

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências

Acúmulo de Pigmentos Fluorescentes como Marcadores
de Idade em Estudos de Envelhecimento

Guilherme Ehrenbrink
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carmen C. R. Saavedra

Trabalho apresentado como um dos
requisitos para a obtenção do grau
de Bacharel no Curso de Ciências
Biológicas Ênfase Molecular,
Celular e Funcional

Porto Alegre
2002

1. Introdução

1.1 A Evolução da Vida

1.2 A Evolução da Vida

1.3 A Evolução da Vida

1.4 A Evolução da Vida

2. Descrição

3. Conclusão

4. Bibliografia

À minha orientadora,
Profa. Carmen Saavedra,
pela oportunidade;

à minha namorada, **Talita,**
pela cumplicidade e paciência;

mas, principalmente aos meus
pais, **Darcísio e Eliana,**
a quem sempre espero
corresponder às expectativas.

Sumário

1. Introdução:	3
1.1 A Evolução das pesquisas em Envelhecimento:	3
1.2 Sobre as Teorias do Envelhecimento:	4
1.3 Sobre os Marcadores de Idade:	6
1.4 Sobre a Lipofuscina e outros pigmentos fluorescentes:	6
2. Desenvolvimento e Discussão:	7
3. Conclusão:	17
4. Bibliografia:	18

1. Introdução:

1.1 A Evolução das pesquisas em Envelhecimento:

Um dos ramos mais produtivos da pesquisa em biologia celular e molecular tem sido o da Gerontologia. Estudos a respeito do envelhecimento de organismos, seus efeitos, sintomas e causas têm, com a tecnologia atual, sido avançados.

Os estudos Gerontológicos apresentam uma grande dificuldade de serem realizados experimentalmente devido aos processos estocásticos envolvidos, que contrastam com os eventos geneticamente programados para o ciclo de vida (TAKAHASHI, 2000).

Embora estudos nessa área datem desde as décadas de 40 e 50 foi nas décadas de 80 e 90, com o advento da biologia molecular, que as pesquisas tomaram corpo.

O estudo sobre os telômeros, por exemplo, quando surgiu, parecia extremamente revelador (HAYFLICK, 1980). Foi sugerido, naquela época, que este seria “O Relógio Biológico” e que a telomerase (enzima mantenedora dos telômeros) seria o tão sonhado “Elixir da Longa Vida”.

Ao longo das divisões celulares que ocorrem durante a vida de um organismo eucarioto, as regiões terminais dos cromossomos (os telômeros) são encurtadas devido à problemática do fim de replicação das fitas pela DNA polimerase. Assim, depois de algumas divisões celulares e o conseqüente encurtamento dos seus telômeros, os cromossomos passam a apresentar uma instabilidade mitótica que leva a aneuploidias e algumas vezes à morte celular (PRESCOTT, 1999).

Entretanto, o número limitado de divisões celulares possíveis de serem realizadas por uma célula (limitado pelo seu tamanho telomérico) pode ser estendido devido à manutenção ativa de seus telômeros. A ação da telomerase, uma ribonucleoproteína que sintetiza uma fita do DNA desta região periférica do cromossomo, pode conduzir a resultados que levam certas linhagens celulares a uma condição “imortal”. Apesar disso, o uso de telomerase para imortalização de células não é recomendado, pois, quando está em desequilíbrio junto com outras proteínas do ciclo celular, como a p53, ela leva a um estado oncogênico (PRESCOTT, 1999).

O estudo de QTLs (Quantitative Trait Locus) relacionados com genes de longevidade pode vir a apresentar, com seus resultados, novas evidências para as teorias do envelhecimento e mapear genes envolvidos na longevidade de organismos. Por excluir totalmente os fatores ambientais que influenciam no processo de envelhecimento, a abordagem do mapeamento genético para o entendimento da biologia do envelhecimento poderia evitar um viés para algum mecanismo em particular. Ao invés de determinar quais genes estão envolvidos nos mecanismos de envelhecimento, a análise de QTLs simplesmente localiza genes candidatos, de acordo com as informações do tempo de vida de um organismo e seus genótipos (KLEBANOV, 2002).

1.2 Sobre as Teorias do Envelhecimento:

Do ponto de vista evolutivo, o envelhecimento é uma incógnita, pois uma vez que um organismo já tenha sido bem sucedido frente a mecanismos de seleção natural, sucumbe devido a disfunções em seu próprio sistema metabólico advindas de fontes internas ou externas.

Todas as teorias já propostas para explicar o envelhecimento e sua evolução podem ser divididas em dois campos, de acordo com a sua natureza: aquelas que descrevem fatores externos que levam o corpo do organismo a um estado de mal funcionamento e conseqüente senescência; e as de natureza interna, que consideram um determinismo genético no que se refere ao envelhecimento e senescência dos organismos.

Temos a teoria do Envelhecimento Programado. Este processo seria parte do programa de desenvolvimento dos organismos, sendo que ainda haveria influências ambientais. Em analogia a ação de genes que coordenam o desenvolvimento inicial dos organismos, gerontogenes atuariam nos estágios mais posteriores da vida, determinando a longevidade (LINTS, 1963). Por outro lado, LITHGOW & KIRKWOOD (1996) dizem que um programa genético de desenvolvimento não pode coordenar também o envelhecimento, porque no ambiente natural os organismos morreriam de um arranjo de causas intrínsecas e/ou extrínsecas, sem tempo para poder mostrar um quadro de senescência.

