

**PONTÍFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**Análise do padrão transcricional de sirtuínas  
influenciado por *trans*-resveratrol, etanol e restrição  
calórica utilizando modelo de *zebrafish* (*Danio rerio*)**

**Aluna:** Helena Schirmer  
**Orientador:** Dr. André Arigony Souto

**Porto Alegre**

**2011**

**PONTÍFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**Análise do padrão transcricional de sirtuínas influenciado por *trans-resveratrol*, etanol e restrição calórica utilizando modelo de *zebrafish* (*Danio rerio*)**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

**Aluna:** Helena Schirmer  
**Orientadora:** Dr. André Arigony Souto

**Porto Alegre**

**2011**

**HELENA SCHIRMER**

**Análise do padrão transcricional de sirtuínas influenciado por *trans-resveratrol*, etanol e restrição calórica utilizando modelo de *zebrafish* (*Danio rerio*)**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

**Profa. Dr. Maria Martha Campos**

\_\_\_\_\_

**Profa. Dr. Vanessa Suñé Mattevi**

\_\_\_\_\_

**Profa. Dr. Regina Maria Vieira da Costa Guaragna**

\_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Uma das certezas que construí ao longo dos anos é que todo objetivo merece esforço e dedicação por parte de quem o deseja, mas também, que sozinhos dificilmente avançaremos. Nestes quatro anos tenho a consciência de que não foi diferente e muitas pessoas colaboraram para que este trabalho se concretizasse. Tiveram aqueles que estavam diretamente envolvidos no processo e merecem aqui serem lembrados e agradecidos.

Ao Professor André Arigony Souto, meu orientador, dedico este trabalho e meu mais sincero agradecimento e admiração. Um orientador que me ensinou a acreditar e viver o que se acredita. Que caminhou comigo nestes 4 anos, que não me deixou desamparada e sempre me ajudou achar respostas para as minhas dúvidas, soluções para os problemas. Que me mostrou a diferença do que realmente é conhecer o que se faz e, não simplesmente fazer. Que estimulava a pergunta e não somente a resposta. Um profissional obstinado pelo conhecimento que me ensinou muito mais do que ciência.

Agradeço também ao Professor Maurício que abriu as portas do seu laboratório permitindo a realização do trabalho. Que ajudou em cada dúvida que eventualmente surgia após um PCR e também pelas palavras de incentivo que davam forças para continuar seguindo.

Na bancada, algumas pessoas foram importantes para que este trabalho fosse concluído enquanto eu me dividia entre o doutorado e o trabalho profissional. A todos os colegas da bioquímica e do genoma que de uma forma ou de outra participaram deste trabalho recebam os meus mais sinceros agradecimentos! Mas eu não poderia deixar de agradecer três pessoas que foram essenciais na participação do que hoje eu concluo: a Talita, o Eduardo e o Denis. O trio que me recebeu no primeiro dia que fui ao laboratório, que tiveram paciência para me ensinar todas as rotinas e que me acompanharam cada um na sua forma, na sua disponibilidade e ajuda foram realmente imprescindíveis. Não tenho palavras para agradecer! Foram muitos tratamentos, extrações, PCRs, géis, conversas, perguntas e respostas, papers lidos, protocolos estudados e aplicados. E, termino esta etapa com a certeza de que vocês são muito mais que colegas, mas que durante o doutorado ganhei três amigos! Meu muito obrigado, de coração!

Aos colegas da Universidade FEEVALE que me acompanharam na graduação, no mestrado e agora no doutorado, também sou muita grata por entenderem nos momentos que



eu precisava me ausentar e por colaborarem me substituindo deixando-me tranqüila para realizar meu trabalho. Este apoio foi essencial e vocês tem participação nesta etapa!

Por último agradeço a minha família. Meu pai e minha mãe pessoas essenciais na minha vida, que são meu esteio, meu suporte. Que sempre estiveram ao meu lado com uma palavra de carinho e que me davam forças no momento em que batia o desânimo e a vontade era desistir. Tenho certeza que sempre posso contar com vocês na decisão que eu tomar. Amo vocês!

Muito obrigado a todos!

## RESUMO

Resveratrol é um polifenol de ocorrência natural amplamente estudado na prevenção de doenças associadas ao envelhecimento. Foi caracterizado por aumentar a longevidade em organismos menores e em roedores obesos, mecanismos relacionados a modulação de sirtuína 1. Desta forma, foi comparado e apresentado como um importante composto mimetizador de restrição calórica, única intervenção não genética conhecida por aumentar a longevidade. Sirtuínas compreendem uma família de enzimas  $\text{NAD}^+$  dependentes que têm como alvo proteínas histonas e não histonas, regulando uma série de eventos celulares relacionados ao metabolismo. Apesar do resveratrol ter sido apresentado por modular SIRT1, este mecanismo parece ser muito mais complexo e não está completamente elucidado. Neste estudo, nós investigamos o perfil de transcrição de SIRT1, SIRT3 e SIRT4 e genes alvos relacionados a estas enzimas, PGC1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$  e NAMPT, modulados por resveratrol, em um modelo sem injúria e estresse; e na presença de um agente estressor, neste caso o etanol e; após restrição calórica. Para o estudo, foi utilizado zebrafish adulto tipo selvagem, por ser um modelo experimental consolidado, porém pouco explorado quanto ao mecanismo de sirtuínas, do composto resveratrol e restrição calórica. Para análise transcricional foi utilizado a técnica de RT-PCR semiquantitativo. Para determinação do estado de acetilação H3 lys9 foi utilizado a técnica de Western Blotting. As expressões de mRNA foram analisadas em fígado de zebrafish após exposição a diferentes tempos e concentrações de resveratrol, etanol e, também no músculo, após restrição calórica. Em nosso modelo experimental nem o resveratrol, nem a restrição calórica modularam a expressão de SIRT; porém, nós observamos que ambas intervenções apresentaram perfil similar na transcrição de SIRT3 e SIRT4, diminuindo os níveis de mRNA no fígado. Nós sugerimos que o composto pode exercer efeitos benéficos similar a RC por modulação de outras sirtuínas que não SIRT1 e, estas devem ser melhor exploradas. Ainda, nós demonstramos que resveratrol modula a expressão de sirtuínas e outros genes analisados como *NAMPT*, em um modelo sem injúria, e esta modulação deve ser compreendida a níveis fisiológicos uma vez que o composto vem sendo utilizado como composto nutracêutico por indivíduos saudáveis. Etanol, aqui utilizado como um agente estressor, não causou dano hepático, principalmente nos animais que receberam tratamento crônico. Porém, foi possível observar que resveratrol e etanol apresentaram padrão diferente no perfil de expressão gênica e acetilação de proteína e, que a associação dos dois compostos reverteu aos níveis próximos do controle estas alterações. Estes resultados consolidam o zebrafish como modelo experimental a ser utilizado na compreensão da modulação de sirtuínas modulado por resveratrol e restrição calórica.

**Palavras-chave:** Resveratrol, Zebrafish, Restrição calórica, Sirtuínas, expressão gênica, etanol, histona 3 acetil lisina 9, Western Blotting, Mitochondria, RT-PCR, *Danio rerio*

## ABSTRACT

Resveratrol is a naturally occurrence polyphenol, widely studied in prevention and age related diseases. It was shown by increased lifespan of lower organisms and obese rodents, that its mechanism could be sirtuin 1 dependent. Thus, the compound was considered as an important mimicking calorie restriction agent, the only non-genetic intervention known to increase the lifespan. Sirtuins belong to a family of enzymes NAD<sup>+</sup>-dependent targeting histones and non-histones proteins, therefore regulating several cellular events related to metabolism. Despite the mechanism of resveratrol showed to be SIRT1-dependent, it is more complex than firstly reported and it is not yet clear. In this study, we investigated the gene expression of three sirtuins members and targets of these enzymes family, modulated by resveratrol in three different conditions: without stress or injury, with ethanol, - as a stressor compound and after caloric restriction, using adult zebrafish as a model organism. Although wild-type zebrafish is considered a consolidated experimental model, little have been explored concerning sirtuins mechanism, resveratrol modulation and caloric restriction. The mRNA expression was detected by semiquantitative RT-PCR in zebrafish liver after different time of exposure and concentrations of resveratrol, ethanol and, also in the muscle after caloric restriction. In our experimental model neither resveratrol nor caloric restriction modulated the *SIRT1* gene expression. However we saw a similar profile between SIRT3 and SIRT4 transcription, a decrease in liver mRNA levels. Under this scenario we suggested that the resveratrol can exert health benefits similar to that presented by caloric restriction, modulating other sirtuins, rather than SIRT1, opening another perspective that must be exploited, since, in zebrafish, resveratrol altered the sirtuins and other genes (such as NAMPT) expression. This modulation should be better understood at physiological levels once resveratrol have been used by health subjects as a nutraceutical compound. Even though, here ethanol was used as stressor compound, we did not observed hepatic injury, especially in the animals subjected to chronic exposition. Nevertheless, was possible detected that resveratrol and ethanol showed different profiles of gene expression and protein acetylation but, when the compounds were administered together levels were reverted close to the control group. The results here described helps to consolidate the zebrafish as an experimental model for understanding the sirtuin modulation by resveratrol and caloric restriction.

