



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Biologia

GUILHERME TONON DA SILVA

RIBOSÍDEO DE NICOTINAMIDA (NR), UMA MOLÉCULA DOADORA DE NAD^+ ,
FALHA EM ATIVAR O METABOLISMO E RETARDAR O ENVELHECIMENTO EM
CAENORHABDITIS ELEGANS

CAMPINAS

2020

GUILHERME TONON DA SILVA

**RIBOSÍDEO DE NICOTINAMIDA (NR), UMA MOLÉCULA DOADORA DE NAD⁺,
FALHA EM ATIVAR O METABOLISMO E RETARDAR O ENVELHECIMENTO EM
*CAENORHABDITIS ELEGANS***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de
Mestre em Genética e Biologia Molecular,
na área de Genética Animal e Evolução

Orientador: MARCELO ALVES DA SILVA MORI

ESTE ARQUIVO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO GUILHERME
TONON DA SILVA, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. MARCELO ALVES DA SILVA
MORI

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

T616r Tonon-da-Silva, Guilherme, 1991-
Ribosídeo de nicotinamida (NR), uma molécula doadora de NAD⁺, falha em ativar o metabolismo e retardar o envelhecimento em *Caenorhabditis elegans* / Guilherme Tonon da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Marcelo Alves da Silva Mori.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Envelhecimento. 2. NAD. 3. Ribosídeo de nicotinamida. 4. Enzima Dicer. 5. *Caenorhabditis elegans*. I. Mori, Marcelo Alves, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Nicotinamide riboside (NR), a NAD⁺-booster molecule, fails to increase lifespan and improve metabolism in *Caenorhabditis elegans*

Palavras-chave em inglês:

Aging

NAD

Nicotinamide riboside

Dicer enzyme

Caenorhabditis elegans

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Alves da Silva Mori [Orientador]

Murilo Vieira Geraldo

Fernanda Marques da Cunha

Data de defesa: 28-02-2020

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3222-9854>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4457010149957792>

Campinas, 28/02/2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Alves da Silva Mori

Prof. Dr. Murilo Vieira Geraldo

Profa. Dra. Fernanda Marques da Cunha

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros supracitados encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertações e Teses e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia.

AGRADECIMENTOS

Gostaria, primeiramente, de agradecer aos meus pais, Victoria e Julio, por terem sido sempre muito presentes, amorosos e suportivos, além de terem inculcido em mim valores éticos que eu carregarei para sempre comigo. Agradeço ao meu irmão, Gabriel, por uma vida inteira de amizade, companheirismo, amadurecimento e compartilhamento de ideais. Agradeço também à minha irmãzinha Thaeme, que chegou há pouco tempo em casa mas já trouxe alegria e brilho à nossa família.

Agradeço à minha companheira, Jessica, por tanto amor, companheirismo e sonhos e planos compartilhados. Obrigado por tanta paciência sempre que minha cabeça estava sobrecarregada com um mar de preocupações. Obrigado por despertar o melhor de mim e por me permitir fazer o mesmo contigo. A vida é mais leve e alegre ao seu lado.

Agradeço aos meus colegas e amigos de laboratório, Raissa, Bruna, Juca, Felipe, Gabriel, Carol, Bia, Andrea, Raíssa, Henrique, Willian, Deisi, Carlos, Sweta, Dinçer, Evandro, além de tantos outros, e, especialmente, Silas, por ter sido quase um co-orientador, sempre me incentivando e aconselhando tanto pessoal quanto cientificamente, e Thi, por ter sido meu primeiro amigo desde a época da graduação e por termos sempre trilhado juntos os caminhos científicos, nos inspirando e aprendendo mutuamente. Um agradecimento especial também à Elzira, que além de ser a melhor técnica que o laboratório poderia ter, é uma grande amiga e uma das pessoas mais dedicadas e sensacionais que eu já conheci.

Agradeço ao meu orientador, Marcelo Mori, um cientista extraordinário e um conselheiro espetacular, que sempre soube respeitar minha mente hiperativa, extremamente multidisciplinar e predominantemente teórica ao mesmo tempo que me guiou pacientemente no desenvolvimento das minhas capacidades práticas e pragmáticas. Obrigado por ter desde sempre promovido um ambiente tão cientificamente rico e oferecido tantas oportunidades de amadurecimento aos integrantes do laboratório.

Agradeço a todos os indivíduos que se dedicaram de alguma forma à construção da Ciência e do pensamento lógico, tanto aos que o fizeram ao longo da

História quanto aos que o fazem no presente, possibilitando que eu tivesse nascido e me desenvolvido intelectualmente em uma época com tantos avanços científicos. Isso inclui meus professores e pares científicos.

Por fim, agradeço enormemente à programadora cazaque Alexandra Elbakyan, cuja *Magnum opus*, o Sci-Hub, é a representação máxima de um modelo plural de acesso gratuito às informações científicas. Elbakyan precisa viver escondida para não ser extraditada e presa por ter decidido enfrentar um sistema editorial sórdido e pernicioso.

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Bolsa de Mestrado no país, processo nº 2017/08829-5) e da CAPES, as quais eu imensamente agradeço.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A população mundial está envelhecendo cada vez mais, o que tem levado a um aumento na prevalência de doenças associadas ao envelhecimento. A restrição calórica (RC) é uma intervenção conservada evolutivamente que foi mostrada estender o tempo de vida e retardar o início de doenças associadas ao envelhecimento em várias espécies. Porém, uma vez que a RC consiste em uma dieta difícil de seguir, além de eventualmente provocar efeitos colaterais em humanos, a busca por miméticos de RC, bem como o entendimento de seus mecanismos de ação, faz-se necessária. É sabido que parte dos efeitos benéficos da RC depende de um aumento nos níveis de NAD⁺. De fato, intervenções que elevam os níveis de NAD⁺, como suplementação com ribosídeo de nicotinamida (NR), um análogo de vitamina B3, foram mostradas prevenir o declínio metabólico associado ao envelhecimento, estimular o metabolismo oxidativo e estender o tempo de vida em camundongos e nematoides, sugerindo um grande potencial desse composto para o tratamento de doenças associadas ao envelhecimento. Porém, diferentemente do esperado, nós não observamos aumento no tempo de vida em *C. elegans* com NR, nas condições convencionalmente encontradas na literatura. Nós realizamos os experimentos alterando múltiplas condições experimentais, como: usar bactéria viva ou morta para alimentar os nematoides, adicionar FUDR (um inibidor de mitose) ou não, transferir frequentemente os nematoides para placas novas ou mantê-los na mesma placa durante toda sua vida, alterar o tempo de início do tratamento, testar nematoides com diferentes *backgrounds* genéticos, adicionar NR na placa ou diretamente na bactéria, e até mesmo trocar o fornecedor de NR. Em nenhuma dessas condições foi possível observar um aumento consistente no tempo de vida dos nematoides. Efetivamente, em algumas replicatas houve até mesmo uma diminuição da longevidade. De modo similar, tanto o repórter gênico *hsp-6::GFP* quanto o *sod-3::GFP* não foram ativados em resposta ao tratamento com NR, diferentemente do que havia sido mostrado na literatura. Por fim, nas nossas condições, NR não preveniu o declínio de mobilidade relacionado ao envelhecimento nem aumentou a expressão de genes que codificam para enzimas que controlam as principais vias metabólicas (ciclo de Krebs (*cts-1*), glicólise (*hxxk-1*), gliconeogênese (*pyc-1*)), conforme determinado por RT-qPCR. Em conjunto, esses dados sugerem que os efeitos do NR no tempo de vida e no metabolismo de *C. elegans* são menos robustos do que predito anteriormente.

Palavras-chave: envelhecimento; ribosídeo de nicotinamida; NAD⁺; *C. elegans*; Dicer

ABSTRACT

The world's population is increasingly aging, leading to an increase in the prevalence of age-related diseases. Caloric restriction (CR) is an evolutionarily conserved intervention shown to extend lifespan and delay the onset of age-related diseases across species. However, due to some undesirable effects in humans, and because CR consists of a strict diet, the search for CR mimetics and the understanding of their molecular effects becomes necessary. It has been shown that some beneficial effects of CR depend on an increase in NAD⁺ levels. In fact, interventions aiming to raise NAD⁺ levels, such as supplementation with nicotinamide riboside (NR), a vitamin B3 analogue, have been shown to prevent age-associated metabolic decline, increase oxidative metabolism and promote longevity in mice and worms, which made this compound very promising to target age-related diseases. Unexpectedly though, we observed no increase in *C. elegans* lifespan using NR at the standard conditions found in the literature. We performed the experiments altering multiple experimental conditions, like using live or dead bacteria, adding FUdR (a mitosis inhibitor) or not, passing worms to new plates or keeping them in the same plate throughout their lifespan, changing the timing of the treatment, testing worms of different genetic backgrounds, adding NR in the plate or to the bacteria and even changing the NR supplier. In none of these conditions could we see a consistent increase in worms' lifespan. In fact, in some replicates we even saw a decrease in worm lifespan. Similarly, neither *hsp-6::GFP* nor *sod-3::GFP* reporters were activated upon NR treatment, opposite to what has been shown. Finally, in our hands NR at 500 μ M could neither prevent age-related mobility decline nor increase genes coding for enzymes controlling key metabolic pathways (TCA cycle (*cts-1*), glycolysis (*hvk-1*), gluconeogenesis (*pyc-1*)), as assessed by RT-qPCR. Together, these data suggest that NR effects in worm lifespan and metabolism might be less robust than previously anticipated.

Keywords: aging; nicotinamide riboside; NAD⁺; *C. elegans*; Dicer

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Impacto social do envelhecimento.....	11
1.2. Restrição calórica, envelhecimento, NAD⁺ e sirtuínas.....	12
1.3. NR (Ribosídeo de Nicotinamida) como mimético de restrição calórica.....	13
1.4. Dicer (DCR-1) é crucial para RC e para algumas das suas intervenções miméticas	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Condições de cultura e linhagens de C. elegans.....	19
3.2. Sincronia de Vermes.....	19
3.3. Experimentos com RNAi.....	20
3.4. Tempo de vida.....	21
3.5. Resistência a estresse térmico e estresse oxidativo com Paraquat	21
3.6. Extração de DNA e PCR Convencional.....	22
3.7. Ensaio de mobilidade	23
3.8. RT-qPCR.....	24
3.9. Aquisição de imagens GFP.....	24
3.10. Quantificação de NAD⁺/NADH	25
3.11. Forma de análise dos resultados	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. Suplementação com NR não aumenta o tempo de vida nem a resistência aos estresses térmico e oxidativo	27
4.2. Doadores de NAD⁺ não afetam o tempo de vida e a resistência ao estresse..	33

4.3. Independentemente da concentração utilizada, NR não aumenta o tempo de vida e a resistência aos estresses genotóxico e oxidativo.....	35
4.4. NR não ativa genes mitocondriais protetivos e principais vias metabólicas nem melhora a saúde geral de <i>C. elegans</i>.....	38
4.5. Linhagem carregando mutação em <i>parp-1(ok988)</i> deixa de viver mais após cruzamento para equalizar o background genético.....	43
5. CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	55
Anexo 1 — Declaração referente à Bioética e/ou à Biossegurança.....	55
Anexo 2 — Declaração referente a Direitos Autorais	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. Impacto social do envelhecimento

O mundo está envelhecendo rapidamente. Algo inédito na história, hoje a maior parte da população mundial consegue atingir os 60 anos de idade (WHO, 2016). Além disso, as pessoas com 65 anos ou mais, que em 2010 somavam 524 milhões, totalizarão 1,5 bilhão em 2050, correspondendo a 16% da população mundial e ultrapassando o número de crianças com menos de 5 anos (WHO, 2011). Essas profundas transformações demográficas são resultado do aumento na expectativa de vida — em grande parte devido à diminuição no número de mortes por doenças infecciosas e parasitárias — e da diminuição nas taxas de fertilidade ocorridos nas últimas décadas (WHO, 2011).

Uma vida mais longa acompanhada de boa saúde e manutenção da habilidade funcional pode trazer diversos benefícios individuais e coletivos. As pessoas mais velhas podem se dedicar a uma nova carreira, estudar mais, praticar atividades de lazer, abrir o próprio negócio, gastar com produtos e serviços etc. No entanto, muitas vezes esses anos adicionais são permeados por declínio na habilidade funcional física e mental, fazendo com que os benefícios deem lugar a um impacto negativo para o indivíduo e para a sociedade (WHO, 2016).

O envelhecimento é um processo que ocorre em consequência do acúmulo de diversas alterações deletérias nas células e tecidos (Harman, 2003), prejudicando suas funções fisiológicas e aumentando o risco de doenças como câncer, doença de Alzheimer e doenças cardiovasculares. Essas enfermidades crônicas têm um custo de tratamento bastante elevado para os governos, o que os tem preocupado (WHO, 2011). Isto posto, é imprescindível a busca por intervenções que não apenas prolonguem a expectativa e o tempo de vida mas também diminuam os prejuízos à saúde decorrentes do envelhecimento. Uma intervenção extensivamente estudada que tem sido mostrada capaz de promover esses efeitos é a restrição calórica.

1.2. Restrição calórica, envelhecimento, NAD⁺ e sirtuínas

A restrição calórica (RC), definida como a diminuição de 20-40% no total de calorias ingeridas sem que haja desnutrição (Piper & Bartke, 2008), e algumas vezes acompanhada de suplementação vitamínica, é a intervenção não-farmacológica e não-genética mais consistente em aumentar a expectativa de vida média e máxima ao longo dos filos, de leveduras a mamíferos (Testa, Biasi, Poli, & Chiarpotto, 2014). A RC é capaz de reduzir, inclusive em humanos, a incidência de doenças metabólicas e associadas ao envelhecimento, como doenças cardiovasculares e câncer (Fontana & Partridge, 2015; Fontana, Partridge, & Longo, 2010). No entanto, devido aos possíveis efeitos colaterais da RC, como osteoporose e depressão (Dirks & Leeuwenburgh, 2006), e à dificuldade de adesão a uma dieta tão rígida, pesquisas têm buscado desenvolver e entender como agem miméticos farmacológicos ou fisiológicos dessa intervenção capazes de promover seus efeitos benéficos sem que haja a necessidade de reduzir tão bruscamente o consumo de alimentos.

Possíveis candidatos a miméticos de RC devem agir em sensores de nutrientes ou efetores moleculares que desempenham papel crucial na regulação do envelhecimento, do metabolismo e da resposta ao estresse, vias pelas quais essa intervenção exerce seus efeitos benéficos. Por exemplo, sinais metabólicos como diminuição nos níveis de insulina, ATP ou aminoácidos, bem como aumento intracelular dos níveis de NAD⁺ (Moroz et al., 2014), são percebidos por sensores como o receptor de insulina/igf-like (C. Kenyon, Jean, Grench, Adam, & Ramon, 1993; Panowski & Dillin, 2009), TOR (*target of rapamycin*) (Zoncu, Efeyan, & Sabatini, 2011), AMPK (Burkewitz, Zhang, & Mair, 2014) e as sirtuínas (Moroz et al., 2014). Esses sensores atuam de maneira sinérgica e formam uma complexa rede de regulação gênica que por fim culmina na ativação de fatores de transcrição e efetores moleculares como FOXO/DAF-16, mtHSP70/HSP-6 e SOD-2/SOD-3, promovendo uma modulação metabólica adequada frente às variações na disponibilidade de nutrientes (Fontana & Partridge, 2015).