TAKAHASHI, em um artigo de 2000, relata que o silenciamento de um único gene (batizado *Klotho*) em uma linhagem especial de camundongos pode desencadear todo um quadro de envelhecimento prematuro. A proteína codificada por este gene; ao contrário do que se espera de um mecanismo genético do envelhecimento, que por sua vez atuaria a nível nuclear; é na verdade, secretada. Sua função seria exercida por meio da circulação, como um fator humoral, talvez interferindo em rotas de sinalização, sendo considerada um “hormônio anti-envelhecimento”.

A teoria da Pleiotropia Antagonística, levantada por WILLIAMS (1957), explica que um gene responsável por diversas características e sendo um fator positivo no início da vida, pode, no final dela, ser um fator catalisador do envelhecimento. Da mesma forma, o inverso pode acontecer. O comportamento deste fenômeno é descrito como um “efeito gangorra”, já que os efeitos de tais genes seriam benéficos no início e deletérios no final da vida, e vice-versa.

Entretanto, surgiram mais algumas teorias, todas relacionadas entre si pelo fato de explicarem o envelhecimento por fatores de origem externa. Uma das mais importantes é a da Taxa de Vida (*Rate of Living*), que diz que o tempo de vida estaria relacionado à atividade metabólica e seus níveis.

Nos anos 50, HARMAN (1957) postulou a teoria dos Radicais Livres, teorizando que espécies reativas de oxigênio, produzidas pelo próprio organismo, causariam um dano celular cumulativo e um conseqüente fenótipo de envelhecimento celular. As teorias de Harman só se comprovaram na década de 60, com a descoberta da Superóxido Dismutase (SOD) e de outras enzimas especializadas na captura dessas espécies reativas de oxigênio.

Viver em um ambiente oxigenado tem requerido a evolução de estratégias celulares efetivas para detectar e desintoxicar metabólitos de oxigênio molecular conhecidos como espécies reativas de oxigênio. As espécies reativas de oxigênio (EROs) englobam uma variedade de espécies químicas diversas, incluindo Ânions Superóxido, os Radicais Hidroxila e o Peróxido de Hidrogênio (FINKEL, 2000). Para combater o dano causado por estas EROs, toda célula possui uma “maquinaria de defesa antioxidante”. Uma série de cascatas bioquímicas interage com as EROs, levando-as a se tornarem água (PICCOLI, 2002).

Mas, além das defesas internas que um organismo pode ter para se proteger de injúrias das Eros, existe toda uma gama de substâncias exógenas que produzem efeitos antioxidantes. Dentre estas substâncias, o Resveratrol encabeça a lista dos mais pesquisados e efeitos mais bem conhecidos (PICCOLI, 2002)

Uma vez que o processo de envelhecimento tenha fatores genéticos na sua raiz, mas seja modulado por fatores ambientais, mecanismos de resposta a injúrias de natureza externa também se fazem importantes. A relevância do sistema de Proteínas de Choque Térmico (HSPs), que protegem a célula de insultos ambientais no contexto do envelhecimento pode ser vista em SAAVEDRA (1999). Neste caso, a resistência ao ambiente e seus rigores se mostra favorável ao aumento da longevidade. Organismos mais acostumados a choques de temperatura e outras adversidades ambientais têm em seus sistemas uma maior quantidade de proteínas HSPs, possuindo uma maior facilidade em resistir a eles e com longevidade aumentada.

Por uma ótica ecológica, o envelhecimento e subsequente morte dos organismos não só é necessária como bem vinda, pois desse modo acontece a sucessão de gerações e a ciclagem de elementos necessários à vida. Além disso, de acordo com as particularidades que cada organismo apresenta e que lhe permitem lidar com o preenchimento de um dado nicho ecológico, pode haver a construção de estratégias específicas que determinem o tempo de vida destes organismos. Assim, pode-se cogitar até mesmo o favorecimento do processo de envelhecimento. Por fim, indo a favor das condições ecológicas inerentes aos aspectos do envelhecimento, temos a chamada “Evolução Maligna”. Ela propõe que o envelhecimento e o fim da vida tenham uma vantagem seletiva. Assim, haveria em um ambiente mais recursos disponibilizados, além de um aumento do número de gerações em relação ao tempo, favorecendo a adaptabilidade destes organismos a alterações ambientais (KIRKWOOD, 1977) o que só seria possível por meio de seleção de grupo (KIRKLAND, 1989).

Por outro lado, podemos encarar o envelhecimento sob uma ótica evolucionista não Darwiniana. Já que um fenótipo senescente só se expressa após o período reprodutivo, a seleção natural seria ineficaz para os genes responsáveis por este fenótipo (Teoria do acúmulo de mutações, de MEDAWAR, 1952). Nesse sentido, esta teoria aborda uma estratégia não adaptativa para a evolução da senescência.

Em consonância, a teoria chamada de Teoria do Corpo Descartável (KIRKWOOD, 1977), salienta que, depois do organismo já ter se reproduzido, ele se torna obsoleto, já que seus genes foram passados adiante.

Além disso, fatores extrínsecos eliminam os indivíduos mais do que a seleção o faria contra genes deletérios, bem como o seria com o favorecimento de genes benéficos.

1.3 Sobre os Marcadores de Idade:

Em estudos de envelhecimento, quando se investiga uma amostra de indivíduos de uma população natural, se faz necessário saber a distribuição etária dela. Por isso, o uso de indicadores de idade que sejam confiáveis é de suma importância. Muitas abordagens têm sido pesquisadas e adotadas.