**Keywords:** Resveratrol, Zebrafish, Calorie restriction, Sirtuins, gene expression, ethanol, histone 3 acetyl-lisine 9, Western Blotting, Mitochondria, RT-PCR, *Danio rerio*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estruturas dos derivados de resveratrol.....	17
<b>Figura 2.</b> Processos celulares ativados pela proteína sirtuína.....	30
<b>Figura 3.</b> Regulação da sirtuína.....	32
<b>Figura 4.</b> Perfil de transcrição gênica de <i>SIRT1</i> após tratamentos agudo e crônico no fígado de zebrafish.....	132
<b>Figura 5.</b> Perfil de transcrição gênica de <i>SIRT3</i> após tratamentos agudo e crônico no fígado de zebrafish.....	133
<b>Figura 6.</b> Perfil de transcrição gênica de <i>SIRT4</i> após tratamentos agudo e crônico no fígado de zebrafish.....	134
<b>Figura 7.</b> Perfil de transcrição gênica de <i>PGC1<math>\alpha</math></i> após tratamentos agudo e crônico no fígado de zebrafish.....	135
<b>Figura 8.</b> Perfil de transcrição gênica de <i>NAMPT</i> após tratamentos agudo e crônico no fígado de zebrafish.....	137
<b>Figura 9.</b> Análise histológica de fígado de zebrafish .....	138
<b>Figura 10.</b> Análise de acetilação de Histona 3 (lys9) após tratamento agudo e tratamento crônico.....	140

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**AceCS2 – acetilcoenzima A sintetase 2**

**ADP – adenosina difosfato**

**AMPK – proteína quinase AMP-ativada**

**ATP – adenosina trifosfato**

**BRCA1 – *breast cancer* 1**

**COX 1 – ciclooxigenase 1**

**COX 2 – ciclooxigenase 2**

**Cu – cobre**

**DNA – ácido dexossirribonucleico**

**DNAr - ácido dexossirribonucleico ribossomal**

**FOXO - *forkhead box***

**GDH – glutamato dehidrogenase**

**H3 – histona 3**

**H3AcK9 – histona 3 acetil-lisina 9**

**H4 – histona 4**

**HDAC – histonas deacetilases**

**HepG2 – células hepatoma celular**

**HIV – vírus imunodeficiência humana**

**Idh2 – isocitrato dehidrogenase 2**

**IL-2 – interleucina 2**

**LCAD – acetilCoA dehidrogenase de cadeias longas**

**LXR $\alpha$  – *liver X receptor  $\alpha$***

**MAR – *mating type regulator***

**MAR1 – *mating type regulator 1***

**mRNA** – ácido ribonucleico mensageiro

**NAD<sup>+</sup>** - nicotina adenina dinucleotídeo

**NADH** – nicotina adenina dinucleotídeo oxidado

**NADPH** – nicotina adenina dinucleosídeo fosfato oxidado

**NAMPT** – nicotinamida fosforibosiltransferase

**NCoR** – receptor nuclear co-repressor

**p53** – proteína 53

**PGC1 $\alpha$**  – *peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha*

**PPAR $\gamma$**  – *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

**RC** – restrição calórica

**RNA** – ácido ribonucleico

**ROS** – espécies reativas de oxigênio

**RT PCR** – reação em cadeia da polimerase – transcrição reversa

**SIRT** – sirtuína

**Tat** – *transactivation active region*

**TCA**- ciclo do ácido tricarboxílico

**UCP** – *unconpling protein*

**UV** – ultravioleta

**VDAC** – canal de ânion voltagem dependente

**WB** – western blotting

**Zn** –zinco

## INDÍCE

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
LISTA DE ABREVIATURAS .....	9
CAPÍTULO 1.....	13
INTRODUÇÃO .....	14
REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
RESVERATROL.....	15
RESTRICÇÃO CALÓRICA .....	22
ETANOL NO DANO HEPÁTICO E ACETILAÇÃO DE HISTONAS .....	25
SIRTUÍNAS .....	27
A DESCOBERTA DAS SIRTUÍNAS .....	27
O PAPEL DA SIRTUÍNA 1 .....	29
O PAPEL DA SIRTUÍNA 3 .....	33
O PAPEL DA SIRTUÍNA 4.....	36
ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL .....	37
OBJETIVOS .....	40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
CAPÍTULO 2.....	41
CAPÍTULO 3.....	61

Modulation of <i>SIRT1</i> , <i>SIRT3</i> , <i>SIRT4</i> , <i>PGC1<math>\alpha</math></i> and <i>PPAR<math>\gamma</math></i> in Wild-type Adult Zebrafish Subjected to Calorie Restriction.....	62
CAPÍTULO 4.....	79
Manuscrito em preparação: Efeito de resveratrol e etanol na transcrição de <i>Sirtuínas</i> , <i>PGC1<math>\alpha</math></i> e <i>NAMPT</i> .....	79
MATERIAIS E MÉTODOS .....	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	91
ANEXO I .....	102
Patente Internacional: <i>Method and kit for determining sirtuin modulating agents, sirtuin modulating procedure, sirtuin modulating compounds and compositions including the same</i> .....	102
ANEXO II.....	151
ANEXO III.....	167



## **CAPÍTULO 1**

## INTRODUÇÃO

A identificação de moléculas que possam prevenir a ocorrência de doenças associadas à idade é uma importante questão para pesquisa médica contemporânea (Valenzano and Cellerino 2006; Harikumar and Aggarwal 2008). Dentre várias moléculas testadas, o resveratrol foi à única que consistentemente aumentou a longevidade de diferentes espécies de laboratório (Valenzano and Cellerino 2006); porém, este evento não foi observado em mamíferos. Desta forma, este composto natural vem sendo amplamente estudado em relação ao seu potencial terapêutico na prevenção ou retardo de doenças associadas ao avanço da idade e, em relação ao seu mecanismo de ação (Howitz, Bitterman et al. 2003; Baur, Pearson et al. 2006).

Por ter seu mecanismo de ação relacionado como um potente ativador de sirtuínas (Howitz, Bitterman et al. 2003), especialmente SIRT1, e desta forma exercer efeitos benéficos, este composto foi considerado como um potente mimetizador de restrição calórica (Wood, Rogina et al. 2004). Porém, atualmente, observa-se que a atuação de resveratrol é muito mais complexa do que primeiramente reportado e, seu mecanismo ainda parece não ser tão simples como primeiramente sugerido. Portanto, ainda não são bem compreendidos os alvos de ação do composto, principalmente quando se compara diferentes modelos e diferentes dosagens.

Restrição calórica é a única intervenção não genética demonstrada por aumentar a longevidade em diferentes modelos experimentais desde leveduras a primatas. Refere-se a uma diminuição da ingestão alimentar, sem causar desnutrição, mas alterações na adaptação fisiológica. Teve seu mecanismo associado à ativação de *Sir2* em leveduras e SIRT1 em outros modelos e, dependente de  $\text{NAD}^+$ .

As sirtuínas representam uma família de enzimas conservadas  $\text{NAD}^+$  dependente que afetam uma série de processos fisiológicos (Haigis, Mostoslavsky et al. 2006), incluindo regulação da expectativa de vida, regulação da atividade metabólica e enzimática, resposta celular ao stress, neurodegeneração, reparo de DNA, recombinação de DNAr, apoptose (Sauve, Wolberger et al. 2006) e controle de proliferação celular (Yamamoto, Schoonjans et al. 2007).

Considerando a série de processos regulados por sirtuínas, pequenas moléculas já foram identificadas como inibidores ou ativadores destas enzimas (Sauve, Wolberger et al. 2006) e o desenvolvimento desses reguladores positivos e negativos podem ajudar no esclarecimento da ação destas enzimas em diferentes doenças ou inclusive desenvolver o atual promissor papel terapêutico destas proteínas.

As doenças relacionadas ao envelhecimento vêm se destacando nesse cenário. Diferentes autores sugerem que a modulação das sirtuínas seja no futuro, um possível caminho para aliviar os efeitos e complicações do envelhecimento (Michan e Sinclair, 2007; Westphal *et al.*, 2007.; Yamamoto *et al.*, 2007; Gan *et al.*, 2008; Milne *et al.*, 2008.; Outeiro *et al.*, 2008) como a diabetes, o câncer, as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas.