NAD⁺, nicotinamida adenina dinucleotídeo, é um metabólito celular composto de uma molécula de nicotinamida e uma molécula de monofosfato de adenosina ligadas por seus grupos fosfato. NAD⁺ pode agir tanto como coenzima, recebendo equivalentes de hidrogênio do Ciclo de Krebs e sendo reduzido a NADH

para alimentar a cadeia transportadora de elétrons, quanto como substrato para certas enzimas, como as PARPs [Poli(ADP-ribose) polimerase] e as sirtuínas (Cantó, Menzies, & Auwerx, 2015). Sirtuínas, por sua vez, compreendem uma família de deacetilases dependentes de NAD^+ conservadas evolutivamente de bactérias a humanos. Essas proteínas podem funcionar como sensores dos níveis intracelulares de NAD^+ e, em resposta ao seu aumento, deacetilar histonas e fatores de transcrição, assim dirigindo modificações epigenéticas e/ou alterações diretas na expressão gênica (Verdin, 2015). SIRT1, uma das sete sirtuínas existentes em mamíferos — bem como seus ortólogos Sir2, em leveduras e moscas, e SIR-2.1, em *C. elegans* —, medeiam parte dos efeitos da restrição calórica sobre o envelhecimento e o metabolismo (Moroz et al., 2014; Verdin, 2015), o que é consistente com o aumento de NAD^+ intracelular observado em resposta a essa intervenção (Cantó et al., 2009, 2015; Moroz et al., 2014; Verdin, 2015). A importância de NAD^+ é fortalecida pelo fato de seus níveis intracelulares também aumentarem sob outras condições que estendem a saúde e o tempo de vida, ao passo que diminuem no envelhecimento ou sob condições que diminuem a saúde, como, por exemplo, uma dieta abundante em gorduras (Verdin, 2015). Esses fatos suportam um modelo de trabalho que coloca a diminuição dos níveis de NAD^+ como contribuinte para o processo de envelhecimento e a restauração dos seus níveis como uma interferência que confere proteção aos prejuízos decorrentes desse processo (Verdin, 2015). De fato, intervenções visando a diretamente aumentar as concentrações de NAD^+ , como suplementação com precursores desse metabólito ou inibição de enzimas que o consomem (como PARP-1 ou CD38), mostraram-se capazes de aumentar o tempo de vida de leveduras, nematoides e camundongos (Bai et al., 2011; Mouchiroud et al., 2013; Verdin, 2015; Zhang et al., 2016).

1.3. NR (Ribosídeo de Nicotinamida) como mimético de restrição calórica

Dentre os precursores de NAD^+ , um deles, o NR, do inglês *Nicotinamide Riboside*, ou ribosídeo de nicotinamida, tem sido extensivamente estudado e considerado um bom candidato a mimético de restrição calórica devido a seus efeitos promissores no envelhecimento e metabolismo. NR é um nucleosídeo da família da Vitamina B3 (Niacina) que pode ser encontrado em pequenas quantidades no leite ou em alimentos contendo levedura e cuja metabolização leva ao aumento de NAD^+ por

meio da “Via de Salvamento” (Chi & Sauve, 2013), uma das três vias de síntese endógena de NAD⁺. Essa molécula, após entrar na célula, é convertida a NMN (*Nicotinamide Mononucleotide*), por enzimas NRKs (*Nicotinamide Riboside Kinases*), e então a NAD⁺, pela NMNAT (*NMN Adenylyl Transferase*) (Bieganowski & Brenner, 2004). Nos EUA, NR está desde 2013 disponível ao público como suplemento alimentar sob o nome comercial NIAGEN® (Chromadex Incorporated, Irvine, California, USA).

Em mamíferos, a disfunção mitocondrial, situação em que há diminuição do metabolismo oxidativo e da biogênese mitocondrial, é uma característica inerente ao envelhecimento (Payne & Chinnery, 2015). Tratamento com NR ou mutação/inibição de PARP-1, em camundongos, aumentam o metabolismo oxidativo e previnem a obesidade causada por dieta com altos níveis de gordura (Bai et al., 2011; Cantó et al., 2012), além de melhorarem defeitos na cadeia respiratória em um modelo de doença mitocondrial (Cerutti et al., 2014). Em *C. elegans*, a elevação dos níveis de NAD⁺ tanto por inibição/mutação de PARP-1 quanto por tratamento com NR desde a fase embrionária também é capaz de estender o tempo de vida, melhorar a função mitocondrial e a vitalidade e promover a ativação das principais vias metabólicas, impedindo o declínio metabólico que os vermes sofrem durante o envelhecimento. Esses efeitos requerem a atividade de SIR2.1 e ativação da *Mitochondrial Unfolded Protein Response* (UPR^{mt}, determinada pela ativação do gene *hsp-6*), além de aumento moderado nos níveis de espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species* ou ROS) seguido de translocação para o núcleo do fator de transcrição FOXO/DAF-16, necessário para o aumento da transcrição de *sod-3* — um gene que codifica para a isoforma mitocondrial da enzima antioxidante superóxido dismutase (Mouchiroud et al., 2013). Entretanto, a ação biológica plena do aumento de NAD⁺ por suplementação com NR ou por inibição de PARP-1 ainda é pouco conhecida (Cantó & Auwerx, 2012; Verdin, 2015). Assim, é importante, dado seu grande potencial terapêutico, verificar a interação de NAD⁺ com outras vias, principalmente aquelas também relacionadas com os efeitos da restrição calórica.

Uma vez que muitos dos mecanismos gênicos/moleculares que medeiam os efeitos da restrição calórica sobre a longevidade de mamíferos são conservados evolutivamente e igualmente importantes no controle do tempo de vida e da resposta à RC também em *C. elegans* (Cypser, Kitzenberg, & Park, 2013; Greer & Brunet, 2009;

C. J. Kenyon, 2010), o uso desse nematoide de vida livre como modelo para o estudo dos mecanismos moleculares associados ao envelhecimento é bastante adequado. Além disso, algumas características do nematoide contribuem para sua popularização em pesquisas sobre envelhecimento, como, por exemplo, seu reduzido tamanho (o adulto atinge 1 mm), que simplifica a manutenção, sua transparência, seu pequeno tempo de vida (aproximadamente três semanas no verme selvagem), a vastidão de mutantes disponíveis e a facilidade de utilizar RNAi para diminuir a expressão de genes específicos. O corpo de conhecimento relacionado às vias que determinam a longevidade em *C. elegans* é bastante amplo e muitas hipóteses acerca de mecanismos moleculares do envelhecimento são colocadas à prova usando esse nematoide.

1.4. Dicer (DCR-1) é crucial para RC e para algumas das suas intervenções miméticas

Dicer é uma endoribonuclease que exerce papel fundamental e passo limitante na via de processamento de microRNAs — moléculas que compreendem um grupo diverso de RNAs pequenos não-codificantes que contém em média 22 nucleotídeos quando maduros e funcionam como reguladores pós-transcricionais (Bartel, 2018). miRNAs maduros formam complexos com outras proteínas, por exemplo as Argonautas, e reconhecem sequências complementares principalmente na região 3'-não traduzida de RNAs mensageiros alvo, inibindo, assim, sua tradução (Bartel, 2018; Jinek & Doudna, 2009). Mais de 1000 miRNAs foram descritos em humanos, grande parte deles sendo conservada evolutivamente em invertebrados como *C. elegans* e *D. melanogaster*. Acredita-se que mais da metade dos genes codificadores de proteínas em humano sofra regulação por miRNAs, evidenciando sua importância na regulação da expressão gênica dos organismos (Bartel, 2018).

Em *C. elegans*, a demonstração de que a perda do processamento contínuo de miRNAs diminui o tempo de vida (Lehrbach et al., 2012) e de que microRNAs, como, por exemplo, *lin-4*, igualmente a regulam (Boehm & Slack, 2005), evidenciam a implicação da via de processamento de miRNAs no envelhecimento. Anteriormente, nosso grupo descobriu que os níveis de Dicer/DCR-1 e o processamento de miRNAs diminuem com o envelhecimento no tecido adiposo de

camundongos e em *C. elegans*, sendo a restrição calórica capaz de reverter essa diminuição (Mori et al., 2012). Além disso, dados também do nosso grupo mostram que restrição de metionina (MR), uma intervenção que sabidamente prolonga a vida e aumentar resistência ao estresse em roedores (Orentreich, Matias, DeFelice, & Zimmerman, 1993), aumenta a expressão de componentes da via de processamento de miRNAs, principalmente Dicer, no tecido adiposo de camundongos e ratos (Guerra et al., 2019), um evento relacionado à robustez metabólica e resistência ao estresse (Mori et al., 2012, 2014). Também, tanto a MR (Guerra et al., 2019) quanto a restrição calórica (Reis et al., 2016) dependem de DCR-1/Dicer para aumentar a longevidade de *C. elegans* e melhorar a eficiência metabólica em camundongos, respectivamente. Considerando esses dados, Dicer/DCR-1 parece estar implicada fortemente na manutenção da função mitocondrial normal e na permissividade dos efeitos benéficos de intervenções que agem via mitocôndria, como a restrição calórica. Dado que intervenções objetivando elevar os níveis de NAD⁺, como tratamento com NR ou inibição/mutação em *parp-1*, também apresentam ação mitocondrial e, principalmente, agem em genes que medeiam os efeitos da RC, nós havíamos hipotetizado em um projeto anterior que a extensão do tempo de vida promovido por aumento dos níveis de NAD⁺ era ao menos parcialmente dependente de *dcr-1*. Usando vermes longevos mutantes para *parp-1*, nós verificamos que de fato há bloqueio da extensão no tempo de vida quando *dcr-1* é silenciada por RNAi (Figura 1), colocando *dcr-1* e NAD⁺ em um mesmo contexto biológico.

Considerando, então, a importância dos níveis de NAD⁺ na regulação do processo de envelhecimento e sua possível relação epistática com *dcr-1*, este estudo inicialmente pretendia investigar de modo mais aprofundado a interação de *dcr-1* com os genes e/ou moléculas que haviam sido mostrados mediar o aumento da longevidade e melhora metabólica elicitadas por intervenções que aumentam NAD⁺. Em suma, ao final do projeto nós esperávamos conseguir determinar em que grau e em quais pontos da via de NAD⁺/SIR2.1/UPR^{mt}/SOD-3 haveria requerimento de *dcr-1* para permitir os efeitos benéficos promovidos por intervenções que aumentam os níveis de NAD⁺, mais especificamente a suplementação com NR. Porém, durante o estudo, nós nem ao menos pudemos verificar se a ausência de *dcr-1* era capaz de bloquear a extensão no tempo de vida de vermes tratados com NR, uma vez que não conseguimos reproduzir esse suposto aumento de longevidade promovido por NR —

anteriormente descrito na literatura e no qual nosso projeto amplamente se baseava. Consequentemente, fomos impelidos a alterar drasticamente os objetivos deste estudo, e sua proposta passou a ser a de buscar entender a razão pela qual NR não aumentava o tempo de vida de nematoides em nossas condições experimentais. Para isso, buscamos repetir grande parte dos experimentos dos artigos em que nos baseamos, alterando múltiplas variáveis experimentais, não testadas nesses artigos, na tentativa de entender quais os fatores que poderiam estar impedindo o aumento de longevidade promovido por NR em nossas condições.

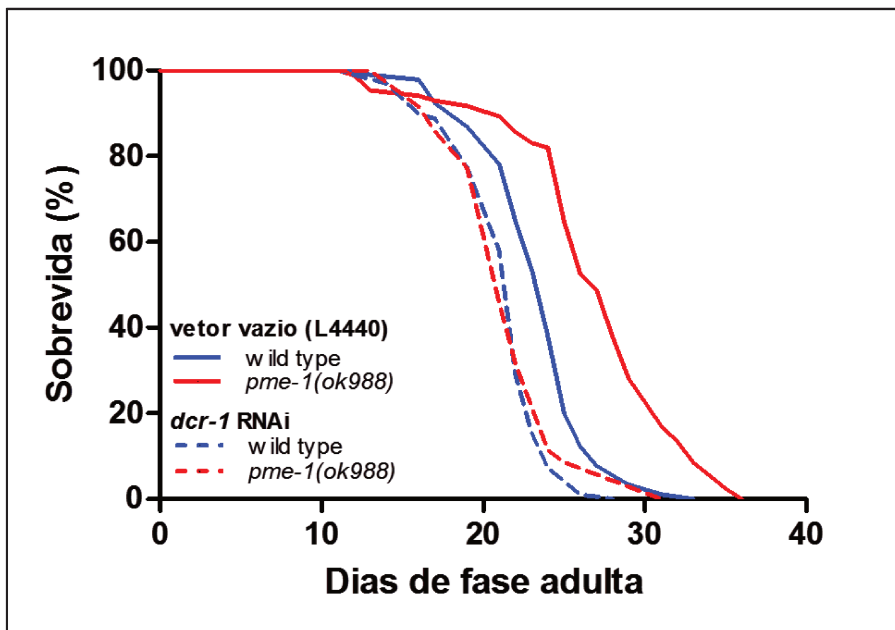


Figura 1. Ausência de *dcr-1* bloqueia a extensão do tempo de vida promovida por mutação em *pme-1* (*parp-1*) (dados não publicados do nosso grupo).

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo geral*

O objetivo inicial do projeto era investigar o papel de *dcr-1* na modulação da longevidade e do metabolismo promovida por intervenções que aumentam NAD⁺ em *C. elegans*. Porém, visto que nas nossas condições experimentais não foi possível verificar aumento do tempo de vida em indivíduos tratados com NR — premissa-chave de toda estrutura do projeto —, outros objetivos foram incluídos, bem como alguns do projeto inicial retirados, com o intuito de decifrar a razão de não termos conseguido reproduzir os dados da literatura.

2.2. *Objetivos específicos*

- 2.2.1. Avaliar o tempo de vida em vermes tratados com NR sob diferentes condições experimentais
- 2.2.2. Determinar se o tempo de início de tratamento (fase larval, adulto ou vida toda) com NR é determinante na extensão do tempo de vida;
- 2.2.3. Avaliar o tempo de vida em vermes tratados com outros doadores de NAD⁺;
- 2.2.4. Testar se NR ativa os *repórteres* transcricionais (GFP) para *sod-3* e *hsp-6*;
- 2.2.5. Monitorar os níveis de *dcr-1* em vermes tratados com NR;
- 2.2.6. Avaliar se tratamento com NR induz genes das principais vias metabólicas (*cts-1* (ciclo de Krebs), *hxx-1* (glicólise) e *pyc-1* (gliconeogênese)) e se RNAi contra *dcr-1* é capaz de bloquear esse aumento;
- 2.2.7. Avaliar se há aumento de vitalidade (medido pela mobilidade física ao longo do tempo) em vermes tratados com NR e se tal aumento é bloqueado com RNAi contra *dcr-1*;
- 2.2.8. Determinar os níveis de NAD⁺ em vermes tratados com NR;
- 2.2.9. Verificar se NR aumenta os níveis de ROS mitocondrial;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Condições de cultura e linhagens de *C. elegans*

As linhagens de *C. elegans* foram mantidas a 20 °C (estufa BOD modelo EL101/1, Eletrolab, Brasil) em placas de Petri de 60x10 mm contendo *Nematode Growth Media* (NGM) semissólido [1,7% Ágar (*BD Biosciences*, EUA), 1 mM CaCl₂ (*Merck*, EUA), 5 µg/ml colesterol (*Merck*, EUA), 25 mM Tampão Fosfato (pH 6.0; preparado com KH₂PO₄ e K₂HPO₄ (*Merck*, EUA)) 1 mM MgSO₄ (*Merck*, EUA), 0,3% NaCl (*Merck*, EUA), 0,25% peptona bacteriológica (*BD Biosciences*, EUA)] (para placas de experimentação, o ágar foi usado na concentração de 2,5%) suplementado com 100 µg/ml de estreptomicina (*Merck*, EUA), sobre o qual foi adicionado uma camada de 500 µL de *Escherischia coli* da linhagem OP50-1 em OD₆₀₀=10 concentração, na concentração aproximada de de 5 x 10¹¹ bactérias/mL, crescidas *overnight* em meio *Luria Bertani* (LB) [0,5% extrato de levedura (*BD Biosciences*, EUA), 1% NaCl (*Merck*, EUA), 1% triptona (*BD Biosciences*, EUA)], servindo de fonte nutricional para os vermes, conforme protocolo em Wormbook (Stiernagle, 2006). As linhagens utilizadas, e seus respectivos genótipos, foram: **N2 Bristol** (selvagem), **RB1042** *parp-1(ok988)* I, **RB864** *xpa-1(ok698)* I, **CF1553** (*mul84[sod-3p::GFP + rol-6(su1006)]*), **SJ4005** (*zcls4[hsp-4::GFP]*) and **SJ4100** (*zcls13[hsp-6::GFP]*). As linhagens foram obtidas do *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), da *University of Minnesota*, USA.

Para os experimentos com NR (*Fornecedor X* e *Elysium*, EUA), NAM (*Merck*, EUA) e Olaparib (*Selleckchem*, EUA), os compostos ou veículo foram adicionados ao NGM derretido imediatamente antes de vertê-lo sobre as placas. NR foi dissolvido como uma solução-estoque aquosa a 500 mM e NAM, 200 mM. Para solução-estoque de Olaparib o composto foi dissolvido a 100 µM em DMSO (*Merck*, EUA).