Atualmente, está aceito o conceito de que cada célula possui um número determinado de divisões celulares a serem realizadas (RUBIN, 1997). E um dos mais determinantes comportamentos de uma célula que está envelhecida é a diminuição de sua taxa de divisões celulares. Mas essa diminuição da taxa não é igual para todos os tecidos componentes de um mesmo organismo. Diferentes tecidos têm diferentes taxas de diminuição de suas divisões celulares.

Entretanto, esta abordagem não pode ser aplicada em estudo de envelhecimento de insetos, pois, quando no estágio adulto, suas células são pós-mitóticas (exceto por suas gônadas).

Já a formação de Lipofuscina e outros pigmentos de envelhecimento se mostra mais regular do ponto de vista morfológico e se mostra muito promissor em estudos de tecidos que apresentem um comportamento pós-mitótico (CHOW & RUBIN, 1996).

1.4 Sobre a Lipofuscina e outros pigmentos fluorescentes:

Lipofuscina é o termo genérico empregado por muitos autores para todo pigmento autofluorescente cuja formação se dá através de processos de peroxidação de lipídios. Entretanto, lipofuscina é o nome de um componente específico destes corpos de fluorescência natural. O uso do mesmo termo para ambas as situações têm gerado alguma confusão entre os pesquisadores. Portanto, é recomendado o uso do termo Pigmentos Ceróides como termo genérico, deixando Lipofuscina apenas como nome específico (PORTA, 2002).

Mesmo tendo sido descoberta no séc. XIX, foi somente nos anos 50 que pesquisadores relacionaram o acúmulo de lipofuscina e outros pigmentos ceróides com o envelhecimento (SCHMUCKER, 2002).

KATZ comenta em um artigo de 1996 que, por análises cromatográficas, o maior componente dos pigmentos ceróides formado em tecido de retina é um complexo covalente entre o Retinaldeído e Etanolamina. Mas mesmo assim, tanto a composição molecular quanto os mecanismos de formação dos pigmentos ceróides ainda não estão completamente elucidados.

A peroxidação lipídica é conhecida por gerar aldeídos reativos tais como 4-hidroxi-2-nonenal e malondi-aldeído. Uma vez gerados, aldeídos reativos podem reagir subsequentemente com aminas para formar produtos fluorescentes (TIRMENSTEIN, 1998).

TERMAN (1999) descreve um outro processo de formação de pigmentos ceróides/lipofuscina. Em culturas de fibroblastos, sob um ambiente de estresse oxidativo moderado prolongado, chamado hiperóxia, ocorre a formação destes corpos ceróides em presença de Naftazarin-5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona (conhecido por Naftazarin), uma substância que gera tanto produtos O_2 como H_2O_2 , seja por meios espontâneos, seja através da ação combinada com Superóxido Dismutase. Pigmentos ceróides/lipofuscina representam uma mistura muito complicada de substâncias, e algumas delas podem potencialmente agir como prooxidantes. Dentre tais componentes candidatos estão metais de transição, particularmente, ferro (Fe^{+3}). A presença de ferro redox ativo dentro do compartimento lisossomial é de importância para a ação de Naftazarin.

Mas, como já comentado acima, uma melhor caracterização da composição e formação dos produtos sob o nome de pigmentos ceróides/lipofuscina ainda é oportuna.

2. Desenvolvimento e Discussão:

A *Drosophila* como modelo em estudos da evolução do envelhecimento apresenta muitas vantagens, advindas das próprias características do organismo. Sua composição no estágio adulto por células pós-mitóticas, sua alta capacidade de reprodução e seu tempo de geração breve; são grandes atrativos para a pesquisa gerontológica.

O uso da *Drosophila willistoni* como um organismo modelo em estudos de evolução do envelhecimento vem tomando corpo em nosso laboratório nos últimos anos, devido ao seu endemismo na região Neotropical e à sua adaptabilidade a climas diferenciados. Dentro deste contexto, estudos comparativos de populações de *Drosophila willistoni* adaptadas a regiões climáticas distintas mostrou diferenças na longevidade entre elas. Populações adaptadas ao frio possuem uma longevidade aumentada e uma melhor resposta a estresses, baseado na produção de proteínas de choque térmico (HSPs); do que populações que vivem em ambientes mais quentes e mais homogêneas (SAAVEDRA, 1999).

Procurando determinar o padrão de acúmulo de pigmentos naturais ao longo das idades em tecidos de *Drosophila willistoni*, analisou-se uma coleção de lâminas histológicas com indivíduos provenientes do Parque Florestal Estadual do Turvo (27° e 27° 20' S, 53° e 54° 10' O) de ambos os sexos e em idades crescentes (7, 20, 40, 60 e 80 dias). Os indivíduos eram fixados em Bouin por 24 horas, passados em etanol 70% e mantidos em geladeira até a fase de inclusão em parafina. Para a diafanização foi usado clorofórmio. Os indivíduos foram fatiados horizontalmente em cortes de corpo inteiro com 10µm de

espessura e dispostos em séries de 7 em 7 (MIQUEL, 1986). Alternadamente, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina ou então deixadas sem coloração. As lâminas coradas se destinaram a estudos morfométricos de cérebro e espermateca (SAAVEDRA, 1999). As lâminas sem coloração foram usadas para a determinação do padrão de acúmulo de pigmentos autofluorescentes como um candidato a marcador de idade, no presente trabalho.

Para avaliar-se o padrão de acúmulo de fluorescência natural, as lâminas sem coloração foram observadas em microscopia de fluorescência com filtro de 450-490 nm, onde a fluorescência se apresenta com uma cor amarelo cítrica.

