLES.** 2A ED. MASSACHUSETTS: SINAUER INC;
- ANGELIS RC. 2001. **IMPORTÂNCIA DE ALIMENTOS VEGETAIS NA PROTEÇÃO DA SAÚDE.** ED. ATHENEU, SÃO PAULO;
- APPLEBAUM S.W., SCHLESINGER H.M. 1973. **REGULATION OF LOCUST FATBODY PHOSPHORYLASE.** BIOCHEM. J.; 135: 37-41.
- ARRESE, EL., ROJAS-RIVAS B.I., WELLS M.A. 1995. **PURIFICATION AND PROPERTIES OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE FROM THE FAT BODY OF LARVAL *MANDUCA SEXTA*.** INSECT BIOCHEM. MOLEC. BIOL.; 25: 209-216.
- ASENSI M. E COLS. 2002. **INHIBITION OF CÂNCER GROWTH BY RESVERATROL IS RELATED TO ITS LOW BIOAVAILABILITY IS RELATED TO ITS LOW BIOAVAILABILITY.** FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE; NO 3 PP. 387-398.
- BEATTIE BL, LOUIE VY. 2001. **NUTRIÇÃO E ENVELHECIMENTO.** IN: GALLO JJ, BUSBY-WHITEHEAD J, RABINS PV, SILLIMAN RA, MURPHY JB. REICHEL ASSISTÊNCIA AO IDOSO ASPECTOS CLÍNICOS DO ENVELHECIMENTO. RIO DE JANEIRO: GUANABARA KOOGAN; P. 241-58.
- BECKMAN KB, AMES BN. 1998. **THE FREE RADICAL THEORY OF AGING MATURES.** PHYSIOLOGICAL REVIEWS; 78 (2): 547-581.
- BITTERMAN, KJ, MEDVEDIK O., SINCLAIR DA. 2003. **LONGEVITY REGULATION IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*: LINKING METABOLISM, GENOME STABILITY, AND HETEROCHROMATIN.** MICROB. MOL. BIOL. REV. SEPT ; 376-399.
- BONELLI MA, ALFIERI RR, PETRONINI PG. 1999. **ATTENUATED EXPRESSION OF 70-KDA HEAT SHOCK PROTEIN IN WI-38 HUMAN FIBROBLASTS DURING AGING IN VITRO.** EXP CELL RES; 252 (1): 20-32.
- BONELLI MA, ALFIERI RR, POLI M. 2001. **HEAT-INDUCED PROTEASOMIC DEGRADATION OF HSF1 IN SERUM-STARVED HUMAN FIBROBLASTS AGING IN VITRO.** EXP CELL RES; 267 (2): 165-172.

- BUCK S., NICHOLSON M., DUDAS S., WELLS R., FORCE A., BAKER GT., ARKING R. 1993. **LARVAL REGULATION OF ADULT LONGEVITY IN A GENETICALLY-SELECTED LONG-LIVED STRAIN OF DROSOPHILA.** HEREDITY; 71:23-32.
- BURKHARDT G., WEGENER G. 1994. **GLYCOGEN PHOSPHORYLASE FROM FLIGHT MUSCLE OF THE HAWK MOTH, *MANDUCA SEXTA*: PURIFICATION AND PROPERTIES OF THREE INTERCONVERTIBLE FORMS AND THE EFFECT OF FLIGHT ON THEIR INTERCONVERSION.** J. COMP. PHYSIOL. B;164: 261–271.
- CANATO C.M., ZUCOLOTO F.S. 1998. **FEEDING BEHAVIOR OF *CERATITIS CAPITATA* (DIPTERA: TEPHRITIDAE): INFLUENCE OF CARBOHYDRATE INGESTION.** J. INSECT. PHYSIOL.; 44: 149-155.
- CARVALHO FILHO ET. 1996. **FISIOLOGIA DO ENVELHECIMENTO.** IN: PAPALÉO NETO M. GERONTOLOGIA. SÃO PAULO: ED. ATHENEU; P.166-194.
- CARVALHO D. 2004. **AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MAÇÃ FUJI *IN NATURA* E DESIDRATADA NO TEMPO DE VIDA E EM INDICADORES DO METABOLISMO E DA FISIOLOGIA DE *Drosophila melanogaster*.** TESE DE DOUTORADO, CURSO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.
- CAVALHEIRA JBC., ZECCHIN HG., SAAD MJA. 2002. **VIAS DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA.** ARQ BRAS ENDOCRINOL METAB; VOL 46 Nº 4.
- CHAPMAN RF. 1998. **THE INSECTS: STRUCTURE AND FUNCTION.** 4^A. ED. NEW YORK: CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS; pp770.
- CHIPPINDALE AK, HOANG DT, SERVICE PM, ROSE MR. 1994. **THE EVOLUTION OF DEVELOPMENT IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* SELECTED FOR POSTPONED SENESCENCE.** EVOLUTION 48: 1880–1899.
- CHILDRESS CC., SACKTOR B. 1970. **REGULATION OF GLYCOGEN METABOLISM IN INSECT FLIGHT MUSCLE. PURIFICATION AND PROPERTIES OF PHOSPHORYLASES *IN VITRO* AND *IN VIVO*.** J. BIOL. CHEM.; 11: 2927–2936.

- CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. 1987. **SINGLE-STEP METHOD OF RNA ISOLATION BY ACID GUANIDINIUM THIOCYANATE-PHENOL-CHLOROFORM EXTRACTION**. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 162: 156 –159.
- CORREA SAK. 1994. **MAPEAMENTO DO GENE . PARA PRECOCIDADE E EFEITO DOS GENES PARA VELOCIDADE DE DESENVOLVIMENTO SOBRE A SEGREGAÇÃO SEXUAL EM *DROSOPHILA MELANOGASTER***. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.
- DA CUNHA GL, DA CRUZ IB, FIORINO P, OLIVEIRA AK. 1995. **PARAQUAT RESISTANCE AND STARVATION CONDITIONS IN THE SELECTION FOR LONGEVITY EXTREMES IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* POPULATIONS PREVIOUSLY SELECTED FOR LONG AND SHORT DEVELOPMENTAL PERIOD**. DEVELOPMENTAL GENETICS.
- DA CUNHA GL. 2000. **MODULAÇÃO DO METABOLISMO ENERGÉTICO E DANO OXIDATIVO SOB COMPETIÇÃO LARVAL EM POPULAÇÕES DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* SELECIONADAS PARA EXTREMOS DA VELOCIDADE DE DESENVOLVIMENTO E LONGEVIDADE EM DIFERENTES IDADES**. TESE DE DOUTORADO, CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.
- DA CRUZ IBM, SCHWANKE CHA. 2001. **REFLEXÕES SOBRE BIOGERONTOLOGIA COMO UMA CIÊNCIA GENERALISTA, INTEGRATIVA E INTERATIVA**. ESTUD INTERDISCIP ENVELH; 3:7-36.
- DA CRUZ IBM, NASCIMENTO JC., TAUFER, M., OLIVEIRA AK. 2000. **MORFOLOGIA DO APARELHO REPRODUTOR E BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO**. IN: MALASI A., ZUCCHI RA. “**MOSCAS-DAS-FRUTAS DE INTERESSE ECONÔMICO NO BRASIL – CONHECIMENTO BÁSICO E APLICADO**”. ED. HOLOS DE RIBEIRÃO PRETO SP.; pp 55-56.

- DA CRUZ IBM. 2002. **GENÉTICA DO ENVELHECIMENTO, DA LONGEVIDADE E DOENÇAS CRÔNICO-DEGENERATIVAS ASSOCIADAS À IDADE**. IN: ELISABETE VIANA DE FREITAS ET AL. TRATADO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA. RIO DE JANEIRO: GUANABARA-KOOGAN; pp. 20-31.
- DA CRUZ IBM.; NASCIMENTO JC.; CALLEGARI-JACQUES SM.; OLIVEIRA AK. 1995. **ADULT LIFE SPAN IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* POPULATIONS SELECTED FOR LONG AND SHORT DEVELOPMENTAL PERIOD**. REV. BRAS. GEN.; V. 18, N. 1, pp. 23 -30.
- DADD RH. 1985. **NUTRITION: ORGANISM**. IN; KERKUT GA.; GILBERT LI. (ED) COMPREHENSIVE INSECT PHYSIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND PHARMACOLOGY PERGAMON PRESS LONDON; pp.313-389.
- DE GREY ADNJ. 2001. **A PROPOSED MECHANISM FOR THE LOWERING OF MITOCHONDRIAL ELECTRON LEAK BY CALORIC RESTRICTION**. MITOCHONDRION; 1: 129-139.
- DOMBRADI V., HADJU J., FRIEDRICH P., BOT G., 1985. **PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE FROM *DROSOPHILA MELANOGASTER***. INSECT BIOCHEM.; 15: 403–410.
- DRIVER C., GEORGEOU A. 2003. **VARIABLE EFFECTS OF VITAMIN E ON *DROSOPHILA* LONGEVITY**. BIOGERONTOLOGY; 4:91-95.
- DUTRA BK. 2004. **EFEITO DO TRANS-RESVERATROL NO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO NO DANO OXIDATIVO E NA LONGEVIDADE DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* EM DIFERENTES IDADES**. TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE FARMÁCIA, PONTIFÍCA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.
- DUTRA BK., FERNANDES FA., QUADROS FC., NASCIMENTO JC., OLIVEIRA GT. 2006. **ANALYSIS OF INTERMEDIATE METABOLISM THROUGHOUT THE ONTOGENETIC DEVELOPMENT OF *ANASTREPHA FRATERCULUS* (WIEDMAN,1830) (DIPTERA: TEPHRITIDAE)** (IN PRESS). COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY A- MOLECULAR AND INTEGRATIVE PHYSIOLOGY.