3.2. Sincronia de Vermes

O protocolo de sincronização de ovos por hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio foi realizado conforme descrito no *Wormbook* (Stiernagle, 2006), com ligeiras modificações. Brevemente, uma placa contendo diversos hermafroditas gravídicos foi

lavada com água estéril e o líquido foi coletado em um tubo para centrifuga cônico de 5 mL com tampa, adicionando-se mais água para um volume final de 3,5 mL. Foram adicionados ao tubo 0,5 mL de NaOH 5 N (*Merck*, EUA) e 1 ml de solução de NaClO a 5% (*Cromoline*, Brasil). O tubo foi, então, a cada 2 minutos agitado durante alguns segundos, manualmente ou usando-se um agitador de tubos (modelo AP56, *Phoenix Luferco*, Brasil), para um tempo máximo de 10 minutos, checando-se periodicamente até que o rompimento dos hermafroditas adultos fosse verificado. O tubo foi centrifugado (centrifuga modelo 5810R, *Eppendorf AG*, Alemanha) por 1 minuto a 340 x g para sedimentar os ovos e em seguida o sobrenadante foi aspirado até 0,1 mL. Então, os ovos foram lavados com 15 mL de água estéril, centrifugados novamente e o sobrenadante foi aspirado até 0,1 mL. Usando-se uma micropipeta, os ovos restantes foram transferidos para uma placa de NGM contendo uma camada de *E. coli* OP50-1 ou HT115(DE3) (para os experimentos com RNAi). Para alguns experimentos a sincronização foi realizada por *egg laying*, permitindo-se que 20-40 hermafroditas grávidas depositassem ovos em placas de NGM durante 1-2 h, tempo após o qual elas foram retiradas das placas.

3.3. Experimentos com RNAi

A técnica de RNAi por ingestão foi realizada como descrito por Kamath *et al.* (2001) e o clone utilizado para silenciamento de *dcr-1* foi desenvolvido por Volovik *et al.* (2012), gentilmente cedido pela Profa. Dra. Katlin Massirer (CBMEG, UNICAMP). Uma única colônia de bactéria *E. coli* HT115(DE3) transformada com vetor L4440 vazio ou contendo dsRNA correspondente ao gene *dcr-1* foi inoculada em meio *Luria Bertani* (LB) adicionado de 100µg/mL de ampicilina (*Merck*, EUA) e 12,5µg/mL de tetraciclina (*Merck*, EUA), deixada crescer *overnight* e então concentrada 10x após medição da OD_{600nm} (do inglês *optical density*) inicial, usado no cálculo do fator de diluição para uma OD final de 10 (UA). Em seguida, IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) (*Merck*, EUA), molécula usada para induzir a expressão do vetor, foi adicionado, para uma concentração final de 1 mM, à bactéria concentrada, tendo sido esta plaqueada sobre o NGM e deixada secar antes da placa ser utilizada.

3.4. Tempo de vida

Os experimentos de tempo de vida foram realizados conforme descrito por Mouchiroud *et al.* (2013), com pequenas modificações. Sucintamente, aproximadamente 120 vermes sincronizados por *egg laying* foram transferidos no dia 0 de vida adulta para placas com NGM suplementado com 100 µg/mL de estreptomicina, 0,25µg/mL de fungizona (*Thermo Fisher Scientific*, USA) e 50 µg/mL de FUdR (5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-fosfato) (*Thermo Fisher Scientific*, USA), salvo indicação em contrário, e sobre o qual foi adicionada uma camada de 500 µL de *E. coli* OP50-1 a OD_{600nm}=10. Para os experimentos com RNAi, o NGM foi suplementado com 100µg/mL de ampicilina, 12,5µg/mL de tetraciclina, 0,25µg/mL de fungizona, 1mM de IPTG e 50 µg/mL de FUdR, e sobre o qual foi adicionada uma camada de 500 µL de *E. coli* HT115(DE3) expressando dsRNA contra *dcr-1* ou controle (L4440). Para os experimentos com OP50-1 morta, o NGM foi suplementado com 100µg/mL de ampicilina e a bactéria foi aquecida a 70 °C por 1 hora em *Thermo-Shaker* (*WR Research*, Brasil) e deixada esfriar totalmente antes de ser plaqueada sobre o NGM. Para a análise de sobrevivência, foram considerados mortos os vermes que não apresentaram resposta motora a estímulo mecânico com fio de platina (PT-9010, 0.010 polegada em diâmetro, *Tritech Research*, EUA). Vermes que rastejaram para fora da superfície do ágar, apresentaram rompimento de vulva ou eclosão interna dos ovos (“*bag-of-worms*”) durante a fase reprodutiva foram censurados. As placas foram monitoradas (estereomicroscópio modelos SMZ745 e/ou SMZ800, *Nikon*, Japão) a cada dois ou três dias, até a morte do último verme. Os vermes foram expostos a NR, NAM e Olaparib durante toda a vida, dos ovos até a morte, salvo indicação em contrário. Nos experimentos com NR os vermes foram transferidos para placas frescas duas vezes por semana, até aproximadamente o dia 18, para garantir exposição perene à droga. Nos outros experimentos, os vermes foram transferidos para placas frescas 1-3 vezes no total. Todos os experimentos foram realizados a 20 °C (estufa BOD modelo EL101/1, *Eletrolab*, Brasil), salvo indicação em contrário.

3.5. Resistência a estresse térmico e estresse oxidativo com Paraquat

O ensaio de estresse oxidativo em Paraquat foi realizado conforme descrito por Mouchiroud *et al.* (2011). Resumidamente, vermes tratados desde o ovo com veículo ou drogas de interesse foram transferidos nos dias 0, 3 ou 7 de adulto para

placas de NGM (adicionadas de FUDR) suplementadas com 4mM (ou 5 mM, quando declarado) de Paraquat (*Merck*, EUA) e contendo os respectivos tratamentos. A sobrevivência foi monitorada diariamente ou a cada dois dias, exatamente como descrito em (3.4). Após a transferência ao Paraquat no dia 0, os vermes restantes foram transferidos para placas com FUDR adicionadas dos respectivos tratamentos, para garantir exposição a comida e droga frescas, até a passagem nos dias 3 e 7.

Para o ensaio de *heat stress*, vermes tratados com NR desde o ovo foram transferidos para placas com FUDR no dia 0 de adulto e imediatamente movidos para incubadora a 28 °C (*Shel Lab* modelo L15, *Sheldon Manufacturing*, EUA), onde foram mantidos até o fim da vida. A sobrevivência foi monitorada diariamente, como descrito em (3.4).

3.6. Extração de DNA e PCR Convencional

Para extração do DNA, foi usado o método de lise/extração com Proteinase K. Basicamente, aproximadamente 100 vermes adultos foram coletados, lavados 2-3x com M9 para remoção da bactéria e de impurezas e incubados overnight a 55 °C sob agitação na presença de 100 µL de tampão de lise [100 mM de Tris (*Merck*, EUA), 5 mM de EDTA (*Merck*, EUA), 200mM de NaCl (*Merck*, EUA), 0,2% de SDS (*Merck*, EUA), 1 mg/mL de Proteinase K (*New England BioLabs*, EUA); pH_{final} = 8,5]. O extrato foi então aquecido a 95 °C por 10 minutos em *Thermo-Shaker* para inativação da Proteinase K, levado à temperatura ambiente e adicionado de 750 µL de tampão TE/RNase [10 mM de Tris; 1 mM de EDTA; 20 mg/mL de RNase A (*Merck*, EUA); pH_{final} = 8,0]. Em seguida, 300 µL de solução saturada de NaCl a 6M foram adicionados, então a mistura foi centrifugada por 20 minutos a 12000 x g a fim de se precipitar a parte proteica. O sobrenadante foi coletado e a ele foi adicionado 1 mL de isopropanol (*Merck*, EUA) para precipitação do DNA genômico. A amostra foi então centrifugada (centrífuga modelo 5417R, *Eppendorf AG*, Alemanha) por 30 minutos a 12000 x g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% (*Merck*, EUA). Após mais uma etapa de centrifugação por 5 minutos sob a mesma rotação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi deixado à temperatura ambiente até que estivesse seco. Em seguida, o precipitado foi diluído em 200 µL de tampão TE [10 mM de Tris em pH 7,4; 1mM de EDTA 1 em pH 8,0]. Quando não foi processado logo em seguida, o DNA diluído em tampão TE foi

armazenado a -20 °C até o momento da utilização. A reação de PCR foi realizada adicionando-se 2 µL de DNA, 12 µL de *Master Mix 2x* (*Promega*, EUA), 10 µL de água *nuclease free* (*Promega*, EUA) e 0,25 µL de cada primer (*Exxtend*, Brasil), para um volume final de reação de 25 µL. Para detecção da mutação em *parp-1(ok988)*, que compreende uma deleção de 1007 pares de base, utilizamos uma estratégia com 3 primers, em que o primer *reverse* flanqueia um lado da região da deleção e há mais 2 primers *forward*, um flanqueando o outro lado da região da mutação (e que apenas gera um *amplicon* no alelo mutante para *parp-1*, uma vez que no alelo selvagem o produto de reação é grande demais para ser amplificado pela DNA Polimerase utilizada) e o outro que se anela internamente à mutação (e que apenas gera um *amplicon* no alelo selvagem, pelo fato de no alelo mutante este primer não ter onde se anelar). Com essa configuração, os *amplicons* produzidos são de diferentes tamanhos, a depender se o alelo é selvagem ou mutado, possibilitando a diferenciação entre vermes mutantes, selvagens e hermafroditas (nesse contexto, ambos os produtos de reação são formados). A reação de PCR foi realizada em termociclador (*C1000 Thermal Cycler*, *Bio-Rad*, EUA) e o produto da reação foi adicionado de *loading dye* (*DNA Gel Loading Dye (6X)*, *Thermo Fisher Scientific*, EUA) e resolvido em gel de agarose (*Agarose LE, Molecular Biology Grade, Ultrapure*, *Thermo Fisher Scientific*, EUA) a 2% (em TAE), usando-se a o corante *SYBR Safe* (*SYBR™ Safe DNA Gel Stain*, *Thermo Fisher Scientific*, EUA) como intercalante de DNA. As imagens da marcação do DNA no gel de agarose foram obtidas usando-se o *software Image Lab* no leitor *Gel Doc* (*Gel Doc™ EZ System*, *Bio-Rad*, EUA).

3.7. Ensaio de mobilidade

Nos dias 1, 3 e 10 de fase adulta, 15 vermes sincronizados de cada condição foram transferidos para poços individuais de uma placa de 96 poços contendo 100 µL de meio M9 [22 mM Na₂HPO₄ (*Merck*, EUA), 22m MKH₂PO₄ (*Merck*, EUA), 85 mM NaCl (*Merck*, EUA), 1 mM MgSO₄ (*Merck*, EUA)], permitidos ambientar por 7,5 minutos a aproximadamente 20 °C e, então, o número de *bends* de cada verme foi quantificado por 30 segundos usando-se o estereoscópio. Os valores foram multiplicados por 2 para se obter a quantidade de *bends* por minuto. Foram realizados três experimentos independentes.

3.8. RT-qPCR

Para cada condição, aproximadamente 80 vermes no dia 1 de fase adulta foram coletados, lavados 5x com meio M9 para remoção de bactéria residual e tiveram o RNA total extraído com o uso do reagente TRIzol (*Thermo Fisher Scientific*, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 700 ng de RNA total usando-se o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (*Thermo Fisher Scientific*, EUA), contendo a enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (*Thermo Fisher Scientific*, EUA), e primers randômicos (*Random Primers*) (inclusos no *kit* supracitado), de acordo com as instruções do fabricante. A qPCR foi realizada usando-se o cDNA, *2X SYBR® Green PCR Master Mix* (*Thermo Fisher Scientific*, EUA) e pares de primers (*Exxtend*, Brasil) para os genes de interesse na concentração final de 500 nM. A fluorescência foi quantificada pelo *CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (*Bio-Rad*, EUA), seguindo o protocolo de amplificação: 50 °C por 2 min; 95 °C por 10 min; e 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 20 s e 72 °C por 30 s. A expressão relativa dos RNAs mensageiros foi determinada pelo cálculo do $2^{-\Delta\Delta C_t}$, com as expressões dos genes de interesse sendo normalizadas pela expressão do gene endógeno Y45F10D.4.

Os seguintes primers foram utilizados:

<i>cts-1 forward</i> 5'-CTCGACAACCTCCAGATAACC-3',	<i>cts-1 reverse</i> 5'-GGTACAGGTTGCGATAGATGATAGC-3';
<i>cox-4 forward</i> 5'-GCCGACTGGAAGAACTTGTC-3',	<i>cox-4 reverse</i> 5'-CCTGAGCCTCCTTGTACTCG-3';
<i>hvk-3 forward</i> 5'-GTGCGACGAGTACTTTCTCAACTG-3',	<i>hvk-3 reverse</i> 5'-CTAGAGATGACGTCACACACTTCTC-3';
<i>pyc-1 forward</i> 5'-TCCAATACTCCTCTTGCTACTGAC-3',	<i>pyc-1 reverse</i> 5'-GTGATCATACATCCTGGTCTACTGC-3';
<i>Y45F10D.4 forward</i> 5'-GTCGCTTCAAATCAGTTCAGC-3',	<i>Y45F10D.4 reverse</i> 5'-GTTCTTGTCAAGTGATCCGACA-3'.

3.9. Aquisição de imagens GFP

Os experimentos foram realizados de modo análogo ao descrito em Pinto *et al.* (2018), com algumas modificações. Brevemente, foi utilizada uma placa de 96 poços de borda preta e fundo transparente (*Greiner Bio-One*, Áustria) (ideal para aquisição de imagens de fluorescência), na qual 15-20 vermes (linhagens

transgênicas com GFP como gene repórter para os genes de interesse) nos dias 1 e 3 de vida adulta foram transferidos para cada poço contendo 100 μ L de solução de azida sódica (*Merck*, EUA) a 0,1% dissolvida em meio M9, para imobilização. As imagens foram obtidas no equipamento *Cytation™ 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader* (*BioTek*, EUA) e analisadas apenas qualitativamente. Posteriormente, será feita análise quantitativa usando-se o programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>), calculando-se a densidade integrada da fluorescência de cada verme. Imagens representativas estão apresentadas nas figuras.

3.10. Quantificação de NAD⁺/NADH

A quantificação de NAD⁺ foi realizada usando-se o *NAD⁺/NADH Quantitation kit* (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/mak037>) (*Merck*, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante. Brevemente, para cada condição, aproximadamente 1000 vermes foram coletados em microtubos poliméricos, lavados 5x com meio M9 para remoção de bactéria residual e instantaneamente congelados em nitrogênio líquido. Mais tarde, foram adicionados aos tubos 400 μ L de tampão de extração de NAD⁺/NADH (fornecido pelo kit) e *beads* de óxido de zircônio (*1.0 mm Zirconium Oxide beads, Next Advance*, EUA), e os vermes foram rompidos com 2 ciclos de 4 minutos no equipamento *Bullet Blender®* (*BBY24M Bead-Based Homogenizer Bullet Blender, Next Advance*, EUA). Após retirada de pequena alíquota (10 μ L) para dosagem de proteína (para normalização), as amostras foram centrifugadas (centrífuga modelo 5417R, *Eppendorf AG*, Alemanha) a 14.000 x *g* por 5 minutos a 4°C para remoção de material insolúvel e o sobrenadante foi filtrado em filtro de 10KDa *Amicon™ Ultra-0.5 Centrifugal Filter Units NMWL 10,000* (*Merck*, EUA) para desproteinização, seguindo as orientações do fabricante. Cada amostra foi dividida em duas, para quantificação de NADH somente e NAD total (NAD⁺ e NADH) e a reação cíclica e desenvolvimento da reação colorimétrica foram realizadas seguindo exatamente as orientações do protocolo do fabricante. As amostras foram lidas a 450 nm na função de espectrofotômetro de leitor de microplaca multimodal (*Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader, BioTek*, EUA). A partir dos valores de absorbância (*y*) e das diferentes quantidades de NADH da curva padrão (*x*), foi construído um gráfico de dispersão XY e a equação da reta foi utilizada para determinar a quantidade de NADH e NAD total (NAD⁺ e NADH) das amostras,

sendo o primeiro subtraído do segundo para o cálculo da quantidade de NAD⁺ (oxidado). As quantidades obtidas foram normalizadas pelos valores de proteína total (em ng/mL) para se obter a concentração de NAD em *ng/mg de proteína*. O experimento foi realizado com três replicatas biológicas (*pools* de 1000 vermes) e 2 replicatas técnicas para cada condição.