AMENTA (1994) utilizou-se de uma metodologia equivalente para avaliar os padrões de lipofuscina em estudos neuroanatômicos de camundongos. Os filtros usados por ele cobriam a faixa de 430-490 nm, conferindo assim uma cor amarelo alaranjada para a fluorescência obtida.

Em nosso trabalho, foram fotografados cortes selecionados pela qualidade do conjunto de órgãos mostrados, como exemplificado na Figura 1. Com o conjunto de registros fotográficos do acúmulo de pigmentos fluorescentes, fez-se um álbum. Procedeu-se, então uma análise qualitativa e comparativa no conjunto de dados, que está explicitada nas Tabelas 1 e 2. Calculou-se a média de valores de acúmulo para cada idade de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\Sigma (\text{unidades de intensidade de fluorescência de uma idade específica})}{\Sigma (\text{indivíduos da mesma idade específica})}$$

Com as informações baseadas nas tabelas 1 e 2, construiu-se o gráfico mostrado na Figura 2, que mostra os padrões de acúmulo de pigmentos.

Os dados obtidos e aqui apresentados, demonstram uma diferença surpreendente com relação àqueles oferecidos pela literatura atual.

Dentro da população observada, a diferença no padrão de acúmulo é bastante evidente entre os sexos. Os machos apresentam um pico de acúmulo de pigmentos autofluorescentes na faixa etária dos 20 dias, enquanto que as fêmeas têm seu pico de acúmulo aos 60 dias. Além disso, o acúmulo dos machos sempre se mostraram bem mais altas que as das fêmeas (ver Figura 2).

Os estudos morfométricos, usando-se as lâminas coradas, tanto de gânglio cerebral quanto de espermateca de *Drosophila*, visavam determinar as alterações morfológicas que ocorrem ao longo do tempo (SAAVEDRA, 1999).

Com relação às medidas do gânglio cerebral, observou-se apenas uma diminuição significativa do lobo esquerdo, sendo que as outras, apesar de variarem, não apresentavam um valor significativo. As medidas de espermateca se mostraram mais conclusivas, pois ela parece ser maior em moscas relativamente mais jovens, aos 20 dias de idade, e menor em moscas mais velhas, com 80 dias de idade (ver Figura 3).

Considerando os dados coletados pelos experimentos descritos, além de observar as taxas de produtividade (número de descendentes) das fêmeas (ver Figura 4), podemos observar que as o acúmulo acompanham os períodos de

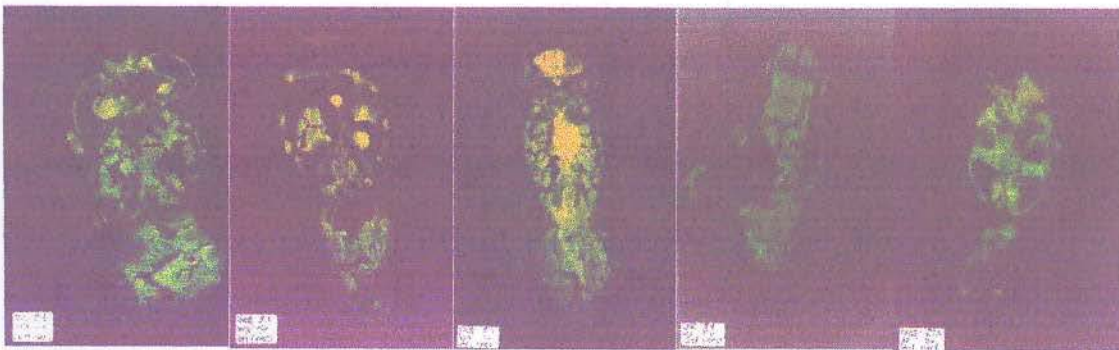
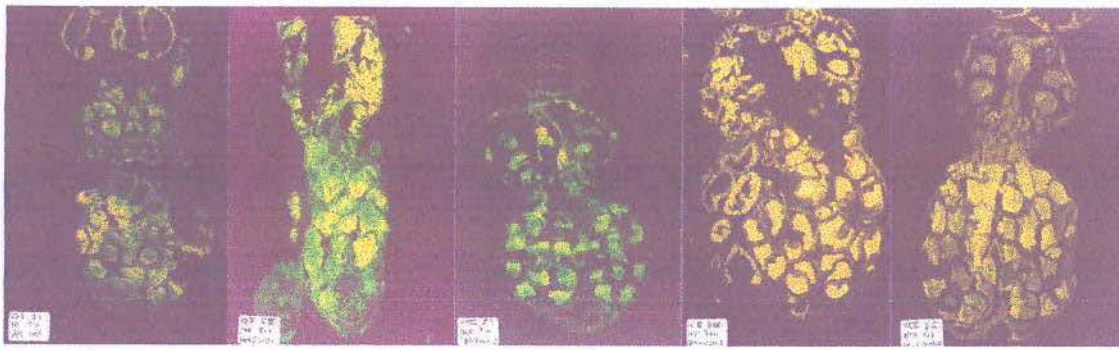


Figura 1: Registro fotográfico dos padrões de acúmulo de Pigmentos Autofluorescentes em tecidos de *Drosophila willistoni* fêmeas (acima) e machos (abaixo) em idades de 7, 20, 40, 60 e 80 dias.

Tabela 1: Intensidade de fluorescência natural em secções longitudinais de *Drosophila willistoni* fêmeas ao longo de cinco idades específicas (7, 20, 40, 60 e 80 dias) em fotografias tomadas em três tempos de exposição (T=-1, T=0 e T=+1).