- FERNANDES FA., DUTRA BK., SCHEIN V., OLIVEIRA GT., DA SILVA RSM. 2005. **EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TRANS-RESVERATROL SOBRE LONGEVIDADE DE *DROSOPHILA MELANOGASTER***. XX REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADE DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL; FESBE.
- FERRAZ MV. 1994.. **LONGEVITY OF ADULTS OF PECKIA CHRYSOSTOMA AND ADISCOCHATETA INGENS (DIPTERA: SARCOPHAGIDAE) REARED WITH AND WITHOUT PROTEIN**. MEM. INST. OSWALDO CRUZ; 89: 421-424.
- FINCH CE. 1990. **LONGEVITY, SENESCENCE AND THE GENOME**. CHICAGO: CHICAGO PRESS;
- FOLEY PA., LUCKINBILL LS. 2001. **THE EFFECTS OF SELECTION FOR LARVAL BEHAVIOR ON ADULT LIFE-HISTORY FEATURES IN *DROSOPHILA MELANOGASTER***. EVOLUTION; 55 (12): 2493-2502.
- FOX CW., DUBLIN L., POLLITT SJ. 2003. **GENDER DIFFERENCES IN LIFESPAN AND MORTALITY RATES IN TWO SEED BEETLE SPECIES**. FUNCTIONAL ECOLOGY; 17:619–626.
- FRÉMONT L. 2000. **BIOLOGICAL EFFECTS OF RESVERATROL**. LIFE SCIENCES; 66 (8): 663-673.
- GARDE, G. 1991. **GLYCOGEN PHOSPHORYLASE IN THE FAT BODY OF TWO COCKROACH SPECIES, *PERIPLANETA AMERICANA* AND *NAUPHOETA CINEREA*: ISOLATION, PARTIAL CHARACTERIZATION OF THREE FORMS AND ACTIVATION BY HYPERTREHALOSAEMIC HORMONES**. Z. NATURFORSCH.; 46: 149–162.
- GEARY N., LANGHANS W., SCHARRE E. 1981. **METABOLIC CONCOMITANTS OF GLUCAGON-INDUCED SUPPRESSION OF FEEDING IN THE RAT**. AM. J. PHYSIOL., 241: R330–R335.
- GILBERT S.F. 1994. **DEVELOPMENTAL BIOLOGY**. ED. SUNDERLAND: SINAUER ASSOCIATES, INC.PUBLISHERS.

- HALLIWELL B. 1995. **ANTIOXIDANT CHARACTERIZATION - METHODOLOGY AND MECHANISM.** BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY; 49 (10): 1341-1348.
- HARMAN D. 1956. **AGING - A THEORY BASED ON FREE-RADICAL AND RADIATION-CHEMISTRY.** JOURNALS OF GERONTOLOGY; 11 (3): 298-300.
- HARMAN D. 1994. **AGING - PROSPECTS FOR FURTHER INCREASES IN THE FUNCTIONAL LIFE-SPAN.** AGE; 17 (4): 119-146.
- HAVEMAN-NIES A, DE GROOT LCPGM, VAN STAVEREN WA. 2003. **DIETARY QUALITY, LIFESTYLE FACTORS AND HEALTHY AGING IN EUROPE: THE SENECA STUDY.** AGE AND AGEING; 32: 427-34.
- HAYFLICK L. 1996. **COMO E PORQUE ENVELHECEMOS.** ED. SÃO PAULO: CAMPUS.
- HERTOG MGL, DEVRIES A, OCKE MC, SCHOUTEN A, BUENODEMESQUITA HB, VERHAGEN H. 1996. **OXIDATIVE DNA DAMAGE IN HUMANS: COMPARISON BETWEEN HIGH AND LOW HABITUAL FRUIT AND VEGETABLE CONSUMPTION.** BIOMARKERS; 2 (4): 259-262.
- HERTOG MGL, FESKENS EJM, HOLLMAN PCH, KATAN MB, KROMHOUT D. 1994. **DIETARY FLAVONOIDS AND CANCER RISK IN THE ZUTPHEN ELDERLY STUDY.** NUTR. AND CANCER-AN INT J; 22 (2): 175-184.
- HERTOG MGL, FESKENS EJM, KROMHOUT D. 1997. **ANTIOXIDANT FLAVONOIDS AND CORONARY HEART DISEASE RISK.** LANCET; 349 (9053): 699-699.
- HERTOG MGL, KROMHOUT D, ARAVANIS C, BLACKBURN H, BUZINA R, FIDANZA F, GIAMPAOLI S, JANSEN A, MENOTTI A, NEDELJKOVIC S, PEKKARINEN M, SIMIC BS, TOSHIMA H, FESKENS EJM, HOLLMAN PCH, KATAN MB. 1995. **FLAVONOID INTAKE AND LONG-TERM RISK OF CORONARY-HEART-DISEASE AND CANCER IN THE 7 COUNTRIES STUDY.** ARCH. INT MED; 155 (4): 381-386.
- HININGER I, CHOPRA M, THURNHAM DI, LAPORTE F, RICHARD MJ, FAVIER A, ROUSSEL AM. 1996. **EFFECT OF INCREASED FRUIT AND VEGETABLE**