3.11. Forma de análise dos resultados

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média, exceto nos experimentos de sobrevivência. Os testes estatísticos foram realizados no *software Graph Pad Prism 5*. A comparação da sobrevida entre os grupos nos ensaios de tempo de vida foi feita aplicando-se o teste Log-Rank (Mantel Cox) usando-se o mesmo software. Para análise de mobilidade e de expressão gênica (qPCR), em que há duas variáveis independentes (RNAi e tratamento com NR), aplicamos *Two-Way ANOVA*, seguido de Bonferroni como pós-teste. O nível de significância (α) foi fixado em 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Suplementação com NR não aumenta o tempo de vida nem a resistência aos estresses térmico e oxidativo

Logo no início da execução do projeto, o primeiro lote de NR que utilizamos havia sido cedido por um colaborador nosso; porém, como não conseguimos junto ao fornecedor (daqui em diante referido como *Fornecedor X*) a ampliação do *MTA* (*Material Transfer Agreement*) para que este também incluísse nosso laboratório, não temos permissão para apresentar os dados obtidos usando-se essa amostra de NR. Assim, os primeiros dois conjuntos de dados apresentados nesta seção não terão suas respectivas figuras mostradas nesta dissertação; além disso, serão chamados de “Conjunto 1” e “Conjunto 2”, respectivamente. Isso de nenhum modo compromete a robustez dos resultados, visto que a maior parte dos experimentos foram repetidos usando-se um lote de NR adquirido de outro fornecedor — que será referido como “NR (elysium)” —, como será mostrado mais adiante.

Inicialmente, buscamos avaliar se o aumento no tempo de vida promovido por tratamento com NR também seria bloqueado por silenciamento de *dcr-1*, assim como ocorreu com o verme longevo carregando mutação em *parp-1(ok988)* (Figura 1; Introdução). Diferentemente do esperado (Mouchiroud et al., 2013), vermes em RNAi controle (L4440) tratados desde o ovo (fase embrionária) com NR não viveram mais do que o grupo com veículo (Conjunto 1A; dados não mostrados), apresentando inclusive uma tendência a diminuição no tempo de vida — que em duas das quatro replicatas independentes foi estatisticamente significativa. Interessantemente, quando *dcr-1* foi silenciada, os grupo tratado com NR viveu ainda menos do que o grupo tratado com veículo (Conjunto 1A; 4 replicatas; dados não mostrados), um efeito que se assemelha ao observado anteriormente pelo nosso laboratório em vermes tratados com metformina (Guerra et al., 2019) e que sugere um efeito dual benéfico-tóxico de NR, em que o componente tóxico se acentua na ausência de *dcr-1*.

A linhagem de *E. coli* comumente utilizada em experimentos com RNAi é a HT115(DE3). Para descartar a possibilidade de que a bactéria estivesse de alguma forma bloqueando o efeito do NR em aumentar o tempo de vida em nossas condições — embora fosse algo pouco provável, visto que NR havia sido mostrado aumentar o

tempo de vida de nematoides também em HT115 (Mouchiroud et al., 2013) —, repetimos o experimento usando a linhagem bacteriana OP50-1 como fonte de alimento para os nematoides. Como não é possível usar a técnica de RNAi por ingestão nessa linhagem, tratamos vermes selvagens (linhagem N2) e vermes carregando mutação em *dcr-1(ok247)* com NR ou veículo. Novamente, diferentemente da literatura, tratamento com NR não aumentou o tempo de vida dos vermes selvagens (Conjunto 1B; 1 replicata; dados não mostrados). Em discordância com o que havíamos observado usando RNAi contra *dcr-1* no “Conjunto 1A”, não houve uma diminuição ainda maior do tempo de vida nos vermes mutantes para *dcr-1(ok247)* — sabidamente de vida curta — quando comparados ao veículo, apesar deste experimento ter sido realizado apenas uma vez. Possíveis explicações para essa divergência são (1) a bactéria utilizada — o agravamento no aparente componente tóxico do NR talvez ocorra apenas em HT115 —, (2) a diferença que pode existir entre os mecanismos de ação de RNAi e mutação para um mesmo gene — como já demonstrado na literatura para *nuo-6* e *isp-1* (Yang & Hekimi, 2010) —; e (3) o fato de o tempo de vida de vermes carregando mutação em *dcr-1(ok247)* já ser demasiadamente pequeno.

Em experimentos longos, como a *determinação do tempo de vida*, em que se usa nematoides adultos e os acompanha até o fim de suas vidas, é comum a utilização de um inibidor de mitose, FUdR, para impedir que a progênie dos adultos que estão sendo analisados se desenvolva também em indivíduos adultos, evitando assim que as gerações P0 e F1 sejam confundidas. Alternativamente, experimentos sem esse composto são realizados transferindo-se diariamente — durante o período reprodutivo, que termina aproximadamente no 6º dia da fase adulta — toda a população para placas novas, enquanto a progênie, formada por larvas que ainda não atingiram a fase adulta, é descartada. Uma de nossas hipóteses para a não reprodução dos dados da literatura era a de que FUdR estaria bloqueando o efeito, como publicado, do NR. Para testá-la, repetimos o experimento sem FUdR. Mesmo nessas condições, NR não foi capaz de aumentar o tempo de vida de vermes selvagens (Conjunto 1C; 1 replicata; dados não mostrados), demonstrando até mesmo, embora não estatisticamente significativa, uma tendência a diminuir o tempo de vida nesse grupo em comparação com o controle.

Populações de *C. elegans* mantidas em cultura por diversas gerações ocasionalmente ficam sem comida (Stiernagle, 2006) e podem eventualmente acumular alterações epigenéticas ou mutações, afetando fenótipos relacionados ao envelhecimento (Rechavi et al., 2014). Para eliminar essa variável, obtivemos de uma colega do laboratório uma nova população de vermes selvagens (N2 Bristol), que havia sido recém-descongelada do estoque armazenado em nitrogênio líquido. Novamente, tratamento com NR não aumentou o tempo de vida nas nossas condições (Conjunto 1D; 10 replicatas; dados não mostrados). Importante notar que esse experimento, com uma nova população de nematoides selvagens, foi repetido dez vezes, não produzindo diferença estatística em seis, diminuindo o tempo de vida em uma e aumentando ligeiramente o tempo de vida em 3 das replicatas, o que demonstra uma clara inconsistência no efeito do NR.

Embora improvável, dado que no artigo em que nós nos baseamos não há nenhuma indicação de que a bactéria usada estivesse morta (Mouchiroud et al., 2013), um fator que poderia estar impedindo o efeito do NR é a metabolização deste pela bactéria viva (Gazzaniga, Stebbins, Chang, McPeck, & Brenner, 2009). Quando testamos essa hipótese, vermes tratados com NR desde o ovo (Conjunto 1E; 1 replicata; dados não mostrados) ou somente a partir da fase adulta (Conjunto 1F; 2 replicatas; dados não mostrados) e alimentados a partir do dia 0 de fase adulta com bactéria morta por calor não viveram mais comparativamente ao controle. Ainda, quando a suplementação com NR começou na fase adulta, houve diminuição significativa no tempo de vida dos vermes em comparação com o controle (Conjunto 1F). Coletivamente, esses resultados mostram que NR não aumenta o tempo de vida nas nossas condições experimentais e sugere que seu efeito no tempo de vida não é tão robusto e evidente como publicado (Mouchiroud et al., 2013).

No artigo seminal em que NR foi mostrado aumentar o tempo de vida de *C. elegans* (Mouchiroud et al., 2013), o tempo de vida mediano dos vermes era consistentemente menor que aquele observado em nossos experimentos. Essa informação, juntamente com dados da literatura mostrando que tratamento com NR havia sido capaz de aumentar o tempo de vida em um modelo de estresse genotóxico mas não nos vermes selvagens controle (Fang et al., 2014), nos levou a hipotetizar que NR só aumentaria o tempo de vida de *C. elegans* em condições de acúmulo de estresse fisiológico. Para testar isso, sujeitamos vermes tratados com NR desde o ovo

a *heat stress* a 28 °C (temperatura acima da fisiológica para o verme) a partir do dia 0 de adulto e até o fim da vida. Novamente, tratamento com NR não aumentou o tempo de vida, ou, mais especificamente, não resultou em aumento de resistência a estresse térmico (Conjunto 2A; 1 replicata; dados não mostrados). Para testar outro tipo de estresse, a saber, oxidativo, vermes tratados desde o ovo com NR ou veículo foram transferidos no dia 0 de adulto para placas com seus respectivos tratamentos mas adicionadas também de Paraquat, um agente pró-oxidante, a 4 mM. Nesse experimento, tratamento com NR desde o ovo pareceu ser protetivo para o verme em uma de duas replicatas (Conjunto 2B; 2 replicatas; dados não mostrados). Entretanto, como o tamanho amostral foi demasiadamente pequeno e vários vermes foram censurados, houve poucos “eventos de morte” registrados (~30 por condição) e o experimento não é conclusivo. Optamos por realizar o ensaio de resistência a estresse usando Paraquat porque esse experimento já havia sido utilizado no artigo de referência (Mouchiroud et al., 2013), em que NR foi mostrado diminuir a mortalidade induzida por Paraquat. Em relação ao ensaio de *heat stress* crônico a 28 °C, apesar de não ter sido realizado no artigo em questão, nossa escolha se justifica pela ativação de UPR^{mt} (*mitochondrial Unfolded Protein Response*; uma resposta de defesa mitocondrial contra estresse proteotóxico) por NR (Mouchiroud et al., 2013), que poderia aumentar a resistência a estresse térmico, como sugerido anteriormente (Labbadia et al., 2017). Apesar disso, foi uma hipótese desprezível, uma vez que NR, especificamente, não havia sido mostrado aumentar genes relacionados especificamente à resposta a *heat-shock*, como, por exemplo, *hsf-1* (Mouchiroud et al., 2013).

Após diversas tentativas com o lote de NR que possuíamos, como relatado, consideramos que seria importante obter outro lote de um novo fornecedor. Assim, adquirimos um novo lote de NR da empresa Elysium. É importante ressaltar que, comparando-se os dois lotes, a cor e a granulosidade dos NRs eram diferentes. Entretanto, essas observações foram realizadas de modo totalmente empírico, ou seja, não utilizamos ferramentas analíticas físico-químicas para isso. Realizamos com o novo lote de NR — a partir daqui referido como “NR (elysium)” — parte dos mesmos experimentos que havíamos realizado com o NR antigo, isto é, tempo de vida e resistência ao estresse oxidativo com Paraquat, e adicionamos alguns outros experimentos. Em concordância com o que havíamos verificado com o lote anterior

de NR, novamente vermes tratados desde a fase embrionária com NR (elysium) não viveram mais do que o controle (Figura 2A), inclusive apresentando menor tempo de vida em uma das duas replicatas realizadas. Para além das possíveis causas do insucesso em reproduzir o efeito reportado de NR que já haviam sido testadas nos experimentos correspondentes ao “Conjunto 1”, hipotetizamos que o NR estava sendo degradado na preparação das placas, ao adicioná-lo ao meio ainda quente/morno ($\sim 45^{\circ}\text{C}$). Para testar essa hipótese, realizamos outro experimento de tempo de vida, dessa vez adicionando NR (elysium) diretamente à bactéria ao invés de nas placas. Tratamento com NR desde o ovo nessas condições levou, inesperadamente, a uma clara diminuição no tempo de vida dos vermes (Figura 2B). Esse resultado sugere que bactérias expostas diretamente ao NR sofrem alguma alteração, como, por exemplo, começar a produzir alguma molécula nociva ao verme. Alternativamente, a maior mortalidade poderia ser explicada por uma maior ingestão/absorção de NR pelos vermes, em comparação com quando NR é adicionado ao NGM, uma vez que a bactéria é sua fonte de alimento, ou por um possível aumento na concentração final da droga — isso porque acrescentamos NR à bactéria líquida para uma concentração final de $500\ \mu\text{M}$, a mesma utilizada em todos os experimentos até aqui, mas dado que a camada de bactéria líquida adicionada sobre a placa de NGM é deixada secar antes de ser armazenada e/ou utilizada, por haver perda de água, a concentração final de NR no experimento é provavelmente maior que $500\ \mu\text{M}$. Na tentativa de investigar esta possibilidade, testamos a resposta de vermes a diferentes concentrações de NR (elysium) suplementado na placa, numa faixa variando de 100 a $2000\ \mu\text{M}$. Comparativamente ao controle, todas as concentrações de NR, exceto $100\ \mu\text{M}$, diminuíram o tempo de vida (Figura 2C), sendo as concentrações de $500\ \mu\text{M}$ e $2000\ \mu\text{M}$ as que mais diminuíram. Vermes expostos a concentração de $100\ \mu\text{M}$ — que foi igualmente mostrada aumentar o tempo de vida no artigo seminal (Mouchiroud et al., 2013) — viveram tanto quanto o controle (Figura 2C) nas nossas condições. Esse resultado é interessante porque a maior mortalidade em concentrações elevadas de NR é algo surpreendente e até onde sabemos não havia sido demonstrado. Apesar deste experimento ter sido realizado apenas uma vez nestas condições, ele foi repetido com mais genótipos e uma faixa diferente de variação de concentrações de NR, como será mostrado mais à frente no texto. Uma observação a ser feita neste experimento é o fato de ter ocorrido uma mortalidade prematura muito elevada nos vermes do grupo controle (Figura 2C; linha azul), que provavelmente advém de

alguma variação experimental randômica. Coletivamente, esses resultados sugerem que talvez a não reprodutibilidade dos experimentos da literatura seja causada por variações, entre laboratórios, na concentração final real da droga. Causas para essa variação no efeito do NR podem ser causadas por diferença na pureza, biodisponibilidade para o verme, degradação ou manipulação. De qualquer modo, nossos experimentos levantam a possibilidade de que NR tem um efeito menos robusto e reprodutível, pelo menos em *C. elegans*, do que previamente publicado (Mouchiroud et al., 2013).

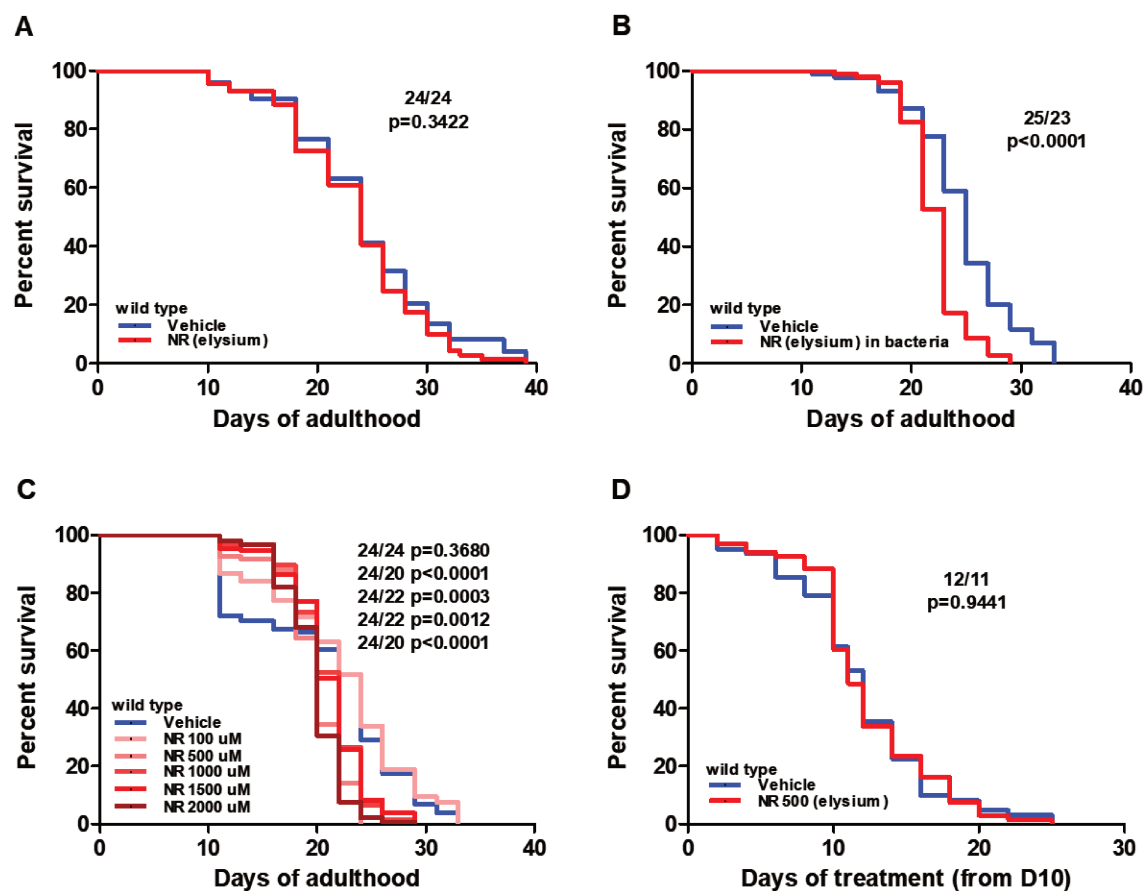


Figura 2. Tratamento com nova amostra de NR mostra tendência a diminuição no tempo de vida em *C. elegans*

(A) Suplementação com NR (elysium) (500 μ M) desde o ovo não estendeu o tempo de vida de vermes (Gráfico representativo de 2 replicatas discordantes, em que NR numa não altera e noutra diminui o tempo de vida, n=78-104 por replicata).