Nº amostras	Amostra (Fêmeas)	T=-1	T=0	T=+1
N=3 (4)	F1, 7D, L8, C10	XXX	XX	X
	F1, 7D, L8, C12		XXX	XX
	F2, 7D, L, C	XXX	XXX	XX
	F3, 7D, L, C	XX	XX	XX
N=3 (4)	F1, 20D, L6, C13		XXXX	XXX
	F2, 20D, L8, C13		X	X
	F4, 20D, L6, C2	XX	XXXX	XXX
	F4, 20D, L6, C3	XX	XXXX	XXX
N=2 (3)	F1, 40D, L6, C2		0	XXX
	F1, 40D, L6, C5		XXXX	
	F2, 40D, L6, C2		XXX	
N=3 (8)	F1, 60D, L4, C8		XXXX	XXXXXX
	F1, 60D, L4, C10		XXXXXX	
	F2, 60D, L4, C1		XXX	XXXXXX
	F2, 60D, L6, C5		XXXXXX	XXXXXX
	F7, 60D, L4, C2		X	
	F7, 60D, L4, C8		XXXX	XXX
	F7, 60D, L4, C14		XXXXX	XXXXX
	F7, 60D, L6, C1		XXXXXX	XXXXXX
N=2 (6)	F1, 80D, L6, C5			XXX
	F2, 80D, L6, C1		X	XXXX
	F2, 80D, L6, C1		XXX	XXXX
	F2, 80D, L6, C1		XXXXX	
	F2, 80D, L6, C4		XXXXX	XXXXX
	F2, 80D, L6, C6		X	XXXXX

(cada X representa uma unidade arbitrária de intensidade luminosa, F identifica a fêmea, D é o número de dias, L é a lâmina e C é a secção longitudinal).

Tabela 2: Intensidade de fluorescência natural em secções longitudinais de *Drosophila willistoni* machos ao longo de cinco idades específicas (7, 20, 40, 60 e 80 dias) em fotografias tomadas em três tempos de exposição. (T=-1, T=0 e T=+1).

Nº amostras	Amostra (Machos)	T=-1	T=0	T=+1
N=3 (3)	M1, 7D, L4, C7	XXXX	XXXX	XXX
	M2, 7D, L4, C11	XXX	XX	
	M3, 7D, L4, C8	XX	XX	XX
N=4 (4)	M1, 20D, L4, C1	XXXXX	XXXXX	XXXXX
	M2, 20D, L6, C6	XX	XX	XX
	M3, 20D, L6, C5	XXXX	XXXX	XXXX
	M4, 20D, L6, C13	XXXXX	XXXX	XXXXX
N=4 (4)	M1, 40D, L4, C11	XXXX	XXXX	XXXX
	M2, 40D, L8, C3	XXX	XX	XX
	M3, 40D, L6, C3	XXXXXXX	XXXXXXX	XXXXXXX
	M4, 40D, L4, C10	X		X
N=3 (3)	M3, 60D, L10, C9	XX	XX	XX
	M4, 60D, L4, C10	X	X	X
	M5, 60D, L8, C7	X	X	XX
N=3 (3)	M1R, 80D, L4, C5	XX	XX	XX
	M2R, 80D, L4, C4	XX	XX	XX
	M3R, 80D, L6, C10	X	X	X

(cada X representa uma unidade arbitrária de intensidade luminosa, M identifica o macho, D é o número de dias, L é a lâmina e C é a secção longitudinal).

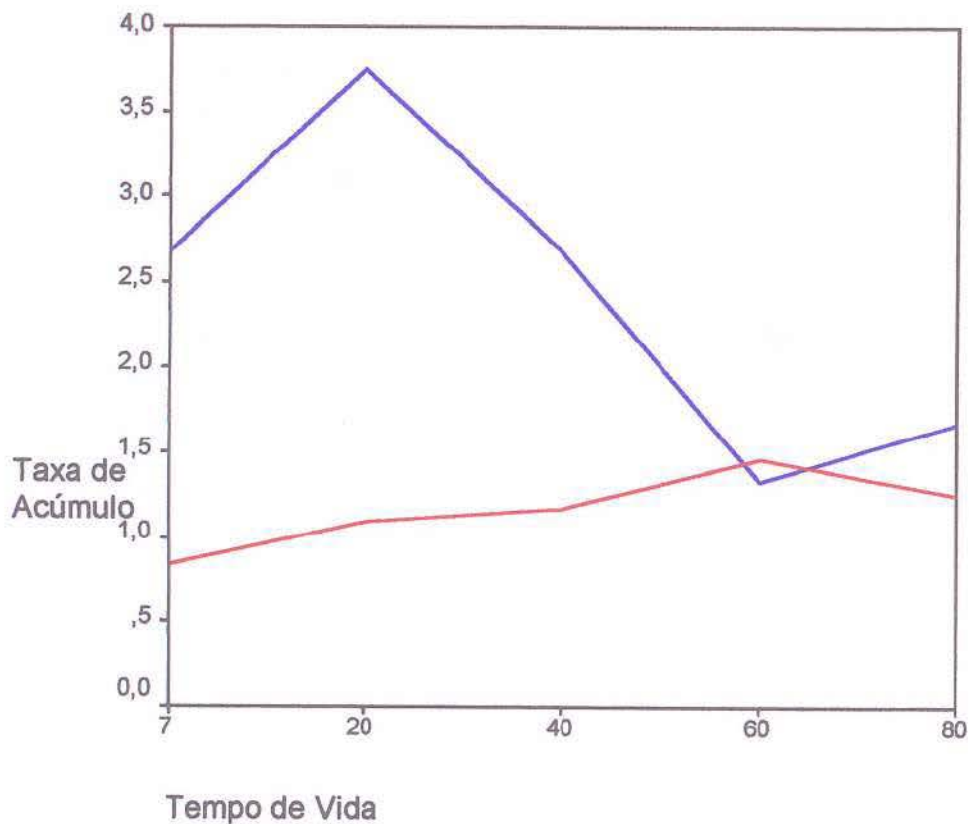


Figura 2: Padrão do acúmulo de pigmentos autofluorescentes em machos (azul) e fêmeas (vermelho) de *Drosophila willistoni* ao longo das idades de 7, 20, 40, 60 e 80 dias.