- INTAKE ON THE SUSCEPTIBILITY OF LIPOPROTEIN TO OXIDATION IN SMOKERS.** EUR J CLIN N JAZWINSKI SM, KIRCHMAN PA, KIM S, ET AL. LONGEVITY, GENES, AND AGING FROM THE PERSPECTIVE OF A YEAST: MOL BIOL CELL; 7: 40-40 SUPPL. S.
- HOWITZ KT., BITTERMAN KJ., COHEN HY., LAMMING DW., LAVU S., WOOD JG., ZIPKIN RE., CHUNG P., KISIELEWSKI A., ZHANG L., SCHERER B., SINCLAIR DA. 2003. **SMALL MOLECULE ACTIVATORS OF SIRTUINS EXTEND SACCHAROMYCES CEREVISIAE LIFESPAN.** NATURE; 425: 191-196.
- HUTCHINSON E.W., ROSE M. 1991. **QUANTITATIVE GENETICS OF POSTPONED AGING IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*.** ANALYSIS OF OUTBRED POPULATIONS. GENETICS; V.L27.P. 719-727.
- JACOME I., ALUJA M., LIEDO P., NESTEL D. 1995. **THE INFLUENCE OF ADULT DIET AND AGE ON LIPID RESERVES IN THE TROPICAL FRUIT FLY *ANASTREPHA SERPENTINA* (DIPTERA: TEPHRITIDAE).** J. INSECT. PHYSIOL.; 40: 1079-1086.
- JAZWINSKI SM, KIRCHMAN PA, KIM S, ET AL. 1996. **LONGEVITY, GENES, AND AGING FROM THE PERSPECTIVE OF A YEAST.** MOL BIOL CELL; 7: 40-40 SUPPL. S DEC.
- JI LL. 2001. **EXERCISE AT OLD AGE: DOES IT INCREASE OR ALLEVIATE OXIDATIVE STRESS?.** ANN NY ACAD SCI; 928: 236-247.
- JI LL. 2002. **INCREASING HEALTHY LIFE SPAN: CONVENTIONAL MEASURES AND SLOWING THE INNATE AGING PROCESS.** ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES; 959: 82-92.
- JOHNSON TE, HENDERSON S, MURAKAMI S, DE CASTRO E, DE CASTRO SH, CYPSEK J, RIKKE B, TEDESCO P, LINK C. 2002. **LONGEVITY GENES IN THE NEMATODE *CAENORHABDITIS ELEGANS* ALSO MEDIATE INCREASED RESISTANCE TO STRESS AND PREVENT DISEASE.** JOURNAL OF INHERITED METABOLIC DISEASE; 25 (3): 197-206.

- JOHNSON T.E. 1999. **INTRODUCTION - ROLE OF OXIDATIVE DAMAGE AND ENVIRONMENTAL STRESSES: NEUROBIOLOGY OF AGING**; VOLUME 20, NUMBER 5, pp. 469-470(2).
- JONES, VP 1988. **LONGEVITY OF APPLE MAGGOT (DIPTERA; TEPHRITIDAE) WRES UNDER LABORATORY AND FIELD CONDITION**. IN UTAH. ENV. ENT; 17: 704-708.
- JUNG, I.B.C. 1992. **EFEITO DE HORMÔNIOS ESTERÓIDES NA ONTOGENIA DE POPULAÇÕES DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* SELECIONADAS PARA EXTREMOS DA VELOCIDADE DE DESENVOLVIMENTO**. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.
- KEELEY, LL. 1978. **ENDOCRINE REGULATION OF FAT BODY DEVELOPMENT AND FUNCTION**. ANN. REV. ENTOMOLOGY; 23: 329-352.
- KOHLMEIER L, HASTINGS SB. 1995. **EPIDEMIOLOGIC EVIDENCE OF A ROLE OF CAROTENOIDS IN CARDIOVASCULAR-DISEASE PREVENTION**. AM. J. CLIN. NUTR.; 62 (6): S1370-S1376 SUPPL. S.
- LAMITINA ST, STRANG K. 2005. **TRANSCRIPTIONAL TARGETS OF DAF-16 INSULIN SIGNALING PATHWAY PROTECT C. ELEGANS FROM EXTREME HYPERTONIC STRESS**. AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY – CELL PHYSIOLOGY; 288: C467-C474.
- LANGCAKE P, PRYCE RJ. 1976. **PRODUCTION OF RESVERATROL BY VITIS-VINIFERA AND OTHER MEMBERS OF VITACEAE AS A RESPONSE TO INFECTION OR INJURY**. PHYSIOL PLANT PATHOLOGY; 9 (1): 77-86.
- LANGLEY P.A. 1970. **PHYSIOLOGY OF THE MEDITERRANEAN FRUIT FLY IN RELATION TO STERILE-MALE TECHNIQUE** IN: ANON. (ED) **PHYSIOLOGY OF THE MEDITERRANEAN FRUIT FLY IN RELATION TO THE STERILE-MALE TECHNIQUE**. PROCEEDINGS OF A PANEL HELD IN VIENNA IN 1969. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, VIENNA, AUSTRIA, pp. 25-32.