(B) Tratamento desde a fase embrionária com NR (elysium) (500 μ M) adicionado diretamente à bactéria que alimenta o verme causou diminuição no tempo de vida (1 replicata, n=101-109).

(C) Efeito do NR (elysium) no verme é concentração-dependente, com concentrações maiores que 100 μ M sendo nocivas. (1 replicata, n=109-150).

(D) Administração de NR iniciada em meia idade (dia 10) não aumentou o tempo de vida. (Gráfico representativo de 3 replicatas, em que NR em 2 não altera e em 1 diminui o tempo de vida, n=62-85 por replicata). Valor de p e tempo de vida mediano estão mostrados no gráfico.

A fim de excluir o efeito do NR no desenvolvimento e no período inicial da fase adulta, tratamos vermes com o composto a partir apenas do dia 10 de vida adulta (meia idade). O grupo suplementado com NR novamente não viveu mais que o controle, apresentando até mesmo redução no tempo de vida em uma das replicatas do ensaio (Figura 2D). Antagonicamente, embora sejam espécies distintas, tratamento com NR iniciado tardiamente havia sido mostrado estender ligeiramente o tempo de vida de camundongos (Zhang et al., 2016).

Em seguida, visamos a avaliar, conforme já havíamos testado anteriormente com o lote anterior de NR, se o NR (elysium) teria efeito protetivo contra estresse oxidativo induzido por Paraquat. Aumentamos a concentração desse agente oxidante para 5 mM porque experimentos do mesmo tipo realizados no laboratório num período imediatamente anterior a esse estavam exibindo baixa mortalidade comparativamente à literatura (Mouchiroud et al., 2013, 2011), que reporta tempo de vida mediano de 6-8 dias em vermes expostos a 4 mM de Paraquat. Suplementação com NR (elysium) desde a fase embrionária não protegeu contra estresse oxidativo, independentemente da idade de início da exposição ao Paraquat (Figura 3A-C).

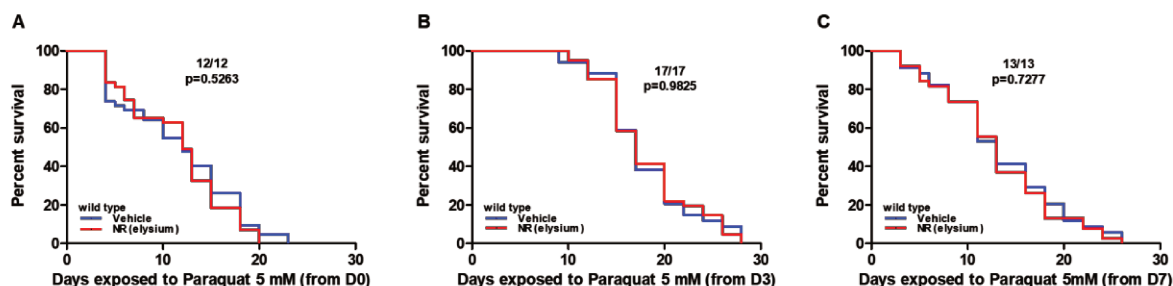


Figura 3. NR (elysium) não protege contra estresse oxidativo

(A, B e C) Suplementação com NR (elysium) (500 μ M) desde o ovo não conferiu resistência a estresse oxidativo em vermes transferidos para NGM adicionado de 5 mM de Paraquat nos dias 0 (A), 3 (B) ou 7 (C) de fase adulta. (Gráficos representativos de 2 replicatas com resultados concordantes. Entretanto, o n foi pequeno nos 3 experimentos. A: n=36-43 por replicata; B: n=34-43 por replicata; C: n=30-39 por replicata). Valor de p e tempo de vida mediano estão mostrados no gráfico.

4.2. Doadores de NAD^+ não afetam o tempo de vida e a resistência ao estresse

O próximo passo do trabalho foi avaliar se outras moléculas que aumentam os níveis de NAD^+ seriam capazes de estender o tempo de vida de *C. elegans* nas nossas condições experimentais. Nicotinamida (NAM) — produto de degradação de NAD^+ pelas enzimas que o consomem e componente da “via de salvamento” — é uma molécula que apresenta efeito dual, agindo como doador de NAD^+ em baixas concentrações ($\sim 200 \mu$ M) mas inibindo SIRT1/SIR-2.1 em concentrações na faixa de

25 mM (Schmeisser et al., 2013). Outra estratégia para aumentar os níveis de NAD^+ é tratamento com Olaparib (AZD2281), um inibidor de PARP-1 também mostrado aumentar o tempo de vida em *C. elegans* (Mouchiroud et al., 2013). Começando desde a fase embrionária, vermes tratados com NAM (Figura 4A) ou Olaparib (Figura 4B) não apresentaram aumento no tempo de vida. Tratamento com Olaparib também não aumentou a tolerância de vermes ao estresse oxidativo promovido por Paraquat (Figura 4C).

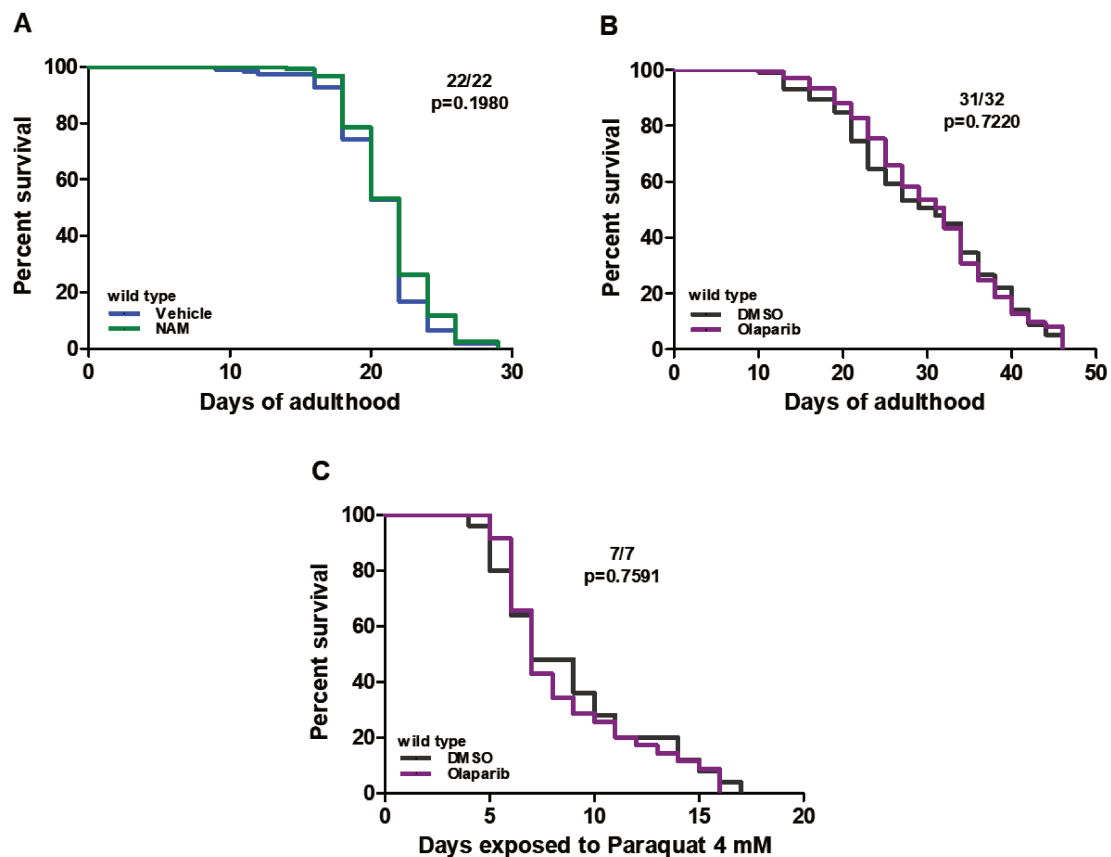


Figura 4. Outros doadores de NAD^+ também parecem não aumentar tempo de vida e resistência a estresse oxidativo

(A) Suplementação com NAM (200 μM) desde o ovo não estendeu o tempo de vida de vermes (Gráfico representativo de 3 replicatas com resultados concordantes, $n=123-170$ por replicata).

(B) Olaparib (100 nM) desde o ovo igualmente não estendeu o tempo de vida de vermes (1 replicata, $n=123-142$).

(C) Olaparib (100 nM) também não protege vermes contra estresse oxidativo por Paraquat (4 mM). (Gráfico representativo de 2 replicatas com resultados concordantes. Entretanto, nos dois experimentos, além do n ter sido pequeno, houve muitos vermes censurados, o que diminuiu o número de eventos de morte para apenas aproximadamente 30 por condição. $n=17-54$).

Valor de p e tempo de vida mediano estão mostrados no gráfico.

Esse resultado aponta claramente que o problema de falta de reprodutibilidade com o qual nos deparamos não é algo restrito a uma única droga, o NR, e nos leva a perguntar se essas intervenções estão de fato aumentando os níveis

de NAD⁺ nas nossas condições experimentais. Caso estejam, por quais razões em nossas condições o efeito no tempo de vida não ocorre com nenhuma das intervenções que foram mostradas aumentar NAD⁺, à exceção de mutação em *parp-1(ok988)*? Uma possível explicação para isso, amparada por alguns dos nossos resultados, seria que por alguma razão a concentração de NR utilizada (500 μ M) está sendo na prática maior — talvez por estar mais biodisponível ou por interagir com outras variáveis — do que a utilizada por outros laboratórios, o que leva à letalidade verificada nos nossos experimentos. Ademais, se essas intervenções estiverem de fato aumentando NAD⁺ em níveis semelhantes àqueles publicados (Mouchiroud et al., 2013), então nossos dados são suficientemente convincentes para afirmar que essas intervenções, diferentemente do que havia sido demonstrado, não aumentam o tempo de vida e a resistência ao estresse oxidativo em todas as condições testadas.

4.3. Independentemente da concentração utilizada, NR não aumenta o tempo de vida e a resistência aos estresses genotóxico e oxidativo

Para explorar melhor a hipótese de que NR seria tóxico em altas concentrações e de que concentrações da droga menores que 100 μ M aumentariam o tempo de vida em nossas condições, repetimos os experimentos de dose-resposta com NR, desta vez incluindo concentrações menores. Contrariando nossas expectativas, o tempo de vida de vermes selvagens tratados com NR a 1 μ M não aumentou em relação ao veículo (Figura 5A), enquanto nas concentrações de 10 e 100 μ M o tempo de vida não apenas não aumentou como foi menor que o controle, embora em uma das replicatas a diminuição desse parâmetro na concentração de 100 μ M não tenha atingido significância estatística. Em concentrações maiores, 500 e 2000 μ M, nossos resultados mostram uma diminuição bastante acentuada do tempo de vida (Figura 5A), que foi consistente nas duas replicatas, corroborando as observações anteriores (Figura 2C) de que altas concentrações de NR são tóxicas ao verme. Como dito anteriormente, até onde sabemos, esta é a primeira vez em que altas concentrações de NR são relacionadas com efeitos deletérios no nematoide *C. elegans*. Em ratos, porém, dose elevada de NR já havia sido demonstrada afetar negativamente o desempenho em protocolo de exercício e desregular o metabolismo energético e redox (Kourtzidis et al., 2018; Kourtzidis et al., 2016).

Em *C. elegans*, mutação em *xpa-1*, gene que codifica para a proteína homóloga à XPA (xeroderma pigmentosum) humana, apresenta diminuição do tempo de vida em comparação com o verme selvagem devido ao acúmulo de estresse genotóxico, dado que XPA-1 tem como uma das funções o reparo de DNA. Fang e colaboradores (Fang et al., 2014) mostraram que suplementação com NR (500 μ M) ao longo da vida foi capaz de resgatar a diminuição no tempo de vida de vermes mutantes *xpa-1(ok698)*. Mecanicamente, NR preveniria a diminuição do tempo de vida nessa linhagem por repor os níveis de NAD⁺, uma vez que a genotoxicidade da mutação em *xpa-1(ok698)* causa hiperativação de PARP-1 e consequente consumo e diminuição do *pool* de NAD⁺ (Fang et al., 2014). É interessante notar que o mesmo artigo reportou que tratamento com NR (500 μ M) não aumentou o tempo de vida de vermes selvagens, um resultado similar ao observado em nossas condições.

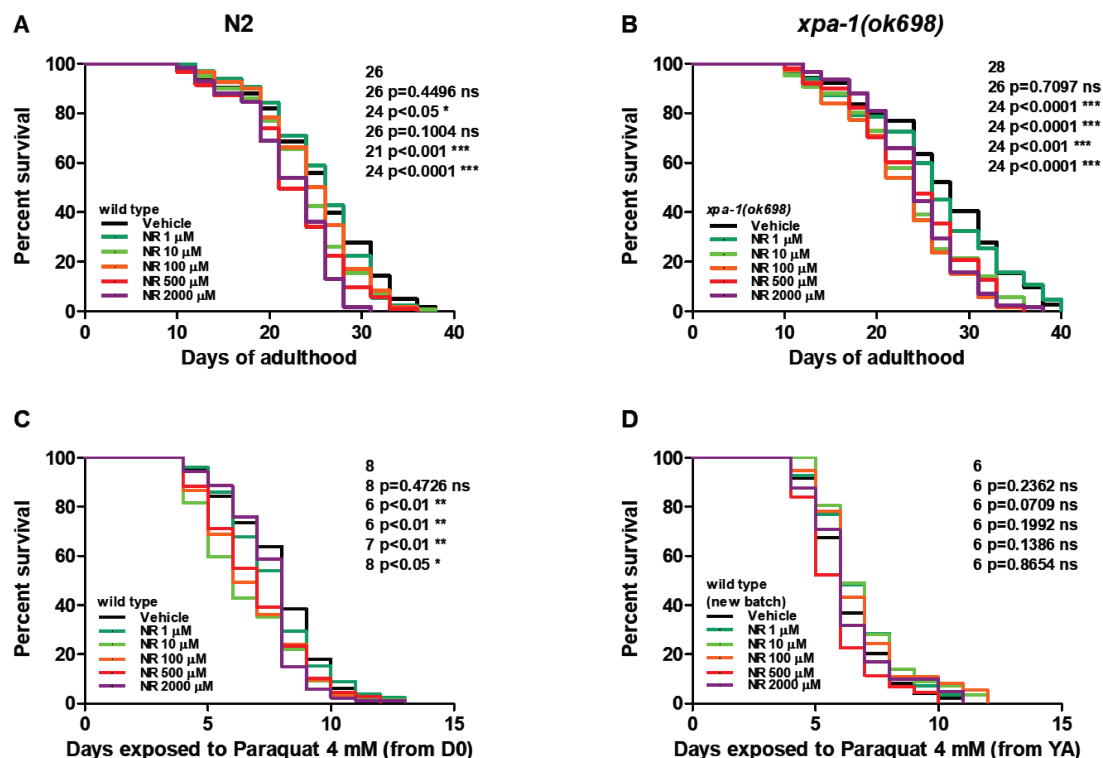


Figura 5. NR apresenta efeito deletério em condições normais e inconsistente em condições de estresse oxidativo

(A e B) Curvas de tempo de vida de vermes selvagens (N2) ou mutantes *xpa-1(ok698)* tratados ao longo de toda a vida com NR em concentrações variando de 1 a 2000 μ M. (A,B: gráficos representativos de 2 replicatas com resultados similares. n= 99-139(A), 83-139(B), por replicata).