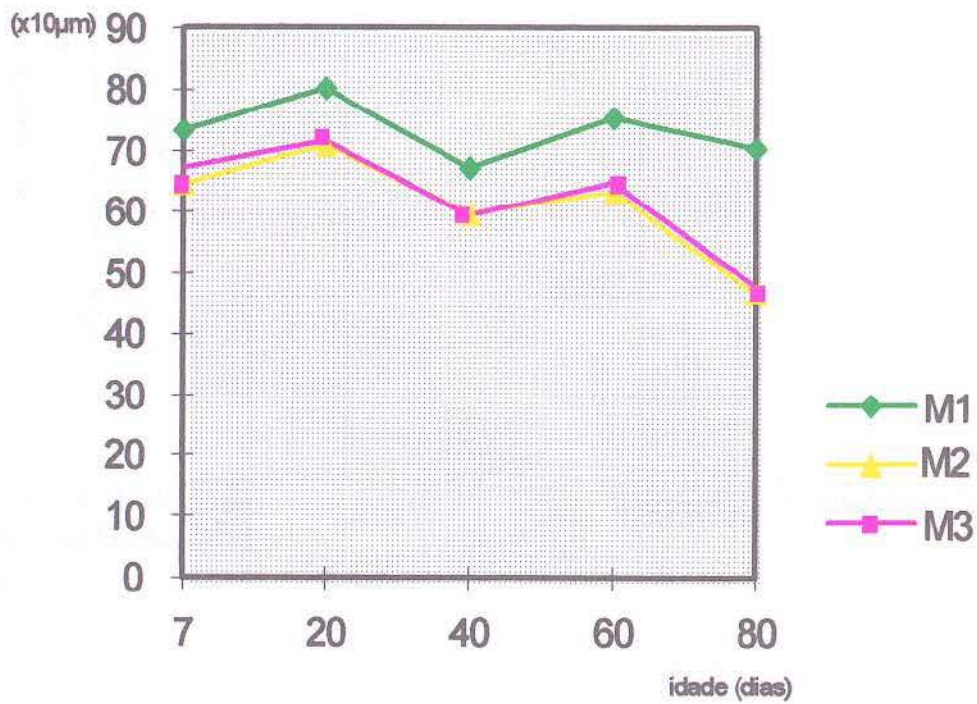


Figura 3: Médias das medidas M1, M2 e M3 da espermateca de *D. willistoni* nas idades consideradas (SAAVEDRA, 1999).

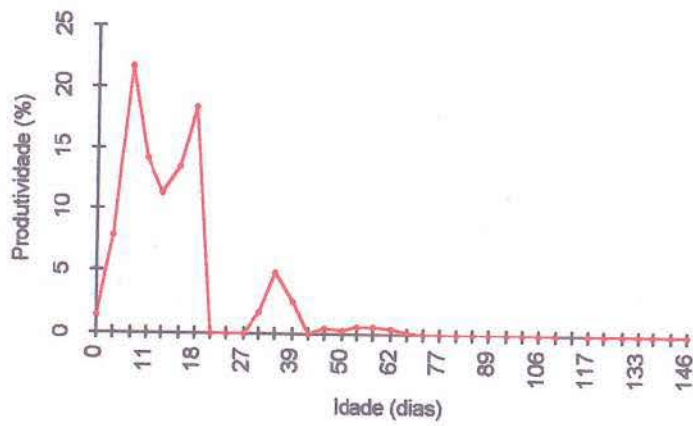


Figura 4: Produtividade total de uma amostra de linhagens de *Drosophila willistoni* (SAAVEDRA, 1999).

fluorescência acompanham os períodos de maior atividade reprodutiva das fêmeas desta espécie (SAAVEDRA, 1999). E devido a toda a diferença de gasto energético que existe entre os sexos, em que os machos possuem níveis mais altos de acúmulo de pigmentos autofluorescentes do que as fêmeas, podemos inferir que existe uma relação inversa entre os níveis de acúmulo e a longevidade. Sendo assim, as fêmeas possuem um tempo de vida maior do que os machos como mostra a Figura 5.

PATRIDGE (1986) relata que existe uma correlação positiva entre o sucesso de acasalamento idade-específico e o tempo de vida em *Drosophila melanogaster*, e que ambas as características estão relacionadas entre si pelo tamanho corporal, sendo que animais maiores vivem mais e se reproduzem mais. Apesar da aparente pouca energia que o macho gasta em atividade reprodutiva se comparado com os valores das fêmeas, este autor salienta todo o dispêndio energético com a produção do esperma, com a procura de fêmeas e com o comportamento de corte. Além disso, fêmeas de *melanogaster* que foram esterilizadas, e portanto não copulavam, tiveram o seu tempo de vida aumentado, e fêmeas sem machos também tiveram suas longevidades aumentadas, as virgens mais do que as já cruzadas com machos.