Vários estudos vêm reportando a modulação de sirtuínas em diferentes modelos variando de células, leveduras a roedores (Howitz *et al.*, 2003; Baur *et al.*, 2006; Lagouge *et al.*, 2006; Nedachi *et al.*, 2008). Em modelo de zebrafish encontra-se apenas um estudo relacionando a expressão desta enzima (Potente *et al.*, 2007), sem o envolvimento da molécula de resveratrol. Ainda, a maioria dos estudos relacionando o composto na modulação destas enzimas utiliza um modelo estressado ou de injúria, e pouco se refere à modulação em tipo selvagem.

Desta forma, o presente trabalho procurou demonstrar a atuação do resveratrol em nível transcricional sobre três diferentes sirtuínas e genes alvo em um modelo selvagem de zebrafish, além de comparar se este composto apresenta mecanismo transcricional semelhante à restrição calórica e sua interação com etanol, utilizado como agente estressor.

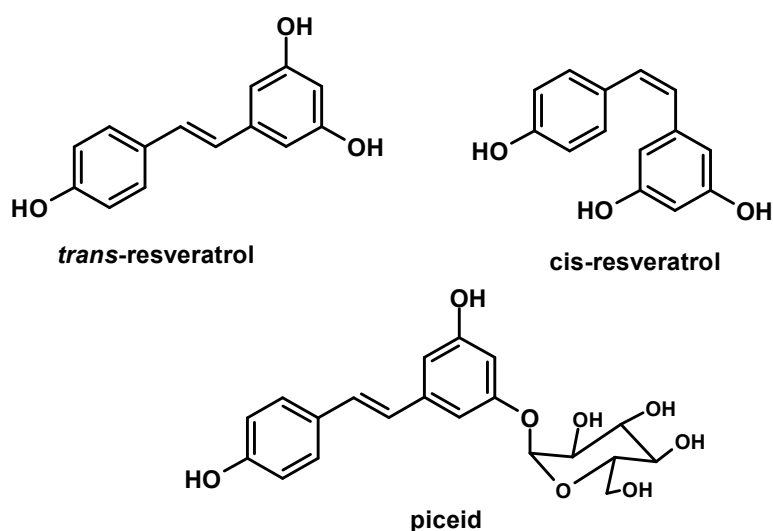
## **REFERENCIAL TEÓRICO**

### **RESVERATROL**

Resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno) (Figura 1), é uma fitoalexina pertencente à classe dos estilbenos e, produzido por uma ampla variedade de plantas (Jang *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2004). Nas plantas, este composto é naturalmente produzido em

reposta a infecções, principalmente de fungos, a estresse ambiental como clima, ozônio, luz UV, entre outras situações (Harikumar and Aggarwal 2008).

O resveratrol tem sido encontrado em pelo menos 72 espécies, sendo que muitas delas são componentes da dieta humana, como a uva e, em grãos como o amendoim. A pele fresca da uva contém aproximadamente 50 a 100 µg de resveratrol por grama e, a concentração no vinho tinto varia de 1,5 a 3 mg/L (Jang, Cai et al. 1997). Porém, tem-se isolado resveratrol em outras fontes naturais, algumas vezes até em concentrações maiores que na uva, como por exemplo, na raiz seca de Rhubarb (*Rheum rhaponticum*) (3,9 mg/g), e *Polygonum cuspidatum* (0,524 mg/g), uma planta tradicionalmente utilizada na medicina Chinesa e Japonesa (Baur and Sinclair 2006).



**Figura 1.** Estruturas dos derivados de resveratrol

O interesse pela bioatividade da molécula teve maior expressão na comunidade científica após pesquisa que demonstrou o potencial de inibição deste composto em eventos celulares na iniciação, promoção e progressão tumoral (Jang, Cai et al. 1997). Desde então, vem sendo estudado o amplo espectro de ação do resveratrol como antioxidante, antiinflamatório, antiviral, cardioprotetor (Lin, Lin et al. 2008), neuroprotetor, quimiopreventivo, na proteção contra infecções e isquemia, redução da obesidade e doenças metabólicas associadas ao envelhecimento quanto terapia e prevenção (Baur and Sinclair 2006).

O estudo de Jang e colaboradores (1997) demonstrou que o resveratrol, *in vitro*, inibiu a cicloxigenase 1, que gera prostanglandinas e, esta garante o crescimento da célula tumoral e inibição de resposta imune associada à sobrevivência celular (Jang, Cai et al. 1997).

Por outro lado, uma pesquisa recente mostrou que em ratos diabéticos, o resveratrol não alterou a expressão gênica, nem os níveis de proteínas de COX 1 e COX 2. Apresentando a complexidade de ação que é associada a este composto. Este estudo sugere que resveratrol em diferentes doses, em diferentes tempos de exposição pode atuar em diferentes mecanismos a inflamação (Yar, Menevse et al. 2010).

Outro fenômeno que despertou os estudos envolvendo a molécula está associado ao Paradoxo Francês. Este fenômeno se refere a certas populações da França, que embora desfrutem de dieta rica em gordura saturada, apresentam baixa incidência de doenças cardiovasculares. A baixa prevalência de doenças cardíacas nesta população foi creditada ao consumo regular de vinho tinto durante as refeições, rico em resveratrol (Wu, Wang et al. 2001).

Vinho e derivados de uva têm sido apresentados por diminuir a agregação plaquetária, promover vasodilatação, suprimir arteroesclerose, reduzir a peroxidação de lipídios e, melhorar a concentração sérica de colesterol e triglicerídeos (Renaud and de Lorgeril 1992).

Sabe-se que a ingestão moderada de vinho tinto, apesar de ser uma bebida alcoólica, exerce efeito protetor e benéfico à saúde. Porém, o consumo crônico de etanol conduz ao desenvolvimento de importantes alterações hepáticas. O consumo excessivo de álcool gera espécies reativas de oxigênio e intermediários altamente reativos que são tóxicos, interferindo na cadeia respiratória e DNA mitocondrial (Demeilliers, Maisonneuve et al. 2002; Cahill, Hershman et al. 2005). Este evento leva à disfunção mitocondrial e, conseqüentemente, lesão hepática (Begrliche, Igoudjil et al. 2006). Entretanto, as alterações metabólicas causadas pela ingestão de álcool não se limitam somente à mitocôndria, uma vez que este pode ativar fatores de transcrição nuclear envolvidos na regulação da expressão gênica hepática como no caso da oxidação de ácidos graxos, resposta inflamatória (Nagy 2004) e metabolismo de gliconeogênese (Oliva, French et al. 2008).

Em ratos, foi demonstrado que a administração crônica de etanol produz toxicidade, perda de peso, diminuição da ingestão de alimentos, bem como, induz a

hepatotoxicidade. Porém, quando na exposição crônica ao etanol e dieta suplementada com resveratrol estes efeitos adversos foram minimizados, uma vez que o resveratrol inibiu a peroxidação de lipídios e melhorou a atividade de enzimas antioxidantes (Kasdallah-Grissa, Mornagui et al. 2007).

É bem estabelecido que, em parte, os efeitos benéficos observados após administração de resveratrol são devidos ao seu potencial antioxidante. Em reperfusão hepática isquêmica em ratos, o pré-tratamento com baixas doses de resveratrol preservou a defesa antioxidante do fígado com aumento significativo da atividade de glutathione redutase, Cu/Zn-superóxido dismutase e catalase. Ao contrário, quando administrada uma alta dose do composto, foi observada ação pró-oxidante, agravando o dano hepático (Hassan-Khabbar, Cottart et al. 2008).

Na tentativa de compreender o mecanismo de ação molecular do resveratrol e seus efeitos benéficos, foi demonstrado, em 2003, que este composto era um importante ativador de sirtuínas (Howitz, Bitterman et al. 2003), sendo relacionado como mimetizador de restrição calórica. RC é a única intervenção não genética, conhecida desde a década de 30, por aumentar a longevidade de diferentes espécies (Baur and Sinclair 2006).

Desde então, vários estudos demonstraram o potencial do resveratrol no aumento da longevidade e prevenção ou retardo de doenças associadas à idade, alguns relacionando com a SIRT1 (Howitz, Bitterman et al. 2003; Baur, Pearson et al. 2006; Lagouge, Argmann et al. 2006; Barger, Kayo et al. 2008). Foi demonstrado que o resveratrol aumentou a longevidade de leveduras (Howitz, Bitterman et al. 2003), *C.elegans* e *D.melanogaster* (Wood, Rogina et al. 2004), e em *N.furzeri* (Valenzano, Terzibasi et al. 2006); porém, neste último modelo, não foi relacionado o mecanismo de ação. Este efeito de aumento de longevidade ainda não foi demonstrado em mamíferos *naïve*, mas apenas em modelos de estresse ou dano.