(C e D) Curvas de resistência ao estresse oxidativo de vermes selvagens (N2) cuja linhagem (C) é de uso comum ao laboratório ou (D) compreende um novo estoque cedido por um colaborador, tratados ao longo de toda a vida com NR em concentrações variando de 1 a 2000 μ M e desafiados com 4 mM de Paraquat a partir do dia 0 de adulto ou da fase de jovem-adulto. (C,D: gráficos representativos de 2 replicatas com resultados levemente diferentes. n= 94-125(A), 60-103(B), por replicata).

Valor de p e tempo de vida mediano estão mostrados no gráfico.

Na tentativa de avaliar de mais uma forma a eficácia de NR, monitoramos o tempo de vida de vermes mutantes para *xpa-1(ok698)* tratados com NR em concentrações de 1 a 2000 μ M. De modo similar ao que observamos para o verme selvagem, e em discordância com o que havia sido publicado (Fang et al., 2014), tratamento com NR diminuiu a longevidade do verme mutante *xpa-1(ok698)* em todas as concentrações testadas, exceto na de 1 μ M (Figura 5B), em que não houve diferença entre tratamento e veículo. O verme mutante *xpa-1(ok698)*, que era esperado viver menos que o selvagem (Fang et al., 2014), inesperadamente apresentou uma maior longevidade (tempo de vida mediano de 28 dias, contra 26 do selvagem; $p < 0,01$; os dois grupos foram avaliados no mesmo experimento, apesar de estarem separados na imagem). Entretanto, é possível que o maior tempo de vida do mutante *xpa-1(ok698)* em relação ao verme selvagem não seja tão robusto, talvez por baixa penetrância da mutação, não sendo verificado em todos os experimentos (Evandro Fang, comunicação pessoal). Fundamentalmente, o resultado que obtivemos com o mutante *xpa-1(ok698)* confirma que NR (elysium) apresenta efeito deletério no tempo de vida, diferentemente das reivindicações anteriores (Mouchiroud et al., 2013).

Uma das hipóteses levantadas e testadas anteriormente era a de que NR só teria efeito em vermes sob algum tipo de estresse. Porém, além de termos testado apenas uma concentração de NR, 500 μ M, em vermes expostos a 4 mM de Paraquat, o experimento teve tamanho amostral pequeno e aparentemente o Paraquat não diminuiu tanto o tempo de vida como deveria, como discutido anteriormente então os resultados não são conclusivos. Para colocar essa hipótese à prova de forma mais sistemática e confiável, além dos vermes selvagens que estávamos usando, testamos em paralelo outro estoque de vermes selvagens que nos fora cedido por um colaborador e havia apresentado tempo de vida mediano menor do que o nosso nas nossas condições experimentais. Quando tratamos nossos vermes selvagens com NR de 1 a 2000 μ M ao longo da vida, desafiando-os com Paraquat a 4 mM a partir do dia 0 de fase adulta, os resultados foram inconsistentes. Em uma das replicatas houve diminuição de resistência ao estresse oxidativo em todas as concentrações testadas, exceto na de 1 μ M (Figura 5C). Na outra replicata, porém, enquanto as concentrações de 500 e 2000 μ M conferiram maior resistência ao estresse, não houve diferença estatística entre as outras concentrações e o veículo (dados não mostrados). No experimento com a população de vermes selvagens de outro lote, em uma das

replicatas não houve diferença entre NR e veículo em nenhuma das concentrações testadas (Figura 5C), enquanto na outra replicata houve um pequeno aumento na resistência ao estresse oxidativo nas concentrações de 1 e 500 μM (dados não mostrados). O efeito na segunda replicata não obedeceu a uma tendência governada pela concentração de NR e diferiu do resultado mais consistente da primeira. Além disso, nessa replicata, o número de indivíduos censurados foi bastante elevado e o tempo de vida máximo da população testada foi menor (9 dias, em comparação com 12 dias da primeira replicata), o que leva à superestimação dos eventos de morte e diminuição do poder de diferenciação entre amostras, uma vez que poucos eventos de morte causam um efeito grande no gráfico. Em suma, esses resultados evidenciam um efeito pouco robusto, porém, definitivamente, não benéfico, do NR em condições de acúmulo de estresse oxidativo.

4.4. NR não ativa genes mitocondriais protetivos e principais vias metabólicas nem melhora a saúde geral de *C. elegans*

No artigo seminal em que nos baseamos para o projeto (Mouchiroud et al., 2013) foi descrito pela primeira vez o mecanismo pelo qual NR alegadamente aumentaria o tempo de vida em *C. elegans*. O mecanismo incluía ativação de resposta antioxidante mitocondrial e de UPR^{mt} (*mitochondrial unfolded protein response*), cuja ativação havia sido determinada pela ativação de GFP como gene repórter para *hsp-6* e *sod-3*, respectivamente. Os dados do artigo mostram ativação de *hsp-6::GFP* nos dias 1 e 3 de fase adulta e de *sod-3::GFP* apenas no dia 3 de fase adulta de vermes tratados desde a fase embrionária com 500 μM de NR, ao passo que não há ativação de *hsp-4::GFP* (*proxy* para ativação de UPR de retículo endoplasmático) com o tratamento (Mouchiroud et al., 2013). Em razão da diferença de efeito com concentrações mais altas de NR verificadas nos nossos experimentos, tentamos reproduzir os experimentos do artigo supracitado, porém novamente incluindo mais concentrações de NR. Para isso, vermes expressando GFP sob o controle dos promotores de *hsp-6*, *sod-3* ou *hsp-4* foram tratados com NR em concentrações variando de 1 a 2000 μM (como utilizado nos experimentos da Figura 5). Com exceção do repórter para *hsp-6* no dia 1 tratado com 2000 μM de NR (Figura 6A), qualitativamente, nenhuma das concentrações de NR utilizadas pareceu ativar GFP

(Figura 6A-C). Entretanto, nós não realizamos a quantificação das imagens (que seria realizada utilizando-se o *software* ImageJ), ficando as conclusões baseadas apenas

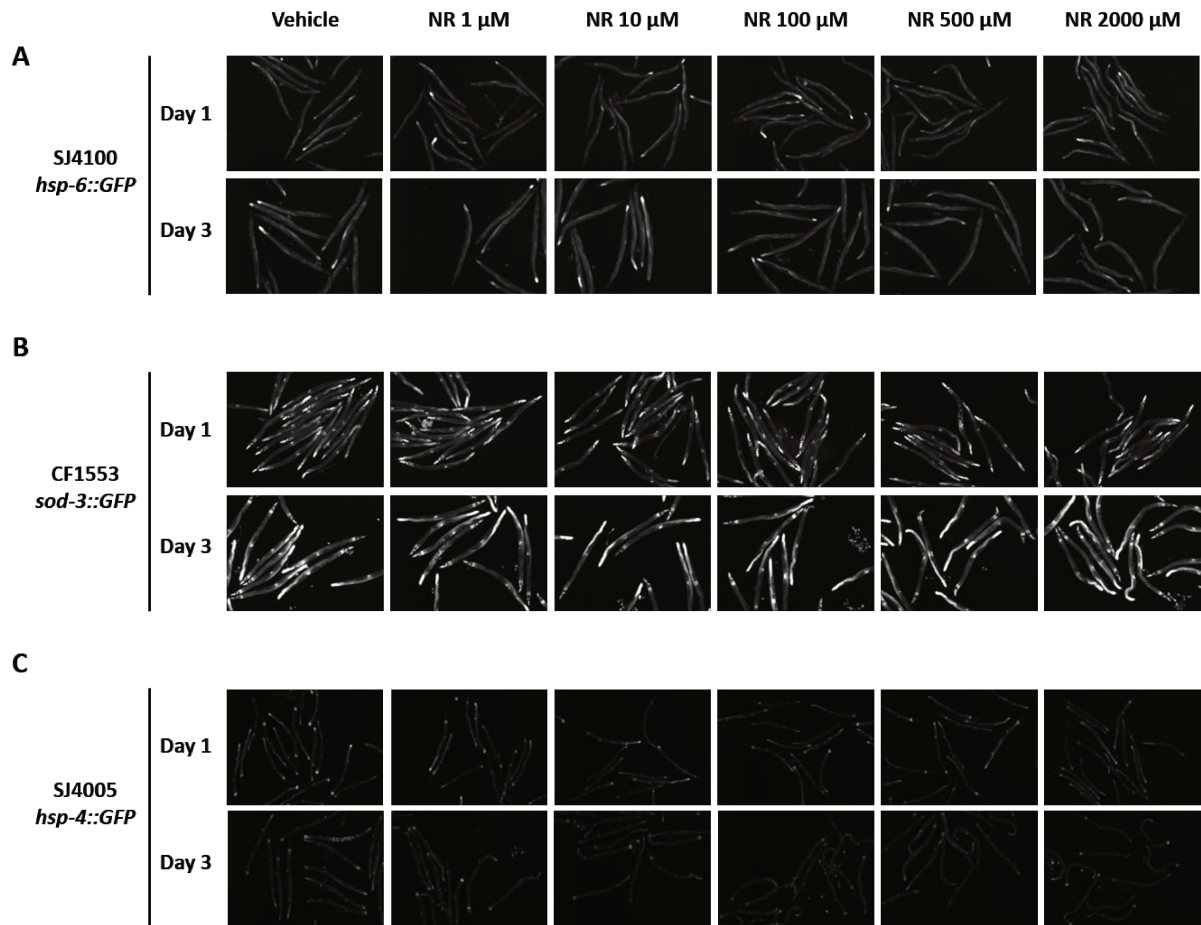


Figura 6. NR parece não ativar genes repórteres para UPR^{mt} (mitocondrial) e defesa antioxidante (A, B e C) Imagens (representativas) de fluorescência obtidas nos dias 1 e 3 de adulto de vermes carregando transgene com GFP como gene repórter para (A) *hsp-6* (UPR^{mt}), (B) *sod-3* (defesa antioxidante) e (C) *hsp-4* (UPR^{er}) tratados desde a fase embrionária com NR em concentrações variando de 1 a 2000 μ M. As imagens mostradas são representativas. Em cada dia, para cada condição, aproximadamente 20 vermes foram fotografados. Cada experimento foi realizado duas (para *hsp-4::GFP*) ou três (para *hsp-6::GFP* e *sod-3::GFP*) vezes, de modo independente. A estimativa foi feita qualitativamente (visualmente), usando-se como parâmetro as diferenças nas fluorescências dessas linhagens após tratamento com NR mostradas no artigo seminal (Mouchiroud et al., 2013).

na estimativa qualitativa delas. Embora isso enfraqueça moderadamente as conclusões deste experimento, consideramos que, excepcionalmente neste caso, a apreciação visual das imagens é algo confiável, uma vez que no artigo seminal as diferenças de expressão nas imagens entre os grupos controle e tratado eram bastante evidentes (Mouchiroud et al., 2013), o que não se reproduziu no nosso experimento.

Como já discutido anteriormente na Introdução, o objetivo inicial do projeto era estudar a interação entre NR e *dcr-1*, através do silenciamento desta por RNAi. Apesar de não termos conseguido reproduzir os efeitos do tratamento com NR nos vermes, incluindo aumento no tempo de vida, e havermos, consequentemente, mudado os rumos do projeto, mantivemos no planejamento alguns experimentos que objetivavam testar a interação entre essas duas variáveis independentes, a saber, tratamento com NR e RNAi contra *dcr-1*. Tratamento com NR havia sido mostrado capaz de induzir a expressão de genes-chave das principais vias metabólicas, como *cts-1* (ciclo de Krebs), *hxx-1* (glicólise) e *pyc-1* (gliconeogênese), mas não a de *cox-4* (cadeia transportadora de elétrons) (Mouchiroud et al., 2013). Na tentativa de reproduzir os dados acima e, além disso, verificar o efeito do silenciamento de *dcr-1* nos mesmos, nós analisamos a expressão desses genes em vermes no dia 3 de adulto, tratados desde a fase embrionária com veículo ou NR e alimentados com bactéria produzindo dsRNA controle ou contra *dcr-1*. Diferentemente do que havia sido mostrado na literatura (Mouchiroud et al., 2013), tratamento com NR (500 μ M) não aumentou a expressão de nenhum dos genes testados (Figura 7A), que igualmente não foi afetada pelo silenciamento de *dcr-1* (Figura 7A). Nós também avaliamos a expressão de *dcr-1* nas mesmas condições de tratamento e RNAi. Suplementação com 500 μ M de NR não afetou a expressão de *dcr-1* (Figura 7B). Apesar de não ter sido implicado previamente na regulação de *dcr-1*, essa hipótese havia sido levantada por nós quando escrevemos o projeto inicial. Embora não tenha sido corroborada experimentalmente, ainda existe a possibilidade de NR afetar *dcr-1* de modo traducional ou pós-traducional que, para ser testada, requereria o uso de gene repórter traducional (com GFP fusionado à proteína de DCR-1) ou *western blotting*. Em relação ao mRNA de *dcr-1* nos vermes tratados com NR contra *dcr-1*, houve diminuição significativa da expressão (Figura 7B), demonstrando claramente que a técnica de RNAi foi efetiva para o silenciamento gênico. Em *C. elegans*, NR também foi mostrado reverter parcialmente o declínio na vitalidade relacionado ao envelhecimento (Mouchiroud et al., 2013). Por isso, avaliamos o efeito de NR, bem como sua interação com *dcr-1*, no fenótipo de mobilidade, uma maneira de se estimar a vitalidade e/ou aptidão (*fitness*) dos vermes, um parâmetro que sabidamente sofre declínio com o envelhecimento. Tanto tratamento com NR desde a fase embrionária quanto silenciamento de *dcr-1* não alteraram consistentemente a mobilidade nos dias avaliados (Figura 7D). Apesar de na replicata 1 haver ocorrido aumento de mobilidade

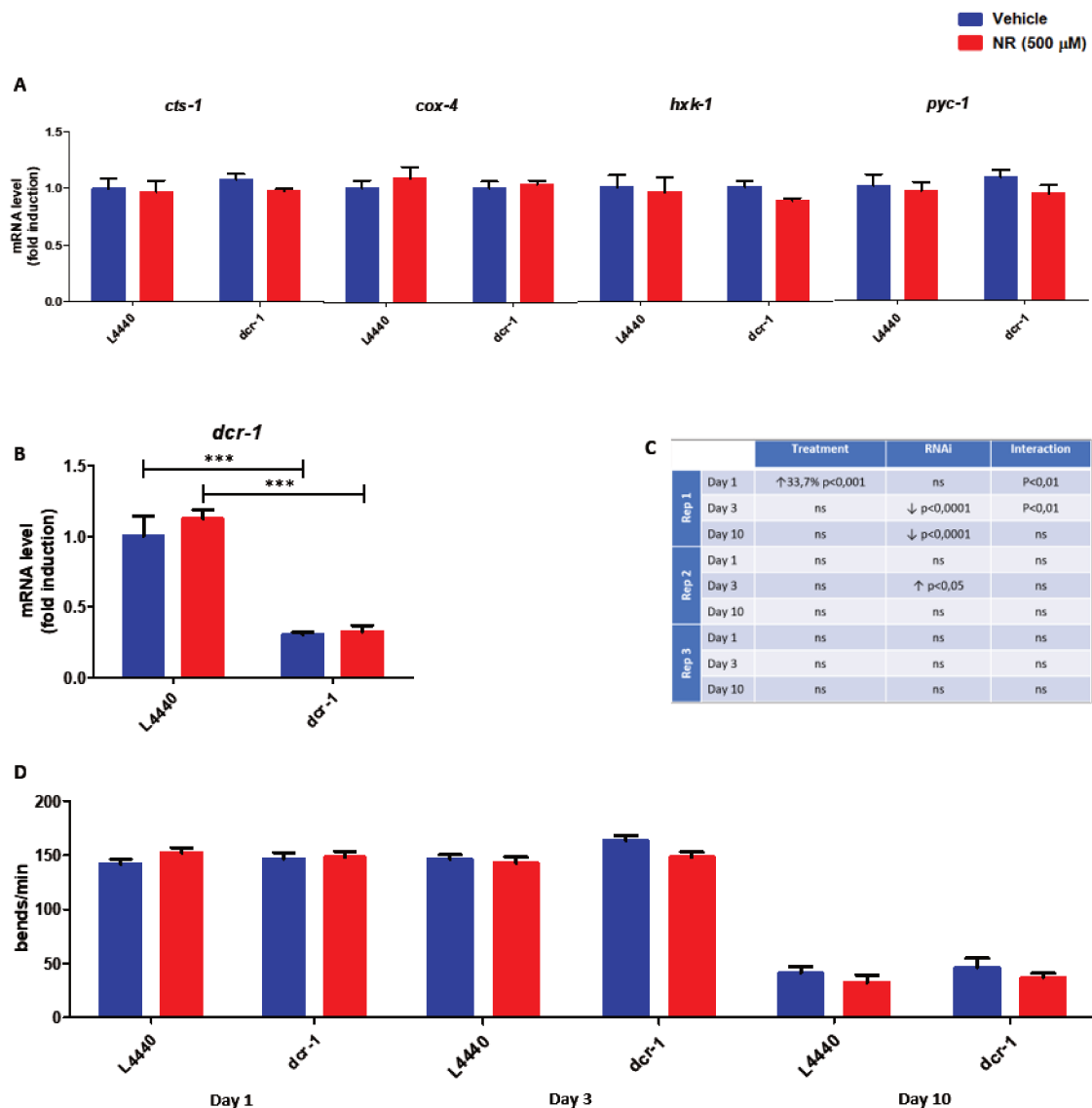


Figura 7. NR não altera expressão de genes metabólicos importantes nem previne declínio na vitalidade relacionado ao envelhecimento

(A) RT-qPCR de genes-chave do metabolismo em resposta ao tratamento com NR (500 μ M) ou veículo e RNAi contra *dcr-1* ou controle.