- LEE CK, KLOPP RG, WEINDRUCH R, PROLLA TA. 1999. **GENE EXPRESSION PROFILE OF AGING AND ITS RETARDATION BY CALORIC RESTRICTION**. SCIENCE; 285 (5432): 1390-1393.
- LEE SH., OE T., BLAIR IA. 2001. **VITAMIN C-INDUCED DECOMPOSITION OF LIPID HYDROPEROXIDES TO ENDOGENOUS GENOTOXINS**. SIENCE; 292: 2083-2086.
- LINDSLEY D.L., ZIMM GG. 1992. **THE GENOME OF *DROSOPHILA***. ED. ACADEMIC PRESS: INC. HARCOURT BRACE JOVANOVICH, PUBLIISHERS; SAN DIEGO, NEW YORK, BOSTON, LONDON, SYDNEY, TOKYO, TORONTO.
- LINTS FA. 1989. **THE RATE OF LIVING THEORY REVISITED**. EXP GERONTOL; 35: 36-57.
- LINTS FA. AND LINTS C.V. 1971. **INFLUENCE OF PRE-IMAGINAL ENVIRONMENT ON FECUNDITY AND AGEING IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* HYBRIDS. 11. PREIMAGINAL TEMPERATURE**. EXP. GERONTOL.; V.6.P. 417-426.
- LINTS F.A. 1978. **GENETICS AND AGEING: INTERDISCIPLINARY TOPICS IN GERONTOLOGY**. KARGER, BLASEL, LONDON, pp. 130-133.
- LINTS F.A. 1983. **GENETIC INFLUENCES ON LIFE SPAN IN *DROSOPHILA* AND RELATED SPECIES**. REWEIW OF BIOLOGICAL RESEARCH IN AGING (ED. M. ROTHSTEIN) ALAN R. LISS, NEW YORK, VOL. L. pp. 51-72.
- LINTS F.A. AND BURGOIS, M. 1985. **AGING AND LIFESPAN IN INSECTS , WITH SPECIAL REGARDS TO *DROSOPHILA***. REWIEW 1982-1984. LN: REWIEW OF BIOLOGICAL RESEARCH IN AGING (ED. M. ROTHSTEIN), ALAN R. LISS, NEW YORK, V.2., 61-84.
- LINTS F.A. 1988. **GENETICS. IN : *DROSOPHILA* AS A MODEL ORGANISM FOR AGEING STUDIES** (LINTS, F.A. AND SOLIMAN, M.H., EDS.). BLACKIE, LONDON, P 108-118.
- LONGO VD., FINCH CE. 2003. **EVOLUTIONARY MEDICINE: FROM DWARF MODEL SYSTEMS TO HEALTHY. CENTENARIANS**. 299:1342-46.
- LORETO ELS, OLIVEIRA AK. 1988a. **SELECTION OF *DROSOPHILA***

- MELANOGASTER* FOR EXTREMES OF DEVELOPMENTAL RATE. II. SEXUAL AND REPRODUCTIVE ISOLATION DUE TO HYBRID INFERIORITY.** REV. BRAS. GENET. 1: 267-274.
- LORETO ELS, OLIVEIPA AK. 1988b. **SELECTION OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* FOR EXTREMES OF DEVELOPMENTAL RATE. 1. STRUCTURAL AND REGULATORY GENETIC DIVERGENCY.** REV. BRAS. GENET. 1:253-265.
- LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FAU A.L., RANDAL R.J. 1951. **PROTEIN MENASUREMENTS WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT.** J. BIOL. CHEM.; 183: 265-275.
- LUCKINBILL LS. 1998. **SELECTION FOR LONGEVITY CONFERS RESISTANCE TO LOW TEMPERATURE STRESS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*:** J GERONTOL A BIOL SCI MED. 53: B147-B153.
- MARTIN GM. 1994. **GENETIC MODULATION OF TELOMERIC TERMINAL RESTRICTION FRAGMENT LENGTH - RELEVANCE FOR CLONAL AGING AND LATE-LIFE DISEASE.** AM J HUM GENET; 55 (5): 866-869.
- MEYER- FERNANDES J., ARRESE EL., WELLS MA. 2000. **ALLOSTERIC EFFECTORS AND TREHALOSE PROTECT LARVAL *MANDUCA SEXTA* FAT BODY GLYCOGEN PHOSPHORYLASE B AGAINST THERMAL DENATURATION.** INSECT BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY; 30: 473-478.
- MIQUEL JJ., ECÔNOMOS AC. 1982. **ANTIOXIDANTS, METABOLIC RATE AND AGING IN *DROSOPHILA* AND MICE.** EXP GERONTOL;1:159-165.
- MORISHIMA I., SAKURAI S. 1985. **PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE B FROM FAT BODY OF THE SILK WORM *BOMBYX MORI*.** COMP. BIOCHEM. PHYSIOL. 81B; 453-458.
- MUNICIO A.M., PAGANI R., SUAREZ A. 1980. **TURNOVER OF THE GLYCEROL MOIETY OF DIFFERENT LIPID CLASSES DURING DEVELOPMENT OF *CERATITIS CAPITATA*.** COMP. BIOCHEM. PHYSIOL. B; 67: 519-525.