Dois importantes estudos farmacológicos demonstraram que a administração de resveratrol foi capaz de melhorar efeitos gerados por uma dieta altamente calórica (Baur, Pearson et al. 2006) e melhorar a capacidade muscular (Lagouge, Argmann et al. 2006). Efeitos estes que foram associados à modulação da atividade de SIRT1, e à ativação ou à inibição de alvos moleculares, como PGC1 $\alpha$  e PPAR $\gamma$ .

A regulação metabólica de lipídios e glicose, bem como a manutenção de energia também estão relacionadas à administração de resveratrol, sendo este composto

estudado como uma importante ferramenta terapêutica contra obesidade e outras doenças metabólicas associadas à idade, como diabetes mellitus tipo II. Baur e colaboradores (2006) demonstraram uma diminuição dos efeitos maléficos gerados por uma dieta altamente calórica, prevenindo doenças associadas à obesidade e prolongando o tempo de vida, em animais que receberam resveratrol. Ainda, foi observado que camundongos tratados com uma dieta altamente calórica e resveratrol apresentaram a mesma resposta de ratos com dieta padrão e sem resveratrol. Os camundongos tratados com essa molécula apresentaram aumento no tempo de sobrevivência, aumento da sensibilidade à insulina, diminuição de alterações em órgãos, como fígado e aumento no número de mitocôndrias. Sendo assim, eles concluíram que o resveratrol mimetiza o efeito benéfico da restrição calórica, sem a necessidade de diminuir a ingestão de alimentos.

As mitocôndrias são uma importante fonte energética da célula que convertem nutrientes em energia através da respiração celular (Wallace 2005). A função mitocondrial comprometida está associada a numerosas doenças de caráter metabólico e do sistema cardiovascular, com o avanço da idade. Em humanos, a resistência à insulina no músculo esquelético está associada com a diminuição da expressão de genes que controlam a atividade mitocondrial (Petersen, Befroy et al. 2003).

Em relação ao aumento do número de mitocôndrias e melhora da função, em outro importante estudo farmacológico foi demonstrado, em camundongos tratados com resveratrol, aumento da capacidade aeróbica através da indução de genes de fosforilação oxidativa e biogênese mitocondrial, aumento da sensibilidade à insulina e resistência à obesidade induzida pela dieta (Lagouge, Argmann et al. 2006).

Por outro lado, alguns estudos já demonstraram resultados controversos, aos achados anteriormente citados, quanto à ativação de SIRT1 (Kaeberlein, McDonagh et al. 2005; Barger, Kayo et al. 2008; Behr, Wu et al. 2009; Pacholec, Bleasdale et al. 2010). Do contrário que anteriormente citado, o resveratrol não aumentou a longevidade de várias cepas de leveduras. Ademais, foi demonstrado que resveratrol somente ativou SIRT1 *in vitro*, quando testado em substrato acetilado ligado a um núcleo fluorescente (Kaeberlein, McDonagh et al. 2005). Em camundongos que receberam baixas doses de resveratrol, concluiu-se que o composto mimetizou parcialmente a restrição calórica e esta foi independente de SIRT1 (Barger, Kayo et al. 2008), sugerindo que o mecanismo

pode ser diferente *in vivo*, e apresentar maior complexidade por estar relacionado com a dose administrada.

Dois estudos recentes enfatizaram a problemática de ativação de SIRT1 por resveratrol. O primeiro, utilizando dois conhecidos alvos acetilados de SIRT1, PGC1 $\alpha$  e p53, demonstrou que o aumento na atividade catalítica de SIRT1, mediada por resveratrol é observada somente na presença do peptídeo marcado com fluoróforo (*Fluor-de-lys*). O estudo ainda sugere que o composto pode modular, indiretamente, a atividade de SIRT1 (Beher, Wu et al. 2009).

Pacholec e colaboradores (2010) utilizaram peptídeos nativos como alvos de SIRT1, e demonstraram que nem o resveratrol, nem o SIRT1720, um ativador sintético de sirtuínas aumentaram a atividade da enzima. Ainda, os autores observaram que o SIRT1720 não diminuiu os níveis de glicose plasmática, nem melhorou atividade mitocondrial, como reportado em outra publicação (Milne, Lambert et al. 2007). Ainda neste estudo, foi reportado que resveratrol e os demais sintéticos derivados de resveratrol, são altamente promíscuos ligando-se a mais de 100 alvos entre: transportadores, receptores, canais iônicos e enzimas, não podendo ser uma ferramenta farmacológica para estudar vias de SIRT1.

Apesar de estar estabelecido que resveratrol exerce efeitos benéficos tanto em humanos como em outros organismos, algumas questões referente ao composto e seu mecanismo não estão bem estabelecidas. Entre estas: (1) qual é o mecanismo de ação deste composto (2) qual o efeito do composto em diferentes dosagens utilizadas.

Uma revisão recente discutiu o papel do resveratrol na quimioprevenção demonstrando que em baixas doses o resveratrol tem função anti-apoptótica e, em altas dosagens ações pró-apoptóticas. Estas duas funções tendem a indicar que os efeitos gerados por resveratrol apresentam dose-dependência. Baixas doses de resveratrol podem ser benéficas para proteção a saúde, enquanto que altas doses podem ser maléficas para a saúde, porém necessárias para algumas condições patológicas como a destruição de células cancerosas (Mukherjee, Dudley et al. 2010).

Outra problemática associada ao resveratrol é sua pobre biodisponibilidade e rápida metabolização quando administrado oralmente, o que justifica, em alguns casos, a ausência de efeitos muitas vezes observada *in vivo* (Walle 2007). Essa baixa biodisponibilidade deve-se ao fato que o composto é rapidamente metabolizado e, conjugado em ácido glucorônico e sulfato no fígado e intestino.



Em ratos com indução de lesões pré-neoplásicas no cólon, após administração de 60 mg/kg durante 49 dias, foram detectadas pequenas quantidades de *trans*-resveratrol e grandes quantidades do metabólito dihidroresveratrol e seu conjugado. Estes estudos apresentam uma nova visão em relação ao potencial terapêutico do resveratrol e seus metabólitos (Alfaras, Juan et al. 2010).

O resveratrol vem sendo bastante estudado em diferentes modelos de doença ou modelos expostos a uma situação de estresse (Trincheri, Nicotra et al. 2007; Hung, Chen et al. 2010; Szkudelska and Szkudelski 2010; Ndiaye, Philippe et al. 2011). Porém, o composto também vem sendo utilizado como complementação nutracutiva e, poucos estudos têm demonstrado o mecanismo molecular em modelos sem dano ou estresse, principalmente na modulação de SIRT6s.

Para estudos de toxicidade, foram administradas em ratos, 3 doses do composto: 300, 1000 e 3000 mg/kg/dia, durante 4 semanas. A maioria dos efeitos adversos observados foi nos ratos que receberam a maior dose. Dentre os efeitos observados destacou-se perda de peso e reduzido consumo de alimentos, e níveis elevados de marcadores de função renal e hepática. Foi observada também alteração em parâmetros hematológicos, além de significantes lesões renais, incluindo aumento na severidade de nefropatia. Apesar das altas doses utilizadas, após 1 hora de administração a concentração plasmática de resveratrol foi relativamente baixa (Crowell, Korytko et al. 2004).

Em um estudo pré-clínico de fase I, com voluntários saudáveis, uma única dose de resveratrol foi utilizada, em 4 diferentes concentrações (0,5, 1, 2,5 e 5 g). O consumo deste polifenol não causou sérios efeitos adversos em voluntários e a concentração plasmática máxima de resveratrol foi detectada 1.5 h após a administração da maior dose, sendo observada alta variabilidade interindividual. Quando determinados no plasma e urina, a detecção de metabólitos foi maior que do composto *trans*-resveratrol (Boocock, Faust et al. 2007).

Almeida e colaboradores (2009), diferentemente do que citado anteriormente, realizaram um ensaio randomizado duplo-cego em indivíduos que receberam múltiplas doses de resveratrol. As doses administradas foram de 25, 50, 100 ou 150 mg, seis vezes ao dia, totalizando 13 doses. Administração repetida do composto foi bem tolerada; porém, baixas concentrações plasmáticas de *trans*-resveratrol foram detectadas, apesar das altas doses administradas em um curto período de tempo. A biodisponibilidade foi

observada por ser maior no período da manhã, antes da refeição. Também foi observada alta variabilidade interindividual na concentração plasmática (Almeida, Vaz-da-Silva et al. 2009).

Quando comparada a biodisponibilidade de resveratrol entre sujeitos jovens e idosos, concluiu-se que o composto foi bem tolerado pelos dois grupos. A absorção do composto não foi relacionada a idade nem gênero. Assim como nos demais, foram detectados baixos níveis plasmáticos, mesmo após a administração sucessiva de 20 mg do composto (Nunes, Almeida et al. 2009).