Por fim, a atividade sexual pode reduzir a longevidade de duas maneiras: a primeira seria a de uma falha nos sistemas vitais do organismo, devido ao dispêndio energético (altas taxas metabólicas) do indivíduo com uma vida reprodutiva intensa. A segunda refere-se à aceleração do processo de senescência pela atividade sexual, que leva a uma queda do desempenho de componentes de manutenção, tais como expectativa de vida e fertilidade com o avanço da idade. A reprodução consumiria recursos energéticos que poderiam ser usados em reparo corporal, levando assim, a um estado físico mais debilitado e envelhecido (PATRIDGE, 1986).

Por outro lado, este padrão de acúmulo diferenciado entre os sexos nos leva a outras facetas do ciclo de vida e tempo de vida do organismo em questão. Quando estudamos um organismo modelo, devemos levar em conta dados que possam não ser imediatamente relevantes à pesquisa, como os hábitos sexuais, nutrição, entre outros.

Em primeiro lugar, com os níveis de acúmulo de pigmentos em machos se apresentando bem mais altos que os das fêmeas por quase todo o tempo de vida deles, temos um apoio a teoria da Taxa de Vida. Se os machos têm taxas metabólicas mais altas do que as das fêmeas, dão origem a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio e tendem a viver menos.

Tirmenstein (1998) afirma que dentre as EROs, são principalmente os peróxidos que reagem com corpos lipídicos, formando os corpos de pigmentação fluorescentes (característico marcador de idade).

Além disso, pudemos verificar que de acordo com os hábitos reprodutivos do macho de *Drosophila willistoni*, o seu acúmulo pode ser precocemente alto, sendo reduzido com o tempo nos machos. Isso nos mostra que nem sempre um valor absoluto alto é indicador de uma idade avançada.

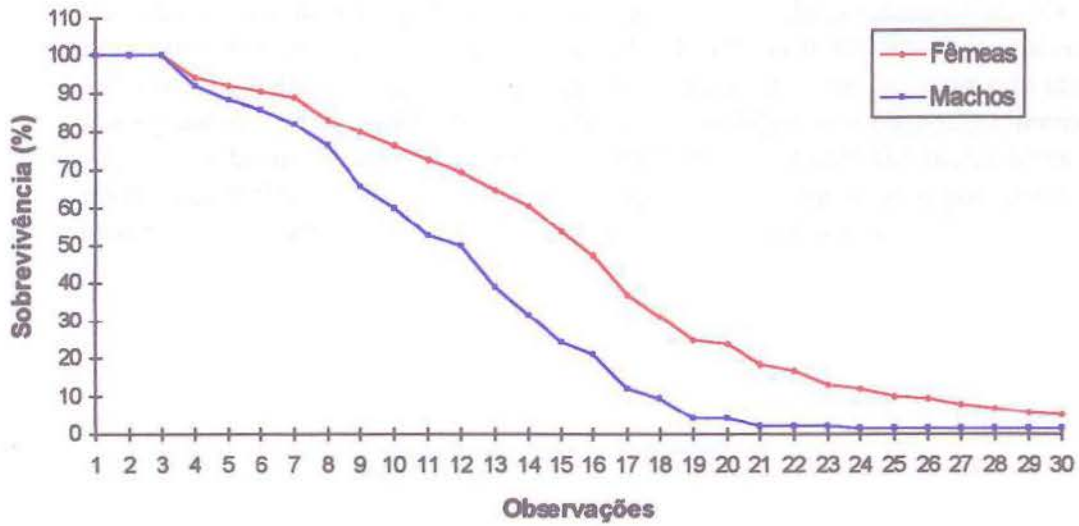
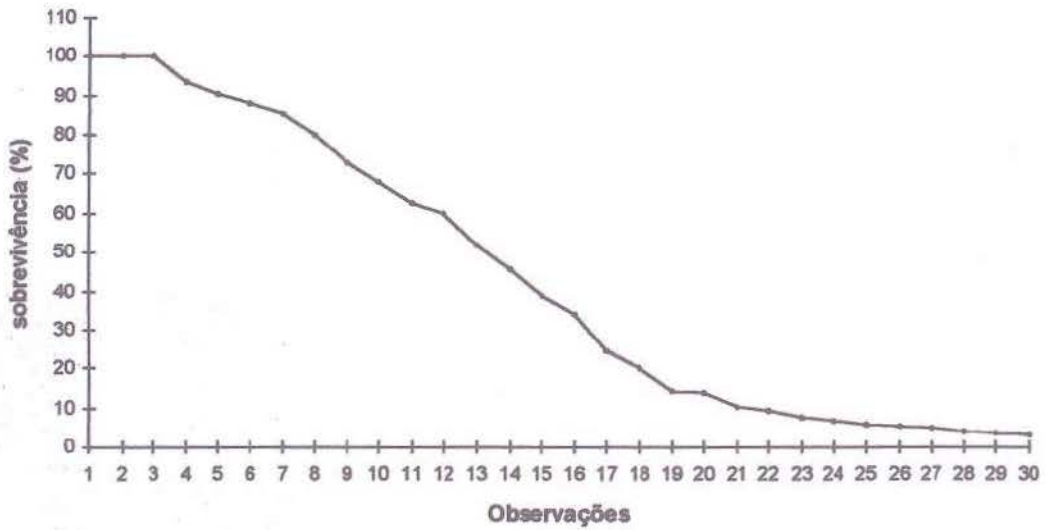
A**B**

Figura 5. Curvas de sobrevivência da amostra de *D. willistoni* da população do P.F.E. do Turvo (acasalados e não-acasalados). A) Machos e fêmeas considerados separadamente. B) Ambos os sexos (SAAVEDRA, 1999). Intervalo entre observações = 3,5 dias.