- NARATH E., SKALICKY M., VIIDIK A. 2001. **VOLUNTARY AND FORCED EXERCISE INFLUENCE THE SURVIVAL AND BODY COMPOSITION OF AGEING MALE RATS DIFFERENTLY.** EXP. GERONT; 36:1699-1711.
- NASCIMENTO JC. 2002. **ANÁLISE DAS MODULAÇÕES METABÓLICAS AO LONGO DA IDADE DE MACHOS E FÊMEAS DE ANASTREPHA FRATERCULUS (WIED) (DIPTERA TEPHRITIDAE) MANTIDAS EM TRÊS DIFERENTES DIETAS.** TESE DE DOUTORADO, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS- ZOOLOGIA.
- NASCIMENTO J.C. 1992. **REGULADORES DA VELOCIDADE DE DESENVOLVIMENTO PRÉ-IMAGINAL E LONGEVIDADE DO ADULTO DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.** DISSERTAÇÃO DE BACHARELADO, DEPARTAMENTO DE GENÉTICA-UFRGS.
- NESS AR, POWLES JW. 1997. **FRUIT AND VEGETABLES, AND CARDIOVASCULAR DISEASE: A REVIEW.** INTERNATIONAL JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY; 26 (1): 1-13.
- NESTEL D., TOLMASKY D., RABOSSO A., QUESADA-ALLUÉ L.A. 2003. **LIPID, CARBOHYDRATE AND PROTEINS PATTERNS DURING METAMORPHOSIS OF THE MEDITERRANEAN FRUIT FLY, *CERATITIS CAPITATA* (DIPTERA: TEPHRITIDAE).** PHYSIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND TOXICOLOGY. ANN. ENTOMOL. SOC. AM.; 96: 237-244.
- NESTEL D., NEMNY-LAVY E., CHANG C.L. 2004. **LIPID AND PROTEIN LOADS IN PUPATING LARVAE AND EMERGING ADULTS AS AFFECTED BY THE COMPOSITION OF MEDITERRANEAN FRUIT FLY, *CERATITIS CAPITATA* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) MERIDIC LARVAL DIETS.** ARCH. INSECT. BIOCHEM.; 56: 97-109.
- NESTEL D., PAPADOPOULOS N. T., LIEDO P., GONZÁLES-CERON L., CAREY J.R. 2005. **TRENDS IN LIPID AND PROTEIN CONTENTS DURING MEDFLY AGING: AN HARMONIC PATH TO DEATH.** ARCH. INSECT. BIOCHEM.; 60: 130-139.

- OLIVEIRA AK., CORDEIRO AR. 1981. **GENETIC CONTROL OF DEVELOPMENTAL RATE AND A MOTHER FACTOR IN DROSOPHILA MELANOGASTER**. REV. BRAS. BIOL. 41: 635-644.
- OLIVEIRA GT., ROSSI IC., DA SILVA RSM. 2001. **CARBOHYDRATES METABOLISM DURING ANOXIA IN POST -ANOXIA RECOVERY IN CHASMAGNATHUS GRANULATA CRABS MAINTAINED ON HIGH PROTEIN OR CARBOHYDRATE RICH DIETS**. MAR. BIOL. 139: 335-342.
- OLIVEIRA AK., CORDEIRO AR. 1982a. **ALKALINE PHOSPHATASE IN DROSOPHILA MELANOGASTER SELECTED FOR EXTREMES OF DEVELOPMENTAL RATE AND A RECESSIVE ALLELE**. REV. BRAS. GENET.; V.4., pp. 135-147.
- OLIVEIRA AK., CORDEIRO AR. 1982b. **GENETICS OF ESTERASE A AND ITS RELATIONSHIPS WITH THE DEVELOPMENTAL RATE IN SELECTED STRAINS OF DROSOPHILA MELANOGASTER**. REV. BRAS. BIOL.; 42: 133-140.
- OLIVEIRA AK. CORDEIRO AR. 1984. **ONTOGENETIC CHANGES IN ISOENZYMES EXPRESSION PATTEM OF DROSOPHILA MELANOGASTER SELECTED FOR FAST AND SLOW DEVELOPMENTAL RATE**. REV. BRAS. BIOL., 44: 3-140.
- OLIVEIRA AK., MONJELÓ LAS., CORDEIRO AR. 1991. **A SECOND CHROMOSOME MAJOR GENE FOR DEVELOPMENTAL RATE IN DROSOPHILA MELANOGASTER**. REV. BRAS. GENET.; 14: 953-965.
- OPAS/OMS. 1999. **26A CONFERÊNCIA SOBRE O ENVELHECIMENTO NO BRASIL**. IN: NERI AL, DEBERT GG, ORGANIZADORES. VELHICE E SOCIEDADE: PAPIRUS (COLEÇÃO VIVA IDADE); pp.11-40.
- PAGANI R., SUAREZ A., MUNICIO AM. 1980. **FATTY ACID PATTERNS OF THE MAJOR LIPID CLASSES DURING DEVELOPMENT OF CERATITIS CAPITATA**. COMP. BIOCHEM. PYSIOL. B; 67: 511-518.
- PANIZZI AR, PARRA JRP. 1991. **ECOLOGIA NUTRICIONAL DE INSETOS E SUAS IMPLICAÇÕES NO MANEJO DE PRAGAS**. SÃO PAULO; pp.35.