O mecanismo de ação do *trans*-resveratrol, ainda não é bem compreendido apesar de serem demonstrados efeitos benéficos associados a sua administração. Além disso, outra importante problemática está relacionada à dosagem, rápida absorção e baixa disponibilidade, podendo este composto ser utilizado como ferramenta terapêutica *in vivo*. Ainda, a maioria dos estudos vêm demonstrado o potencial desta molécula em modelos de doença e pouco se sabe sobre os efeitos, principalmente na modulação de sirtuínas em modelos experimentais sem estimulação.

## **RESTRIÇÃO CALÓRICA**

Restrição calórica caracteriza-se por uma intervenção na dieta baseada em uma diminuição calórica, de 70 a 60% da alimentação de que animais comeriam *ad libitum*, mantendo uma nutrição apropriada. Este evento foi reportado pela primeira vez na década de 30, em roedores (McCay, Crowell et al. 1935) e, é a única condição, não genética, comprovada que consistentemente diminui o risco de doenças metabólicas associadas à idade e aumenta o tempo de vida (Guarente and Picard 2005; Redman, Martin et al. 2008). Além do modelo animal anteriormente citado, observações similares têm sido relatados em uma ampla variedade de espécies, incluindo leveduras, vermes, *Drosophila*, peixes (Redman, Martin et al. 2008) e, também em macacos (Colman, Anderson et al. 2009).

Ao nível fisiológico, os efeitos da restrição calórica são muito bem caracterizados. Iniciam com uma fase aguda, período de imposição da dieta, seguida por um período adaptativo, alcançando um estado fisiológico alterado e estável (Guarente and Picard 2005). Diminuição da temperatura corporal, dos níveis sanguíneos de glicose

e insulina e, redução do peso e da gordura corporal, caracterizam as principais alterações (Koubova and Guarente 2003).

O regime de restrição calórica retarda uma ampla variedade de doenças em diferentes modelos animais como, por exemplo, neoplasias, doenças auto-imunes e diabetes (Fernandes, Yunis et al. 1976; Fernandes and Good 1984; Kubo, Johnson et al. 1984; Engelman, Day et al. 1990). Este evento também reduz a perda neuronal associada à idade na maioria dos modelos de desordens neurodegenerativas em camundongo, como Parkinson (Duan and Mattson 1999). O regime de restrição calórica também previne declínio psicomotor associado à idade e, melhora a plasticidade e habilidade de auto-reparo das células neuronais.

Apesar de serem conhecidos há muito tempo os efeitos benéficos da restrição calórica pouco se sabe sobre os seus mecanismos de ação e seus alvos moleculares. Observa-se uma significativa mudança no perfil de expressão gênica em camundongos expostos a um regime de restrição calórica quando comparados ao controle, através da técnica de microarranjo (Barger, Kayo et al. 2008; Barger, Kayo et al. 2008).

Em 2000, foi sugerido que RC era um mecanismo regulável e dependente da atividade do gene *SIR2*, em leveduras (Lin, Defossez et al. 2000). Neste mesmo estudo, foi demonstrado que com a deleção do gene *SIR2*, o efeito na extensão do tempo de vida da levedura, quando em RC, era bloqueado. Ainda, foi determinado que este efeito sobre o aumento da atividade enzimática de *SIR2* era dependente do co-substrato  $\text{NAD}^+$  (Imai, Armstrong et al. 2000). Sendo a forma reduzida, NADH, um inibidor competitivo de sirtuína, foi sugerido que um aumento na razão  $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ , geraria uma alteração no metabolismo oxidativo, que poderia aumentar a atividade de SIRT e, subsequentemente, aumentar a longevidade em leveduras (Lin, Ford et al. 2004).

Em modelos de mamíferos a regulação é um pouco mais complexa; porém, também tem sido associada a genes relacionados ao *SIR2* de leveduras, nestes organismos denominados de sirtuínas. Estudos demonstraram que os níveis de SIRT1 estão aumentados em roedores e tecidos humanos em resposta a RC (Cohen, Miller et al. 2004; Nisoli, Tonello et al. 2005; Civitarese, Carling et al. 2007), aumento este que acontece devido às mudanças no metabolismo e tolerância ao estresse, como resultado da dieta.

Posteriormente, foi demonstrado em camundongos, que o mecanismo de RC associado à regulação de SIRT1 não era tão simples como primeiramente reportado.

Chen *et al.* (2008) analisaram os níveis de proteínas em diferentes tecidos de ratos *ad libitum* ou expostos a RC. Neste estudo, concluiu-se que a regulação de SIRT1 por RC é tecido específico. Observou-se diminuição da expressão no fígado e aumento no tecido adiposo branco e músculo, contrariando outros achados (Cohen, Miller et al. 2004). Uma vez que a expressão de SIRT1 é regulada por  $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ , este estudo também demonstrou que a expressão da enzima foi diretamente proporcional à razão destes cofatores, que estava diminuída no fígado e aumentada nos outros tecidos, anteriormente citados.

Uma revisão recente levantou a problemática de que o mecanismo molecular de RC é bem mais complexo do que primeiramente reportado e associado à modulação de *SIR2*, ou SIRT1 em mamíferos. Também não é bem compreendido e estabelecido o papel do inibidor nicotinamida, que pode ter importante função na regulação da atividade enzimática de sirtuínas, melhor, que a concentração de  $\text{NAD}^+:\text{NADH}$  (Baur 2010).

Recentemente outra sirtuína mamífera vem associada ao mecanismo de ação de RC. Ativação de sirtuína 3, *in vitro*, é necessária para manter a sobrevivência celular regulando NAMPT,  $\text{NAD}^+$  e NADH, após RC (Yang, Yang et al. 2007). E, recentemente, demonstrou-se que um aumento na atividade de sirtuína 3 diminui a perda auditiva em ratos submetidos a RC, uma das principais manifestações observadas com o avanço da idade (Sebastian and Mostoslavsky 2010).

Apesar de conhecidos os efeitos benéficos de RC, esta é uma intervenção difícil de ser seguida e compostos capazes de mimetizar estes efeitos vem sendo estudados. Em um *screening* de 20.000 compostos, o resveratrol foi demonstrado como sendo o mais potente ativador de SIRT1 e, por este mecanismo, foi comparado como mimetizador de RC (Howitz, Bitterman et al. 2003).

Em leveduras, este composto mimetizou a RC pela ativação de *SIR2*, aumentando a estabilidade do DNA e prolongando em até 70% o tempo de vida. Como citado anteriormente, Baur *et al.* (2006) também observaram aumento da sobrevivência em ratos tratados com resveratrol e expostos a uma dieta hipercalórica, sendo este efeito atribuído a um aumento da atividade de SIRT1.

Barger *et al.* (2008) encontraram resultados controversos aos acima citados. Neste estudo, os autores não observaram aumento da expressão de sirtuína 1 ou da atividade da enzima, em camundongos tratados com baixas doses de resveratrol.

Compararam também perfil de expressão gênica de animais expostos a RC e outros expostos ao resveratrol. Foi possível concluir que resveratrol mimetiza vários componentes do perfil transcricional de RC em todos tecidos analisados, músculo, cérebro e coração. Da mesma forma, Pearson e colaboradores (2008) observaram que resveratrol em camundongos apresenta uma série de efeitos benéficos similares aos da RC, porém o composto não é capaz de aumentar a longevidade.

### **ETANOL NO DANO HEPÁTICO E ACETILAÇÃO DE HISTONAS**

O etanol é uma das mais notórias hepatotoxinas conhecidas, causando diversos danos aos hepatócitos. Apesar dos mecanismos pelos quais etanol causa dano hepático estarem bem descritos, alguns fatores ainda necessitam serem elucidados. Por exemplo, o risco, a severidade e o prognóstico da doença hepática induzido por etanol depende além do tempo e quantidade de exposição ao composto, de interações multifatoriais. A manifestação patológica inicial observada é esteatose hepática causada pelo acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos. Este é um processo benigno, uma vez que é reversível se o estímulo for removido (Lieber, Leo et al. 2008). A progressão para esteatohepatite alcoólica representa o passo chave para o desenvolvimento de doença alcoólica hepática. A exposição ao álcool conduz à ativação de células fibrogênicas e deposição de colágeno, como também ativa citocinas pró-inflamatórias e apoptose (Malhi and Gores 2008). O fenômeno de indução progressiva de fibrose, associado às demais alterações hepáticas, pode resultar em falência hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular (Lieber, Leo et al. 2008).

Evidências experimentais e clínicas têm contribuído para a compreensão do processo patofisiológico causado pelo consumo de etanol. Um processo chave está associado ao aumento do estresse oxidativo gerado pelo consumo excessivo desta substância (Castilla, Gonzalez et al. 2004; Cahill, Hershman et al. 2005). O metabolismo do etanol conduz a uma formação excessiva de ROS, causando um desequilíbrio e dano no sistema antioxidante celular (Navasumrit, Ward et al. 2000; Ozaras, Tahan et al. 2003).