3. Conclusão:

Portanto, de acordo com os dados apresentados, os estudos de marcadores de idade envolvendo pigmentos fluorescentes devem ser melhor avaliados, uma vez que o acúmulo destes pigmentos realmente se dá ao longo da vida do organismo aqui estudado, mas pode sofrer influências dramáticas que parecem ser resultantes da atividade física/metabólica, portanto propomos que este efeito pode mascarar os reais padrões de acúmulo relacionados com o envelhecimento.

No futuro, pretende-se explorar melhor os estudos de marcadores de idade, quantificando-se os valores de acúmulo de pigmentos por meio de imagens computadorizadas e calculando-se suas taxas de acúmulo.

4. Bibliografia:

- Amenta, F.; Bongrani, S.; Cadel, S.; Ricci, A.; Valsecchi, B.; Zeng, Y. 1994. Neuroanatomy of Aging Brain. in: Nagy, I. Z.; Harman, D.; Kitani, K. (Eds). **Pharmacology of aging processes**. New York. The New York Academy of Sciences. 350 p.
- Chow, M.; Rubin, H. 1996. Evidence for cellular aging in long term confluent cultures: heritable impairment of proliferation, accumulation of age pigments and their loss in neoplastic transformation. **Mechanisms of Ageing and Development 89**: 165-183.
- Finkel, T.; Holbrook, N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature 408**: 239-247.
- Harman, D. 1957. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology 2**: 298-300.
- Hayflick, L. 1980. The cell biology of human aging. **Scientific American 242**(1): 42-49.
- Katz, M. L.; Gao, C.; Rice, L. M. 1996. Formation of lipofuscin-like fluorophores by reaction of retinal with photoreceptor outer segments and liposomes. **Mechanisms of Ageing and Development 92**: 159-174.
- Kirkland, J.L. 1989. Evolution and ageing. **Genome, 31**:398-405.
- Kirkwood, T.B.L. 1977. Evolution of ageing. **Nature, 270**:301-304.
- Klebanov, S.; Harrison, D. E. 2002. Optimizing detection of QTLs retarding aging: choice of statistical model and animal requirements. **Mechanisms of Ageing and Development 123**: 131-144.
- Lithgow, G. J.; Kirkwood, T. B.L. 1996. Mechanisms and evolution of Aging. **Science 273**: 80.
- Medawar, P.B. 1952. **An unsolved problem of Biology**. H.K. Lewis, London.
- Miquel, J.; Philpott, D. E. 1986. Structural Correlates of Aging in *Drosophila*: Relevance to the Cell Differentiation, Rate of Living and Free Radical Theories of Aging. In: Collatz, K. G.; Sohal, R.S. (eds.). **Insect Aging**. Berlin/Heidelberg, Springer-Verlag. 240p.
- Mikhelson, V. M. 2001. Replicative mosaicism might explain the seeming contradictions in the telomere theory of aging. **Mechanisms of Ageing and Development 122**: 1361-1365.

- Patridge, L. 1986. Sexual activity and life span. In: Collatz, K. G.; Sohal, R.S. (eds.). **Insect Aging**. Berlin/Heidelberg, Springer-Verlag. 240 p.
- Piccoli, J. C. E. 2002. Efeito do Resveratrol na biologia do envelhecimento de *Caenorhabditis elegans* (nematoda). **Dissertação submetida ao corpo docente do curso de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Gerontologia Biomédica**. 56 p.
- Porta, E. A.; Berra, A.; Monserrat, A. J.; Benavides, S. H. 2002. Differential lectin histochemical studies on lipofuscin (age pigment) and on selected ceroid pigments. **Archives of Gerontology and Geriatrics 34**: 193-203.
- Prescott, J. C.; Blackburn, E. H. 1999. Telomerase: Dr Jekyll or Mr Hyde? **Current Opinion in Genetics and Development 9**: 368-373.
- Rubin, H. 1997. Cell aging "in vivo" and "in vitro". **Mechanisms of Ageing and Development 98**: 1-35.
- Saavedra, C. C. R. 1999. Estudos de características genéticas associadas ao envelhecimento em espécies de *Drosophila* adaptadas a regiões termicamente distintas. **Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do Título de Doutor em Ciências**. 223p.
- Salathia, N.; Edwards, K.; Millar, A. J. 2002. QTL for timing: a natural diversity of clock genes. **Trends in Genetics 18**: 115-118.
- Schmucker, D. L.; Sachs, H. 2002. Quantifying dense bodies and lipofuscin during aging: a morphologist perspective. **Archives of Gerontology and Geriatrics 34**: 249-261.
- Takahashi, Y.; Kuro-o, M.; Ishikawa, F. 2000. Aging mechanisms. **PNAS 97**: 12407-12408.
- Terman, A.; Abrahamsson, N.; Brunk, U. T. 1999. Ceroid/Lipofuscin-loaded human fibroblasts show increased susceptibility to oxidative stress. **Experimental Gerontology 34**: 755-770.
- Tirmenstein, M. A.; Pierce, C. A.; Leraas, T. L.; Fariss, M. W. 1998. A Fluorescence Plate Reader Assay for Monitoring the Susceptibility of Biological Samples to Lipid Peroxidation. **Analytical Biochemistry 265**: 246-252.

Vijg, J. 2000. Somatic mutations and aging: a re-evaluation. **Mutation Research** 447: 117-135.