(B) Expressão gênica de *dcr-1* em função do tratamento com NR (500 μ M). Evidenciada a diminuição dos níveis de *dcr-1* após tratamento com RNAi contra *dcr-1*.

(C) Tabela resumindo resultados obtidos para cada um dos três experimentos independentes do ensaio de mobilidade.

(D) Aptidão física, avaliada através de ensaio de mobilidade, de vermes tratados com NR (500 μ M) ou veículo e RNAi contra *dcr-1* ou controle.

As barras estão expressas como média \pm SEM, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; valor de p não sinalizado indica que a diferença não atingiu significância estatística.

apenas no dia 1 em consequência do tratamento com NR e diminuição de mobilidade nos dias 3 e 10 em consequência do silenciamento de *dcr-1*, na replicata 2, contraditoriamente, houve aumento da mobilidade no dia 3 no grupo que sofreu silenciamento de *dcr-1*. Interessantemente, dados não publicados do nosso grupo mostraram que RNAi contra *dcr-1* diminui a mobilidade de vermes no dia 12 de adulto.

Entretanto, no caso supracitado o RNAi foi utilizado por duas gerações — enquanto neste trabalho foi utilizado por uma geração —, então o nível de silenciamento de *dcr-1* teve maior magnitude, o que poderia explicar as diferenças obtidas. Coletivamente, os resultados da Figura 7 são consistentes com a ausência de efeito do NR observada nos parâmetros avaliados até agora.

Os efeitos da suplementação com NR são, primariamente, mediados pela sua ação como doador de NAD^+ através da “via de salvamento” (Bieganowski & Brenner, 2004; Mouchiroud et al., 2013; Yoshino, Baur, & Imai, 2018). Para nos certificar de que os níveis de NAD^+ estavam de fato aumentados sob tratamento com NR, nos propusemos a quantificar seus níveis em vermes tratados desde a fase embrionária com veículo ou NR a 10, 500 e 2000 μM . Inicialmente, quantificaríamos NAD^+ por HPLC (Yoshino & Imai, 2013), porém, o laboratório que realizaria o procedimento entrou em reforma, ficando impossibilitado de nos atender. Então, obtivemos o kit comercial de quantificação de NAD^+/NADH da Sigma e conduzimos o experimento. Como o kit mede diretamente apenas NADH , a quantificação de NAD^+ é feita indiretamente pela subtração da concentração obtida de $\text{NADH}_{\text{apenas}}$ (cuja determinação é feita após aquecer uma alíquota da amostra a 60°C por 30 min, para degradação de NAD^+) da concentração obtida de $\text{NAD}_{\text{total}}$ ($\text{NAD}^+ + \text{NADH}$). Infelizmente, apesar de termos seguido exatamente todos os passos especificados no kit comercial e obtido valores confiáveis na curva-padrão de NADH (Figura 8B), os valores de leitura de absorbância para NADH foram muito próximos dos valores do branco (Figura 8A), como se não houvesse absolutamente nada de NADH nos vermes — o que é biologicamente incongruente —, de modo que é impossível interpretar os resultados. É possível que a explicação para os níveis de NADH terem resultado em leitura próxima de zero seja que a quantidade de vermes extraída tenha sido baixa (coletamos aproximadamente 1500 vermes em cada condição), uma vez que os níveis de NADH são 4-5 vezes menores que os de NAD^+ em alguns tecidos (Schwartz, Passonneau, Johnson, & Pastan, 1974; Zhu, Lu, Lee, Ugurbil, & Chen, 2015), e os valores reais terem ficado abaixo do limite de detecção do kit comercial. Os valores de leitura de absorbância para $\text{NAD}_{\text{total}}$, por outro lado, ficaram dentro da faixa da curva-padrão. Considerando que suplementação com um doador de NAD^+ aumentaria

A

		Leitura abs_{450nm}		Quantidade (pmol)	
		NAD total (NAD ⁺ + NADH)	NADH apenas	NAD total (NAD ⁺ + NADH)	NADH apenas
Curva-padrão	0	0.367	-	-	0
	20	0.702	-	-	20
	40	1.073	-	-	40
	60	1.436	-	-	60
	80	1.724	-	-	80
	100	2.049	-	-	100
Rep 1	Veículo	1.437	-0.067	63	00
	NR 10 μM	1.420	-0.059	61	0
	NR 500 μM	1.419	-0.065	61	0
	NR 2000 μM	1.017	-0.071	38	0
Rep 2	Veículo	1.728	0.015	80	0
	NR 10 μM	1.805	-0.069	84	0
	NR 500 μM	1.723	-0.054	79	0
	NR 2000 μM	1.470	-0.065	64	0
Rep 3	Veículo	0.406	-0.066	2	0
	NR 10 μM	0.508	-0.069	8	0
	NR 500 μM	0.506	-0.064	8	0
	NR 2000 μM	0.495	-0.076	7	0

B

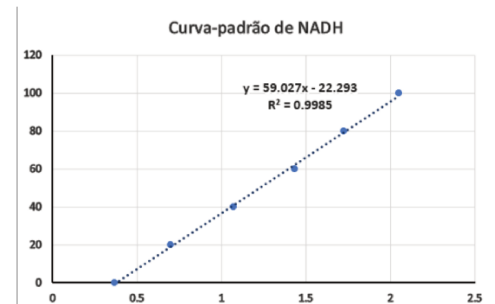


Figura 8. Experimento de quantificação de NAD⁺ em vermes tratados com NR falhou

(A) Tabela resumindo os valores de absorvância obtidos na leitura de NADH, bem como a quantidade de NADH em cada amostra determinada pela aplicação desses valores na equação da reta obtida da curva-padrão de NADH.

(B) Curva-padrão de NADH, mostrando a equação da reta e seu coeficiente de correlação (R).

Os resultados não estão normalizados pela concentração proteica, visto que o experimento de quantificação de NAD⁺/NADH por si só não funcionou.

também os níveis de NAD total, uma vez que há NAD exógeno entrando no sistema, ainda que considerássemos os valores de NAD_{total} para a avaliação dos efeitos do NR, em 2 das 3 replicatas biológicas testadas ocorreu diminuição dos níveis de NAD_{total}, o que é apenas especulativo, visto que não é possível calcular estatisticamente valores de um experimento que não funcionou.

4.5. Linhagem carregando mutação em *parp-1(ok988)* deixa de viver mais após cruzamento para equalizar o background genético

Por fim, nós havíamos previamente mostrado que a longevidade promovida por mutação no gene *parp-1(ok988)* é dependente de *dcr-1* (Introdução; Figura 1; dados não publicados). Porém, a linhagem de *C. elegans* que carrega essa mutação, “RB1042”, é adquirida comercialmente do CGC e, por não ter sido anteriormente cruzada com a linhagem selvagem, pode conter outras mutações no *background* genético geradas pela técnica utilizada [tratamento com o agente mutagênico trimetil psoraleno (TMP) seguido de radiação UV]. Para equalizar o *background* genético, cruzamos a linhagem RB1042 (P0) com a linhagem selvagem (P0), então coletamos da geração F1 hermafroditas em estágio L4, que são autofecundativas, e, após 4 dias, isolamos linhagens clonais na geração F2 em uma tentativa de obter vermes homozigotos para a mutação em *parp-1(ok988)*. Para a genotipagem da mutação,

utilizamos a estratégia de três primers, dois *forward* e um *reverse*, em que o primer *reverse* e apenas um dos *forward* flanqueiam a região da mutação enquanto o outro primer *forward* se anela dentro da região mutada. Dessa forma, dois produtos de reação são gerados, um na presença do alelo mutado e outro na presença do alelo selvagem. Com os primers escolhidos, esperávamos um produto de reação de 173 bp na presença do alelo mutante e um de 333 bp na presença do alelo selvagem. Após resolver o gel, verificamos que todos os grupos (linhagens clonais resultantes do cruzamento), incluindo o controle para a mutação, esperado ser homozigoto para esta [verme *parp-1(ok988)* não cruzado], apresentaram a banda correspondente ao alelo selvagem, enquanto estranhamente nenhum deles teve amplificação do fragmento correspondente ao alelo mutante (Figura 9A). É importante apontar que não usamos, especificamente nessa reação, um controle positivo para alelo selvagem. Como o resultado foi inesperado e aparentemente errôneo, uma vez que não esperávamos

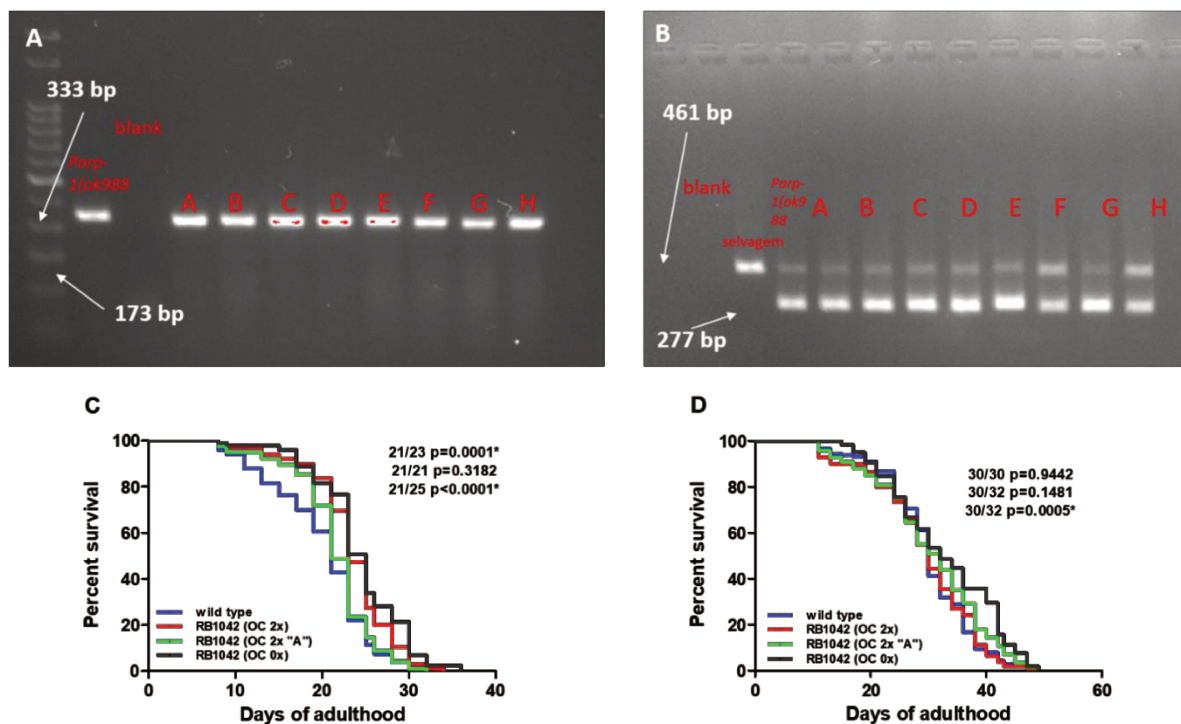


Figura 9. Cruzamento de vermes mutantes *parp-1(ok988)* bloqueia aumento no tempo de vida

(A) Genotipagem de vermes *parp-1(ok988)* resultantes de cruzamento realizada com trio de primers que acidentalmente amplifica AC8.1, um pseudogene de *parp-1*.

(B) Genotipagem de vermes *parp-1(ok988)* resultantes de cruzamento realizada com trio de primers possibilitando diferenciar vermes carregando a mutação em homozigose, em heterozigose e vermes selvagens.

(C e D) Vermes mutantes para *parp-1(ok988)* não apresentam aumento consistente no tempo de vida quando cruzados contra o verme selvagem para equalização do *background* genético. C e D representam uma replicada cada. Importante notar que o tempo de vida dos vermes em D foi muito maior que o padrão, provavelmente por contaminação do *streak* de OP50-1 utilizado, tendo esse problema sido imediatamente resolvido no laboratório. (C: n=98-117; D: n=127-170).

Valor de p e tempo de vida mediano estão mostrados no gráfico.

amplificação do alelo selvagem no verme hipoteticamente homozigoto para mutação, realizamos novamente *in silico* PCR (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) com os primers utilizados e verificamos que havia uma amplificação prevista de AC8.1, um pseudogene de *parp-1* (cromossomo I) localizado no cromossomo X. Usando ferramentas de alinhamento (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/), comparamos a sequência do gene de *parp-1* com seu pseudogene, AC8.1, e percebemos que na região próxima à mutação a similaridade entre as duas sequências era muito alta (dados não mostrados), dificultando o *design* de primers específicos para *parp-1*. Após desenhar um novo conjunto de primers, repetimos a genotipagem. Desta vez, esperávamos um produto de PCR de 461 bp para o alelo selvagem e de 277 bp para o mutante. Na eletroforese em gel de agarose, incluímos um controle positivo para o alelo selvagem, que de fato teve amplificação apenas do fragmento de 461 bp (Figura 9B). O controle para a mutação, entretanto, assim como 6 das 8 linhagens clonais resultantes do cruzamento (indicadas com letras de “A” a “H”), tiveram, inesperadamente, amplificação tanto do fragmento específico para mutação quanto do fragmento específico pro alelo selvagem (Figura 9B), porém sendo a banda deste muito mais fraca. Esse resultado nos sugere que, apesar dos primers utilizados estarem sendo mais específicos, ainda há amplificação, ainda que fraca, do pseudogene. Essa ideia é reforçada pela amplificação maior do fragmento selvagem em duas das linhagens clonais, “F” e “H” (Figura 9B), que, por isso, acreditamos serem heterozigotas para mutação. Escolhemos, então, uma das linhagens clonais resultantes do cruzamento (a linhagem “A”), o verme não cruzado e o verme selvagem, além de uma população resultante da junção das oito linhagens clonais A-H, e realizamos experimentos de tempo de vida com esses animais. A única linhagem que consistentemente apresenta maior tempo de vida nas duas replicatas é a “RB1042 (OC 0x)”, verme mutante para *parp-1(ok988)* não cruzado (Figura 9C,D). Esse experimento nos sugere que (1) o cruzamento não funcionou e os resultados das genotipagens foram erroneamente interpretados por nós; ou (2) que o aumento no tempo de vida da linhagem RB1042 não é causado pela mutação em *parp-1(ok988)* *per se*, mas, sim, por outra mutação ou marca epigenética presente no *background* genético dessa linhagem, que poderia ou não estar interagindo com a mutação em *parp-1(ok988)*.