Outra evidência observada após exposição ao etanol e que afeta o fígado e alguns outros órgãos é o aumento da expressão gênica (Park, Lim et al. 2005). Este aumento transcricional, em cultura de hepatócitos, é relacionado à acetilação aumentada de histona 3 no resíduo de lisina 9 (H3-AcK9). *In vivo*, após exposição aguda ao etanol, este mesmo evento foi observado e a acetilação de H3-AcK9 foi demonstrada como sendo dose e tempo dependente. Ainda, foi observado um aumento na atividade de histonas acetiltransferases (Park, Lim et al. 2005). Em outro estudo, o aumento na acetilação de H3-AcK9 foi observado em maior quantidade após 12 horas de exposição ao etanol. Evento este também observado em outros órgãos, além do fígado (Kim and Shukla 2006).

O estado de acetilação de histonas contribui para a formação de um ambiente transcricionalmente competente através da abertura da cromatina e acesso aos fatores de transcrição à molécula de DNA. Ao contrário, a desacetilação contribui para o envelhecimento da cromatina e repressão transcricional (Cheung, Briggs et al. 2000). Este processo de acetilação de histonas é regulado por um balanço entre a atividade de histonas acetiltransferases e histona desacetilases como, por exemplo, sirtuínas, responsáveis pela repressão transcricional (de Ruijter, van Gennip et al. 2003).

Neste contexto, o resveratrol pode ser relacionado como um importante composto hepatoprotetor frente à toxicidade causada pela exposição ao etanol. O polifenol foi capaz de prevenir toxicidade causada por exposição crônica ao resveratrol através da inibição da peroxidação lipídica e melhora da atividade de enzimas antioxidantes (Kasdallah-Grissa, Mornagui et al. 2007). O composto também aumentou conteúdo de glutathiona hepática, além de inibir a transcrição de NF- $\kappa$ B que induz a cascata inflamatória e a geração de citocinas pró-inflamatórias (Tsai, Lin-Shiau et al. 1999; Wadsworth and Koop 1999; Baur and Sinclair 2006). Além disso, o resveratrol diminuiu os níveis de acetilação de H3, em células MRC5 (Giovannelli, Pitozzi et al. 2011).

Uma hipótese relacionada ao efeito hepatoprotetor do resveratrol poderia estar associada à família de enzima sirtuínas. Estas, são importante reguladoras do estado de acetilação de proteínas histonas (Imai, Armstrong et al. 2000) e não-histonas (Vaziri,

Dessain et al. 2001), regulando transcrição e a ativação de genes relacionados ao metabolismo celular.

Dois estudos já demonstraram que o etanol, por modular sirtuínas, regula também a expressão de genes-alvo em fígado de roedores, como PGC1 $\alpha$  (Lieber, Leo et al. 2008; Oliva, French et al. 2008). Em um dos estudos, foi observado que esta modulação causada por etanol foi revertida por resveratrol e outros compostos (Oliva, French et al. 2008), o que sugere que o resveratrol pode reverter efeitos gerados pelo consumo de etanol por modular PGC1 $\alpha$ .

## SIRTUÍNAS

### *A DESCOBERTA DAS SIRTUÍNAS*

Primeiramente, o gene da *SIR2* da levedura *S. cerevisiae* foi identificado e descrito por Klar *et al.* (1979) como *MAR1* (*mating type regulator 1*) que influenciava o controle de silenciamento transcricional *locus* específico. Alguns anos depois, outros quatro genes foram descritos relacionados a este controle e identificados como moduladores de silenciamento de informação (SIR 1, 2, 3 e 4), substituindo a nomenclatura *MAR* (Rine and Herskowitz 1987).

A partir da descoberta de parálogos de *SIR2* em *S.cerevisiae*, homólogos em outros organismos também foram identificados e caracterizados como membros de uma grande família de proteínas chamada de sirtuínas (Michan and Sinclair 2007). As sirtuínas pertencem à família das HDACs, amplamente distribuídas e conservadas em todos os filos de vida (Sauve, Wolberger et al. 2006). Pertencem à classe III por possuírem homologia com o repressor transcricional de leveduras *SIR2*. A classe III difere também das demais classes de HDACs por apresentar atividade dependente de NAD<sup>+</sup> (Morrison, Majdzadeh et al. 2007).

Organismos pequenos como bactérias, codificam apenas uma sirtuína. Eucariotos possuem múltiplas sirtuínas, com leveduras contendo quatro (Hst1-4) em adição a *Sir2*. Em mamíferos, esta família consiste de sete membros (SIRT1-7) onde, cada uma delas é caracterizada por um domínio catalítico com sequência conservada de

275 aminoácidos e também por uma sequência adicional N e/ou C-terminal, única, de comprimento variável, detectadas na maioria dos tecidos na fase fetal e adulta (Frye 1999; Frye 2000).

Estas enzimas, além de serem divididas em quatro diferentes classes, baseadas no seu domínio central, também diferem em sua localização sub-celular. Sirtuína 1, SIRT6 e SIRT7 encontram-se predominantemente no núcleo. A sirtuína que reside mais proeminentemente no citoplasma é SIRT2. SIRT3, SIRT4 e SIRT5 têm sido descritas como sirtuínas mitocondriais (Michan and Sinclair 2007).

As várias sirtuínas têm diversos substratos e estes podem ser divididos em três maiores classes: transcricional, apoptose, regulação metabólica (Sauve, Wolberger et al. 2006). Em geral, a diminuição da regulação transcricional pelas sirtuínas é associada com desacetilação de histonas, pelo menos em microrganismos. Imai et al. (2000) observaram que as histonas H3 e H4 recebem o ADP-ribose do  $\text{NAD}^+$ , das sirtuínas, se estas estivessem acetiladas. Evidências de que esta desacetilação conduza à diminuição transcricional no caso de *S. cerevisiae* (Sauve, Wolberger et al. 2006). Estas enzimas têm sido alvo de estudos recentes e o que se vem demonstrando é que proteínas não-histônicas também são alvo de atuação das sirtuínas.

Enquanto cada sirtuína é um produto de um gene específico, a expressão destes genes e a atividade das enzimas nos tecidos são fortemente afetados por mudanças no ambiente como dieta e estilo de vida. Alguns fatores reportados por influenciarem na expressão destes genes incluem: RC, exercício, álcool, fumo, exposição ao frio, estresse oxidativo, administração de compostos como resveratrol, quercetina e melatonina (Kelly 2010).

Outro importante fator relacionado à regulação de sirtuínas é o cofator  $\text{NAD}^+$ , participante de reações metabólicas de redox, que apresenta um papel crítico na transferência de elétrons conduzindo a liberação de energia da oxidação de nutrientes. Para cada reação de sirtuína, uma molécula de  $\text{NAD}^+$  é consumida para cada grupo acetil removido da proteína alvo (Blander and Guarente 2004). Sendo assim, aumentam as evidências de que as sirtuínas são adaptáveis a mudanças nas vias metabólicas onde  $\text{NAD}^+$  está envolvido, dependendo da concentração de  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$  e/ou nicotinamida (Revollo, Grimm et al. 2004), onde  $\text{NADH}$  e nicotinamida atuam como inibidores de SIRTs.