- PANSERA-DE-ARAÚJO MCG., ARAÚJO AM. 2000. **OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DE LAGARTAS (LEP.; NOCTUIDAE), SEUS PREDADORES, PARASITÓIDES E PATÓGENOS, NUM AGROECOSSISTEMA DE SOJA (*GLYCINE MAX*), EM TRÊS SAFRAS.** AN. SOC. ENTOMOL. BRAS.
- PEREIRA C, VIAJAYAN MM, STOREY KB, JONAS RA, MOON TW. 1995. **ROLE OF GLUCOSE AND INSULIN ACTIVITIES IN RAINBOW TROUT HEPATOCYTES.** JOURNAL OF COMPARATIVE PHYSIOLOGY B. 165: 62-70.
- PORTE JR P, BASKIN DG, SCHWARTZ MW. 2005. **INSULIN SIGNALING IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM.** DIABETES. 54: 1264-1276.
- RAUSER CL., ABDEL-AAL Y, SHIEH JA., SUEN CW., MUELLER LD., ROSE M. 2005. **LIFELONG HETEROGENEITY IN FECUNDITY IS INSUFFICIENT TO EXPLAIN LATE-LIFE FECUNDITY PLATEAUS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*.** EXPERIMENTAL GERONTOLOGY; 40: 660-670.
- RISSANEN HT, VOUTILAINEN S, VIRTANEN KJ, VENHO B, VANHARANTA MI, SALONEN YJ. 2003. **LOW INTAKE OF FRUITS, BERRIES AND VEGETABLE IS ASSOCIATED WITH EXCESS MORTALITY IN MEN: THE KUOPIO ISCHAEMIC HEART DISEASE RISK FACTOR (KIHD) STUDY.** NUTRITIONAL EPIDEMIOLOGY; 133: 199-204.
- ROPER C.; PIGNATELLI P AND PARTRIDGE L. 1993. **EVOLUTIONARY EFFECTS OF SELECTION ON AGE AT REPRODUCTION IN LARVAL AND ADULT *DROSOPHILA MELANOGASTER*.** EVOLUTION; 47.: 445-455.
- SCAPIN S, DI GIUSEPPE G. 1993. **GLYCOGEN-PHOSPHORYLASE ACTIVITY IN THE LIVER OF THE FROG *RANA-ESCULENTA*.** COMP BIOCHEM PHYSIOL B-BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY 105 (2): 401-407.
- SHAPIRO JP. 1988. **LIPID TRANSPORT IN INSECTS.** ANN. REV. ENTOMOLOGY; VOL. 33: 297-318.
- SIEMANN EH, CREAMY LL. 1992. **CONCENTRATION OF THE PHYTOALEXIN RESVERATROL IN WINE.** AMER J ENOL VITIC; 43 (1): 49-52.

- SLANKI F., SCRIBER JM. 1985. **FOOD CONSUPTION AND UTILIZATION. IN: KERKUT, GA.; GILBERT, LI. (ED). COMPREHENSIVE INSECT PHYSIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND PHARMACOLOGY. PERGAMON PRESS LONDON; pp. 89-163.**
- SOUTO, AA; CARNEIRO, MC; SFERIN, M; SENNA, MJH; CONZ, A; GOBBI, K. 2001. **DETERMINATION OF TRANS-RESVERATROL CONCENTRATIONS IN BRAZILIAN RED WINES BY HPLC: J. FOOD COMPOS. ANAL; 14: 441-445.**
- SOUZA HML, PIEDRA BUENA, AE PAVAN, OHO. 1978. **BIOLOGIA DE CERATITIS CAPITATA (DIPTERA; TEPHRITIDAE): UM NOVO MEIO ARTIFICIAL DE CRIAÇÃO PARA PRODUÇÃO EM MASSA. PAP. AVUL. ZOOLOGIA; SÃO PAULO 31: 213-219.**
- STEELE J.E. 1982. **GLYCOGEN PHOSPHORYLASE IN INSECTS. INSECT BIOCHEM.; 12: 131-147.**
- STEHLER B. **TIME, CELLS AND AGING. NEW YORK: ACADEMIC PRESS; 1982.**
- STEINMETZ KA, POTTER JD. 1996. **VEGETABLES, FRUIT, AND CANCER PREVENTION: A REVIEW. JOURNAL OF THE AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION; 96 (10): 1027-1039.**
- TOLMASKY D.S. 2001. **SYNTHESIS AND MOBILIZATION OF GLYCOGEN RESERVES DURING METAMORPHOSIS OF THE MEDFLY *CERATITIS CAPITATA*. ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS; 392: 38-47.**
- TZANAKAKIS ME; TSITSIPIS JA; STEINEIR LF. 1967. **EGG PRODUCTION OF OLIVE FRUIT FLY FED SOLIDS OR LIQUIDS CONTAINNING PROTEIN HYDROLYZATE. J. ECON. ENT.; (60): 352-354.**
- VAANDRAGER S.H., VAN MARREWIJK W.J.A., BEENAKKERS A.M.TH. 1986. **GLYCOGEN PHOSPHORYLASE ACTIVITY IN FLIGHT MUSCLES OF *LOCUSTA MIGRATORIA* AT REST AND DURING FLIGHT. ISOLATION OF THREE FORMS OF THE MUSCLE ENZYME. INSECT BIOCHEM.; 16: 749-756.**
- VALENZANO DR., TERZIBASI E., GENADE T., CATTANEO A., DOMENICI L. CELLERINO A. 2006. **RESVERATROL PROLONGS LIFESPAN AND**