Em suma, nossos dados indicam uma clara ausência de efeito benéfico de NR no tempo de vida, na vitalidade, na ativação de genes-chave do metabolismo e na indução de UPR^{mt} e defesa antioxidante, contrariamente às reivindicações de que o composto teria esses efeitos (Katsyuba & Auwerx, 2017; Mouchiroud et al., 2013; Zhang et al., 2016). Entretanto, nossos resultados encontram amparo em alguns artigos da literatura mostrando que NR não estendeu o tempo de vida (Fang et al., 2014) ou que apresentou efeito negativo no exercício (Kourtzidis et al., 2016) e no metabolismo energético (Kourtzidis et al., 2018), além de comunicações pessoais de colaboradores informando que também não conseguiram reproduzir os efeitos alegados de NR em outros contextos biológicos. Além disso, até onde sabemos, mostramos pela primeira vez que NR em altas concentrações apresenta efeito deletério no tempo de vida (Figura 5A-B), embora esse resultado deva ser interpretado com cautela, visto que, em nossas condições, NR também diminuiu a longevidade em concentrações mais baixas.

Uma das hipóteses de não termos conseguido reproduzir os efeitos publicados do NR era de que o nosso lote do composto estava por alguma razão degradado. Para isso, havíamos proposto determinar por espectrometria de massas a pureza de ambos os lotes de NR; porém, o laboratório que contrataríamos para realizar esse experimento entrou em reforma. Tentamos contatar outros laboratórios para realizar o procedimento, mas não houve tempo hábil. Havíamos também proposto quantificar os níveis de ROS em resposta ao tratamento com NR, alegadamente aumentados, usando a sonda MitoSOX, que identifica superóxido mitocondrial. De fato, chegamos a realizar dois experimentos-piloto, testando uma concentração de NR e controles positivos, mas em nenhuma das condições foi possível visualizar fluorescência alguma (dados não mostrados). Como havia experimentos considerados mais prioritários para o projeto, a quantificação de ROS mitocondrial não foi repetida. Além disso, como comentado na parte concernente à Figura 6, as imagens de fluorescência com os repórteres para *sod-3*, *hsp-6* e *hsp-4* foram apreciadas apenas qualitativamente, não quantitativamente. Por fim, como já mencionado, o experimento de quantificação de NAD⁺/NADH por kit comercial apresentou resultados falhos que não permitiram interpretação alguma.

5. CONCLUSÕES

Nós apresentamos neste trabalho evidências de que NR não estende o tempo de vida nem provoca uma melhora metabólica em *C. elegans*, contrariamente ao que havia sido reportado na literatura. Essa ausência de efeito independe da linhagem bacteriana, da degradação de NAD⁺ pela bactéria, do modo de entrega da droga ou da idade de início de tratamento, entre outras variáveis avaliadas. NR também não foi capaz de ativar genes *proxy* para UPR^{mt} e resposta antioxidante mitocondrial, alegadamente centrais no mecanismo de ação de NR. Tanto silenciamento de *dcr-1* quanto tratamento com NR não ativaram genes das principais vias metabólicas nem foram consistentes em modular o declínio de mobilidade associado ao envelhecimento. Além disso, há uma sugestão para efeito tóxico de NR em alta concentração. Caso houvéssemos conseguido verificar se NAD⁺ de fato aumenta após tratamento com NR, nossos dados demonstrariam inequivocamente que NR não afeta positivamente os parâmetros anteriormente reivindicados. Obviamente, o fato de esse experimento não ter funcionado deixa nossas conclusões a respeito do efeito de NR consideravelmente mais fracas. Entretanto, o grande número de variáveis testadas e o conjunto robusto de dados obtidos sugerem que os efeitos do NR no tempo de vida e no metabolismo de *C. elegans* são menos robustos do que anteriormente reivindicado.

REFERÊNCIAS

- Bai, P., Cantó, C., Oudart, H., Brunyánszki, A., Cen, Y., Thomas, C., ... Auwerx, J. (2011). PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. *Cell Metabolism*, 13(4), 461–468. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.004>
- Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1), 20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
- Bieganowski, P., & Brenner, C. (2004). Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a preiss-handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell*, 117(4), 495–502. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00416-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00416-7)
- Boehm, M., & Slack, F. (2005). A developmental timing microRNA and its target regulate life span in *C. elegans*. *Science*, 310(5756), 1954–1957. <https://doi.org/10.1126/science.1115596>
- Burkewitz, K., Zhang, Y., & Mair, W. B. (2014). AMPK at the nexus of energetics and aging. *Cell Metabolism*, 20(1), 10–25. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.002>
- Cantó, C., & Auwerx, J. (2012). Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: All you need is NAD⁺? *Pharmacological Reviews*, 64(1), 166–187. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003905>
- Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., ... Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 458(7241), 1056–1060. <https://doi.org/10.1038/nature07813>
- Cantó, C., Houtkooper, R. H., Pirinen, E., Youn, D. Y., Oosterveer, M. H., Cen, Y., ... Auwerx, J. (2012). The NAD⁺ precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metabolism*, 15(6), 838–847. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.022>
- Cantó, C., Menzies, K. J., & Auwerx, J. (2015). NAD⁺ Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus.

- Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.023>
- Cerutti, R., Pirinen, E., Lamperti, C., Marchet, S., Sauve, A. A., Li, W., ... Zeviani, M. (2014). NAD⁺-Dependent Activation of Sirt1 Corrects the Phenotype in a Mouse Model of Mitochondrial Disease. *Cell Metabolism*, 19(6), 1042–1049. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.04.001>
- Chi, Y., & Sauve, A. A. (2013). Nicotinamide riboside, a trace nutrient in foods, is a Vitamin B3 with effects on energy metabolism and neuroprotection. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 16(6), 657–661. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32836510c0>
- Cypser, J. R., Kitzenberg, D., & Park, S. K. (2013). Dietary restriction in *C. elegans*: Recent advances. *Experimental Gerontology*, 48(10), 1014–1017. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.02.018>
- Dirks, A. J., & Leeuwenburgh, C. (2006). Caloric restriction in humans: Potential pitfalls and health concerns. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.09.001>
- Fang, E. F., Scheibye-Knudsen, M., Brace, L. E., Kassahun, H., Sengupta, T., Nilsen, H., ... Bohr, V. A. (2014). Defective mitophagy in XPA via PARP-1 hyperactivation and NAD⁺/SIRT1 reduction. *Cell*, 157(4), 882–896. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.026>
- Fontana, L., & Partridge, L. (2015). Promoting health and longevity through diet: From model organisms to humans. *Cell*, 161(1), 106–118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.020>
- Fontana, L., Partridge, L., & Longo, V. D. (2010). Extending healthy life span-from yeast to humans. *Science*, 328(5976), 321–326. <https://doi.org/10.1126/science.1172539>
- Gazzaniga, F., Stebbins, R., Chang, S. Z., McPeck, M. A., & Brenner, C. (2009). Microbial NAD metabolism: lessons from comparative genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 73(3), 529–541, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00042-08>
- Greer, E. L., & Brunet, A. (2009). Different dietary restriction regimens extend lifespan

- by both independent and overlapping genetic pathways in *C. elegans*. *Aging Cell*, 8(2), 113–127. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00459.x>
- Guerra, B. A., Brandão, B. B., Pinto, S. S., Salgueiro, W. G., De-Souza, E. A., Reis, F. C. G. G., ... Mori, M. A. (2019). Dietary sulfur amino acid restriction upregulates DICER to confer beneficial effects. *Molecular Metabolism*, 29(August), 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.08.017>
- Harman, D. (2003). The Free Radical Theory of Aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, 5(5), 557–561.
- Jinek, M., & Doudna, J. A. (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 457(January), 405–412. <https://doi.org/10.1038/nature07755>
- Kamath, R. S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A. G., & Ahringer, J. (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biology*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/gb-2000-2-1-research0002>
- Katsyuba, E., & Auwerx, J. (2017). Modulating NAD + metabolism, from bench to bedside. *The EMBO Journal*, 36(18), 2670–2683. <https://doi.org/10.15252/embj.201797135>
- Kenyon, C. (2010). The genetics of ageing. *Nature*, 467(7315), 622. <https://doi.org/10.1038/nature09047>
- Kenyon, C., Jean, C., Gensch, E., Adam, R., & Ramon, T. (1993). A *C.elegans* mutant that twice as long as wild type. *Nature*, 366(6454), 461–464.
- Kourtzidis, I. A., Dolopikou, C. F., Tsiftsis, A. N., Margaritelis, N. V., Theodorou, A. A., Zervos, I. A., ... Nikolaidis, M. G. (2018). Nicotinamide riboside supplementation dysregulates redox and energy metabolism in rats: Implications for exercise performance. *Experimental Physiology*, 103(10), 1357–1366. <https://doi.org/10.1113/EP086964>
- Kourtzidis, I. A., Stoupas, A. T., Gioris, I. S., Veskoukis, A. S., Margaritelis, N. V., Tsantarliotou, M., ... Nikolaidis, M. G. (2016). The NAD⁺ precursor nicotinamide riboside decreases exercise performance in rats. *Journal of the International*

- Society of Sports Nutrition*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12970-016-0143-x>
- Labbadia, J., Briellmann, R. M., Neto, M. F., Lin, Y. F., Haynes, C. M., & Morimoto, R. I. (2017). Mitochondrial Stress Restores the Heat Shock Response and Prevents Proteostasis Collapse during Aging. *Cell Reports*, 21(6), 1481–1494. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.038>
- Lehrbach, N. J., Castro, C., Murfitt, K. J., Abreu-goodger, C. E. I., Griffin, J. L., & Miska, E. A. (2012). Post-developmental microRNA expression is required for normal physiology, and regulates aging in par. *Rna*, 2220–2235. <https://doi.org/10.1261/rna.035402.112.approaches>
- Mori, M. A., Raghavan, P., Thomou, T., Boucher, J., Robida-Stubbs, S., MacOtela, Y., ... Kahn, C. R. (2012). Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity. *Cell Metabolism*, 16(3), 336–347. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.017>
- Mori, M. A., Thomou, T., Boucher, J., Lee, K. Y., Lallukka, S., Kim, J. K., ... Kahn, C. R. (2014). Altered miRNA processing disrupts brown/white adipocyte determination and associates with lipodystrophy. *Journal of Clinical Investigation*, 124(8), 3339–3351. <https://doi.org/10.1172/JCI73468>
- Moroz, N., Carmona, J. J., Anderson, E., Hart, A. C., Sinclair, D. A., & Blackwell, T. K. (2014). Dietary restriction involves NAD⁺-dependent mechanisms and a shift toward oxidative metabolism. *Aging Cell*, 13(6), 1075–1085. <https://doi.org/10.1111/accel.12273>
- Mouchiroud, L., Houtkooper, R. H., Moullan, N., Katsyuba, E., Ryu, D., Cantó, C., ... Auwerx, J. (2013). The NAD⁺/sirtuin pathway modulates longevity through activation of mitochondrial UPR and FOXO signaling. *Cell*, 154(2), 430. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.016>
- Mouchiroud, L., Molin, L., Kasturi, P., Triba, M. N., Dumas, M. E., Wilson, M. C., ... Solari, F. (2011). Pyruvate imbalance mediates metabolic reprogramming and mimics lifespan extension by dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 10(1), 39–54. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00640.x>
- Orentreich, N., Matias, J. R., DeFelice, A., & Zimmerman, J. A. (1993). Low methionine ingestion by rats extends life span. *The Journal of Nutrition*, 123(2), 269–274.

<https://doi.org/10.1093/jn/123.2.269>

- Panowski, S. H., & Dillin, A. (2009). Signals of youth: endocrine regulation of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 20(6), 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.03.006>
- Payne, B. A. I., & Chinnery, P. F. (2015). Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1847(11), 1347–1353. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2015.05.022>
- Pinto, S., Sato, V. N., De-Souza, E. A., Ferraz, R. C., Camara, H., Pinca, A. P. F., ... Mori, M. A. (2018). Enoxacin extends lifespan of *C. elegans* by inhibiting miR-34-5p and promoting mitohormesis. *Redox Biology*, 18(June), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.06.006>
- Piper, M. D. W., & Bartke, A. (2008). Diet and Aging. *Cell Metabolism*, 8(2), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.06.012>
- Rechavi, O., Hourri-Ze'Evi, L., Anava, S., Goh, W. S. S., Kerk, S. Y., Hannon, G. J., & Hobert, O. (2014). Starvation-induced transgenerational inheritance of small RNAs in *C. elegans*. *Cell*, 158(2), 277–287. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.020>
- Reis, F. C. G., Branquinho, J. L. O., Brandão, B. B., Guerra, B. A., Silva, I. D., Frontini, A., ... Mori, M. A. (2016). Fat-specific Dicer deficiency accelerates aging and mitigates several effects of dietary restriction in mice. *Aging*, 8(6), 1201–1222. <https://doi.org/10.18632/aging.100970>
- Schmeisser, K., Mansfeld, J., Kuhlow, D., Weimer, S., Priebe, S., Heiland, I., ... Ristow, M. (2013). Role of sirtuins in lifespan regulation is linked to methylation of nicotinamide. *Nature Chemical Biology*, 9(11), 693–700. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1352>
- Schwartz, J., Passonneau, V., Johnson, G. S., & Pastan, I. (1974). The effect of growth conditions on NAD⁺ and NADH concentrations and the NAD⁺:NADH ratio in normal and transformed fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 249(13), 4138–4143.

- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*, (1999), 1–11. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>
- Testa, G., Biasi, F., Poli, G., & Chiarpotto, E. (2014). Calorie Restriction and Dietary Restriction Mimetics: A Strategy for Improving Healthy Aging and Longevity. *Current Pharmaceutical Design*. <https://doi.org/10.2174/13816128113196660699>
- Verdin, E. (2015). NAD⁺ in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science*, 350(6265), 1208–1213. <https://doi.org/10.1126/science.aac4854>
- Volovik, Y., Maman, M., Dubnikov, T., Bejerano-Sagie, M., Joyce, D., Kapernick, E. A., ... Dillin, A. (2012). Temporal requirements of heat shock factor-1 for longevity assurance. *Aging Cell*, 11(3), 491–499. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00811.x>
- WHO. (2011). Global Health and Aging. Retrieved from https://www.who.int/ageing/publications/global_health.pdf
- WHO. (2016). World report on ageing and health. Retrieved from apps.who.int/iris/bitstream/10665/186463/1/9789240694811_eng.pdf?ua=1
- Yang, W., & Hekimi, S. (2010). Two modes of mitochondrial dysfunction lead independently to lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 9(3), 433–447. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00571.x>
- Yoshino, J., Baur, J. A., & Imai, S. ichiro. (2018). NAD⁺ Intermediates: The Biology and Therapeutic Potential of NMN and NR. *Cell Metabolism*, 27(3), 513–528. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.11.002>
- Yoshino, J., & Imai, S. I. (2013). Accurate measurement of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) with high-performance liquid chromatography. *Methods in Molecular Biology*, 1077, 203–215. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-637-5_14
- Zhang, H., Ryu, D., Wu, Y., Gariani, K., Wang, X., Luan, P., ... Auwerx, J. (2016). NAD⁺ repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science*, 352(6292), 1436–1443. <https://doi.org/10.1126/science.aaf2693>
- Zhu, X. H., Lu, M., Lee, B. Y., Ugurbil, K., & Chen, W. (2015). In vivo NAD assay

reveals the intracellular NAD contents and redox state in healthy human brain and their age dependences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(9), 2876–2881. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417921112>

Zoncu, R., Efeyan, A., & Sabatini, D. M. (2011). mTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), 21–35. <https://doi.org/10.1038/nrm3025>

ANEXOS

Anexo 1 — Declaração referente à Bioética e/ou à Biossegurança



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada ***“Investigação da interação de Dicer com a via de sinalização de NAD⁺ no contexto do metabolismo e do envelhecimento em C. elegans”***, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Guilherme Tonon
Nome do(a) aluno(a): Guilherme Tonon da Silva

Assinatura: Marcelo Alves da Silva Mori
Nome do(a) orientador(a): Marcelo Alves da Silva Mori


Data: 25/06/2018

Anexo 2 — Declaração referente a Direitos Autorais**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Ribosídeo de Nicotinamida (NR), uma Molécula Doadora de NAD⁺, Falha em Ativar o Metabolismo e Retardar o Envelhecimento em Caenorhabditis elegans**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 30 de março de 2020

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Guilherme Tonon da Silva**
RG n.º 47.963.995-4

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Marcelo Alves da Silva Mori**
RG n.º 32.684.904-X