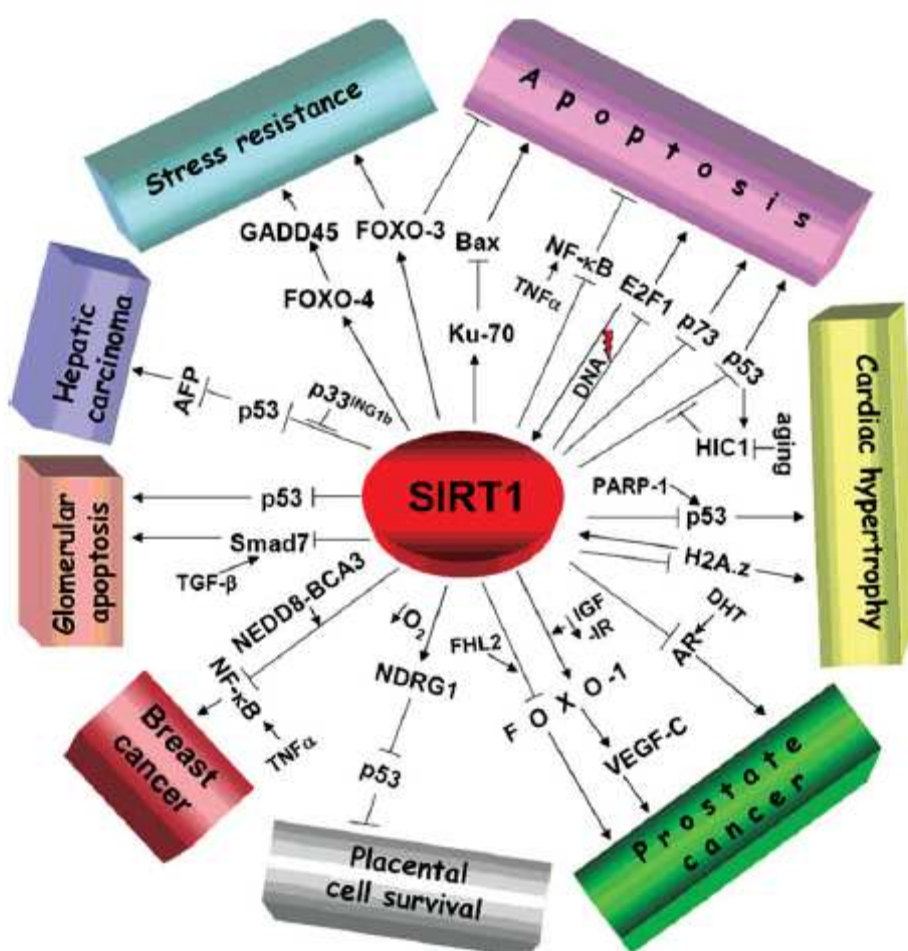
Desde sua descoberta, estas enzimas têm atraído interesse baseado no seu papel de regulação de longevidade em organismos menores, seu potencial de interferir no crescimento celular, proliferação e sobrevivência em resposta ao estresse (Galli, Van Gool et al. 2010).

### ***O PAPEL DA SIRTUÍNA 1***

Dentre as 7 sirtuínas mamíferas, SIRT1, é a mais estudada entre elas e atua em diversos substratos histonas e não-histonas. Em células mamíferas é caracterizada com uma desacetilase nuclear, cujos substratos incluem proteínas primariamente, mas não exclusivamente, envolvidas na regulação transcricional. Esta enzima influencia diversos aspectos da fisiologia do organismo tais como diferenciação, sobrevivência e metabolismo celular (Anastasiou and Krek 2006).

Seu papel varia desde regular a estrutura da cromatina e transcrição gênica, ativar ou suprimir a proteína p53, envolvida nos processos apoptóticos, atuar no reparo do DNA, na replicação de HIV-1, regulação de canais de iônicos, do metabolismo, através da repressão do gene PPAR- $\gamma$  inibindo a adipogênese, lipólise e liberação de ácidos graxos, na gliconeogênese através da desacetilação de PGC1 $\alpha$ , entre outros alvos como FOXO, NF- $\kappa$ B, NCoR e, LXR $\alpha$  (Figura 2) (Michan and Sinclair 2007; Feige and Auwerx 2008).

SIRT1 é uma importante enzima sensora de nutrientes, sendo demonstrado aumento da atividade e níveis de NAD<sup>+</sup> após RC, com consequente aumento da longevidade em *S.cerevisae* (Lin, Defossez et al. 2000; Lin, Ford et al. 2004). Da mesma forma, SIRT1 foi associada a RC em outros modelos experimentais (Cohen, Miller et al. 2004; Rodgers, Lerin et al. 2005; Chen, Bruno et al. 2008; Fulco, Cen et al. 2008). Sirtuína 1 vem sendo associada à regulação da homeostase metabólica de lipídios e glicose através da desacetilação de alvos como PPAR- $\gamma$  e PGC1 $\alpha$ . O papel desta enzima na regulação de lipídios foi sugerido por esta atuar como uma repressora do receptor de hormônio esteróide PPAR- $\gamma$ , um regulador transcricional em resposta a insulina em tecido adiposo branco. O mecanismo proposto é de que SIRT1 se liga ao NCoR, um regulador negativo de PPAR- $\gamma$ , no sítio promotor dos genes alvo de PPAR- $\gamma$ , desta forma reprimindo genes envolvidos na adipogênese e estoque de gordura (Picard, Kurtev et al. 2004).



**Figura 2.** Processos celulares ativados pela proteína sirtuína (Michan & Sinclair, 2007)

Outro mecanismo regulatório associado ao metabolismo de lipídios se refere à expressão de adiponectina. Esta se dá através da desacetilação de FOXO1 que melhora sua associação com o cofator C/EBP $\alpha$ , formando um complexo e, ativando a expressão de adiponectina (Qiao and Shao 2006), reguladora de sensibilidade a insulina e oxidação de ácidos graxos.

A enzima SIRT1 também está relacionada como reguladora do metabolismo de glicose e insulina. Aparentemente, a mesma sirtuína pode regular a homeostase da glicose em três diferentes tecidos: hepático, pancreático e muscular, afetando diferentes alvos (Guarente 2006). Em células pancreáticas, SIRT1 é um regulador positivo da secreção de insulina inibindo a transcrição do gene *Ucp-2*. Este gene codifica uma proteína de membrana mitocondrial que desregula a síntese de ATP. A repressão do

*Ucp-2* por SIRT1, provavelmente aumenta a eficiência da síntese de ATP em células- $\beta$  em resposta à glicose, regulando positivamente a secreção de insulina (Bordone, Motta et al. 2006).

No fígado, SIRT1 parece regular gliconeogênese através da desacetilação do PPAR- $\gamma$ , coativador de PGC-1 $\alpha$ , através da ativação deste último após privação nutricional (Rodgers and Puigserver 2007). Entretanto, tanto PGC1 $\alpha$  quanto FOXO regulam genes envolvidos na gliconeogênese; desta forma, a regulação de glicose hepática por SIRT1 é complexa e não está relacionada a uma única via (Guarente 2006). Da mesma forma, PGC1 $\alpha$  ativa genes envolvidos não só na gliconeogênese, mas também na biogênese mitocondrial, oxidação de ácidos graxos e respiração. Portanto, a regulação de PGC1 $\alpha$  por SIRT1 poderia influenciar na homeostase da glicose e de lipídios (Rodgers and Puigserver 2007). Sendo assim, SIRT1 pode ser um importante alvo para regulação de glicemia e lipidemia. Esta sirtuína também tem como alvo fatores de transcrição responsáveis pela regulação da função imune, como NF- $\kappa$ B. Neste caso, SIRT1 atua como um regulador negativo. Foi demonstrado que esta via está relacionada ao mecanismo de infecção do vírus HIV. O ativador transcricional Tat do HIV regula positivamente a atividade de NF- $\kappa$ B e induz a expressão de IL-2, em linfócitos infectados, ativando estes e criando condições adequadas para replicação viral. Neste trabalho, foi demonstrado que Tat se liga e inibe a atividade de SIRT1 (Galli, Van Gool et al. 2010).

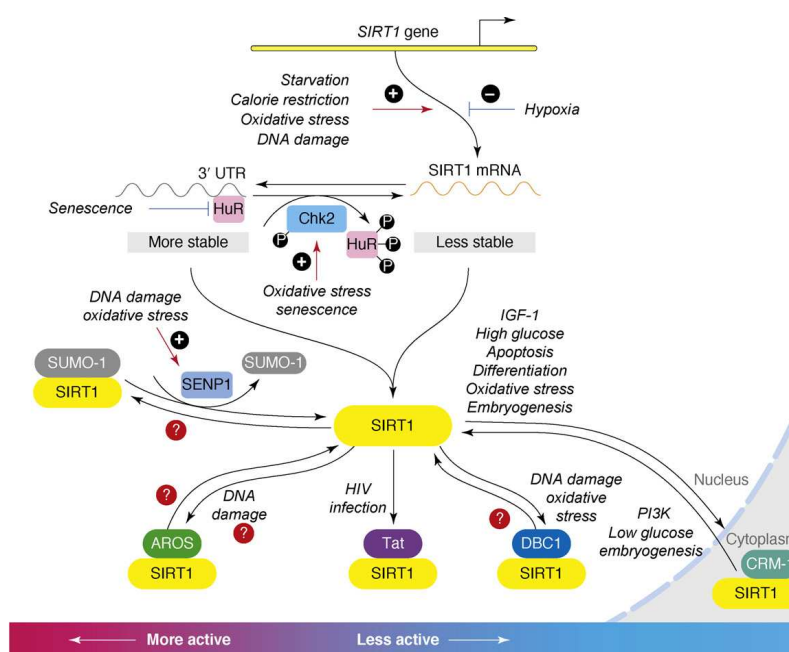
Sirtuína 1 é uma enzima que participa da regulação de câncer e apoptose entretanto, esta ainda é uma área complexa e não está bem compreendida. São observadas diferentes respostas nestes eventos celulares quando a sirtuína é regulada positivamente e, quando a mesma é regulada negativamente. O p53 foi o primeiro alvo não-histona identificado para SIRT1 (Luo, Nikolaev et al. 2001; Vaziri, Dessain et al. 2001). Este supressor de tumor exerce efeitos anti-proliferativos incluindo crescimento celular, apoptose e senescência celular em resposta a vários tipos de estresse e, está envolvido em mais da metade dos tumores humanos (Vogelstein, Lane et al. 2000). A SIRT1 é capaz de desacetilar o supressor de tumor p53 e inibir apoptose, desta forma favorecendo o desenvolvimento da carcinogênese em diferentes tipos de câncer como leucemias, câncer de próstata, câncer de pele e de cólon (Yi and Luo 2010).