- RETARDS THE ONSET OF AGE RELATED MARKERS IN A SHORT-LIVED VERTEBRATE.** CURRENT BIOLOGY; 16: 296–300.
- VAN HANDEL E. 1965. **ESTIMATION OF GLYCOGEN IN SMALL AMOUNT SOFT TISSUE.** ANALITICAL BIOCHEMISTRY; 11: 256-265.
- VAN MARREWIJK W.J.A., VAN DEN BROEK A.TH.M. 1988. **BEENAKKERS, A.M.TH. ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE FROM FAT BODY OF THE *LOCUSTA MIGRATORIA*.** INSECT BIOCHEM.; 18: 37–44.
- VAN VOORHIES WA. 2001. **HORMESIS AND AGING: HUMAN & EXPERIMENTAL TOXICOLOGY;** 20 (6): 315-317.
- YO BP, YANG R. 1996. **CRITICAL EVOLUATION OF THE FREE RADICAL THEORY OF AGING.** AMM N.Y. SCIENCE; 46 (60): 1-11.
- YONEMURA I.; MOTOYAMA T., HASEKURA H. 1989. **MODE OF INHERITANCE OF MAJOR GENES CONTROLLING LIFE SPAN DIFFERENCES BETWEEN TWO INBRED STRAINS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*.** HEREDITAS.; 1 : 207-214.
- YONEMURA I.; ABE M., ISHIDATE R., ISHYAMA T., MOTOYAMA T., HASEKURA H., BOETTCHER B. 1990. **INFLUENCE OF TEMPERATURE ON THE INHERITANCE OF ADULT LLFE SPAN IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*.**: HEREDITY.; 112: 117-127.
- YONEMURA I., MOTOYAMA T., HASEKURA H., BOETTCHER B. 1991. **CYTOPLASMIC INFIUENCE ON THE EXPRESSION OF NUCLEAR GENES AFFECTING LIFE SPAN IN *DROSOPHILA MELANOGASTE*.** HEREDITY; 66: 259-264.
- WEBSTER RP, STOFFOLANO JG, PROKOPY RJ. 1979. **LONG TERM INTAKE OF PROTEINS AND SUCROSE IN RELATION TO REPRODUCTIVE BEHAVIOR OF WILD AND LABORATORY CULTURED RHAGOLETIS POMENELLA.** ANN. ENT. SOC.AM; (72): 41-46.
- WIEL AV. 1998. **ALCOHOL AND INSULIN SENSITIVITY.** NETHERLANDS JOURNAL OF MEDICINE; (52): 91–94.

- WILLIAMS AC., BARRY BW. 2004. **PENETRATION ENHANCERS**. ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS; 56: 603-618.
- WILLIAMS RJ., SPENCER JPE., RICE-EVANS C. 2004. **SERIAL REVIEW: FLAVONOIDS AND ISOFLAVONES (PHYTOESTROGENS): ABSORPTION, METABOLISM, AND BIOACTIVITY**. FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE; 36 (7): 838 – 849.
- WOOD, J.G., ROGINA, B., LAVU, S., HOWITZ, K., HELFAND, S.L., TATAR, M., SINCLAIR, D., 2004. **SIRTUIN ACTIVATORS MIMIC CALORIC RESTRICTION AND DELAY AGEING IN METAZOANS**. NATURE 430, 686-689.
- ZINI R, MORIN C, BERTELLI A, TILLEMENT, JP. 1999. **EFFECTS OF RESVERATROL ON THE RAT BRAIN RESPIRATORY CHAIN**. DRUGS EXP CLIN RES; 25 (2-3): 87-97.
- ZOU S, MEADOWS S, SHARP L, JAN LY, JAN YN. 2000. **GENOME-WIDE STUDY OF AGING AND OXIDATIVE STRESS RESPONSE IN *Drosophila melanogaster***. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA; 97 (25): 13726-13731.
- ZUCOLOTO FS, 1988. **QUALITATIVE AND QUANTITATIVE COMPETITION FOR FOOD IN *Ceratitis capitata***. REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA; RIO DE JANEIRO, VOL. 48 O. 532-526.