Por outro lado alguns, estudos indicam que o aumento na regulação de SIRT1 pode atuar como supressor de tumor, desta forma inibindo o processo de carcinogênese.

SIRT1 inibe  $\beta$ -catenina e survivina. A survivina é uma proteína de baixo peso molecular que inibe apoptose. Em BRCA1 observam-se altos níveis de survivina e baixos níveis de SIRT1. Da mesma forma que em câncer de mama, em carcinoma hepático comparado com seu tecido adjacente apresenta SIRT1 com atividade supressora de tumor. Uma resposta similar é observada em neoplasia prostática intra-epitelial, onde SIRT1 atua como indutora de autofagia e como supressora tumoral (Powell, Casimiro et al. 2010).

No entanto, o papel de SIRT1 na regulação dos processos biológicos envolvidos em câncer ainda é confuso e controverso. Parecem apresentar especificidade tecidual e necessita maior esclarecimento para ser utilizado como proteína alvo, em estratégia terapêutica.

Assim como a sirtuína 1 regula vários processos fisiológicos e atua em diferentes alvos, estudos vêm demonstrando que esta enzima também possui alguns mecanismos de regulação e sugerem que estes possam ser regulados em três níveis: transcricional, pós-transcricional e traducional (Figura 3) (Kwon and Ott 2008). A regulação transcricional, na maioria das vezes, está associada a um agente estressor como restrição calórica (Howitz, Bitterman et al. 2003; Picard, Kurtev et al. 2004), estresse oxidativo (Chen, Wang et al. 2005).



**Figura 3.** Regulação da sirtuína (Kwon and Ott 2008)

### ***O PAPEL DA SIRTUÍNA 3***

Apesar de terem sido descritas sete sirtuínas humanas, pouco ainda se conhece sobre o mecanismo e efeito dos demais membros da família em relação a SIRT1. Uma das sirtuínas que vem despertando a atenção e está sendo considerada como importante alvo de pesquisas, pela sua interação metabólica, é a SIRT3.

Sirtuína 3 é uma importante enzima desacetilase NAD<sup>+</sup> dependente descrita por ser encontrada essencialmente na mitocôndria de tecido humano, em ratos e camundongos (Onyango, Celic et al. 2002; Jin, Galonek et al. 2009). Esta enzima encontra-se em todos os tecidos, porém em maior concentração, nos metabolicamente ativos como rim, coração, cérebro, fígado, músculo e pâncreas (Onyango, Celic et al. 2002).

O mecanismo de acetilação reversível vem sendo considerado como um importante mecanismo regulador de histonas e proteínas não-histonas (Smith, Settles et al. 2010). Dentre as três sirtuínas com localização mitocondrial, SIRT3 apresenta maior efetividade na remoção do grupo acetil, uma vez que é observada hiperacetilação das proteínas mitocondriais em camundongos *knockout* para SIRT3 (Lombard, Alt et al. 2007).

Assim como SIRT1, sirtuína 3 também atua e desacetila diferentes proteínas alvos, entre elas a acetil-coenzima A sintetase (Hallows, Lee et al. 2006), a glutamato dehidrogenase (Lombard, Alt et al. 2007; Schlicker, Gertz et al. 2008), Ku 70 (Sundaresan, Samant et al. 2008), a ciclofilina D (Shulga, Wilson-Smith et al. 2010), a AMPK (Shi, Fan et al. 2010) e PGC1 $\alpha$  (Palacios, Carmona et al. 2009). Desta forma, esta enzima vem sendo relacionada à regulação do metabolismo celular de lipídios e glicose, bem como, influenciando na sobrevivência celular após estresse, fosforilação oxidativa da mitocôndria, manutenção dos níveis de ATP e, regulação da termogênese (Ahn, Kim et al. 2008).

Sirtuína 3 foi demonstrada por ser uma importante enzima reguladora do metabolismo em tecido adiposo marrom, tecido este responsável pela termogênese e rico em mitocôndria. Neste tecido, Sirt3 interage na expressão de genes relacionados com o metabolismo mitocondrial, como UCP1, responsável pela regulação da sensibilidade térmica, através da ativação de PGC1 $\alpha$  (Shi, Wang et al. 2005).

Um dos primeiros alvos reconhecidos de SIRT3 foi a enzima mitocondrial AceCS2, responsável por converter acetato, proveniente de fontes exógenas e endógenas, na presença de ATP, em acetil-CoA. O substrato produzido desta reação é utilizado e participa do ciclo do ácido tricarboxílico. SIRT3 regula esta enzima pela desacetilação de um único sítio de lisina e, desta maneira, aumenta sua atividade enzimática (Hallows, Lee et al. 2006). Na deficiência de AceCS2 ou em jejum, o acetato não é utilizado, diminui ATP e se observa termogênese deficiente (Sakakibara, Fujino et al. 2009). SIRT3 também desacetila e ativa GDH, que junto com acetil-CoA participa do TCA (Schlicker, Gertz et al. 2008). Funcionalmente, a ativação de acetil-CoA sintetase 2 e GDH está relacionada com a habilidade de SIRT3 em regular a fosforilação oxidativa mitocondrial.

Outra importante regulação celular associada a SIRT3 deve-se à manutenção dos níveis de ATP. Esta acontece pela interação física de SIRT3 com pelo menos uma das subunidades do Complexo I, na membrana mitocondrial interna. Em camundongos deficientes de SIRT3, observa-se redução de aproximadamente 50% nos níveis basais de ATP no fígado, rim e coração (Ahn, Kim et al. 2008). Com o aumento da idade, observa-se declínio nos níveis de ATP, relacionado com fraqueza muscular, perda de massa muscular e desenvolvimento de doenças associadas com a idade. Sendo assim, SIRT3 poderia ser um importante alvo para prevenção de doenças associadas à idade.

Em células HeLa, foi demonstrado que em um meio contendo apenas galactose, ocorria a indução e aumento do processo de fosforilação oxidativa e diminuição da dependência de glicólise. Esta mudança no metabolismo foi dependente de SIRT3, que desacetila ciclofilina D e redistribui para o citosol a enzima hexoquinase II, por diminuir a ligação deste com o canal de ânion voltagem dependente (VDAC) (Shulga, Wilson-Smith et al. 2010).

A diminuição do processo de fosforilação oxidativa mitocondrial é observada em alguns tipos de câncer (Ma, Sung et al. 2007; Modica-Napolitano, Kulawiec et al. 2007; Pan and Mak 2007). A diminuição deste mecanismo acarreta em um aumento no processo de glicólise, conseqüentemente, manutenção dos níveis de ATP com crescimento e divisão das células cancerígenas. Este mecanismo tumoral está, em parte, relacionado ao aumento na ligação de hexoquinase II ao VDAC (Pedersen 2007).

Em cardiomiócitos, foi demonstrada a atuação protetora de SIRT3 localizada fora da mitocôndria. Nestas células, a SIRT3 é altamente expressa e localizada no

núcleo e citoplasma, além da mitocôndria. A superexpressão desta enzima protege a célula contra morte mediada por estresse, através do mecanismo de desacetilação de Ku70. A desacetilação desta proteína nuclear aumenta a ligação com Bax, impedindo a translocação desta para a mitocôndria. Assim, esta ligação Ku70/Bax torna a célula mais resistente contra a morte celular mediada por Bax, perante a uma exposição a estresse (Sundaresan, Samant et al. 2008).

A enzima sirtuína 3 também apresenta importante papel na regulação de lipídios. A expressão aumentada desta enzima, em células HepG2, reduziu o acúmulo de lipídios, em relação ao seu controle. O mecanismo proposto pelos autores está relacionado à ativação indireta na fosforilação de AMPK, mediada pela desacetilação de UCP1 (Shi, Fan et al. 2010). *In vivo*, foi demonstrado que SIRT3 participa da oxidação de ácidos graxos por desacetilar a enzima LCAD no fígado, contribuindo para a regulação no balanço de energia celular (Hirschey, Shimazu et al. 2010). Da mesma forma, a manutenção da homeostasia no músculo esquelético de camundongos está ligado ao aumento protéico de SIRT3, após mudanças nutricionais e/ou energéticas e, fisiológicas. Este aumento de SIRT3, fosforila e ativa AMPK, que regula o aumento transcricional de PGC1 $\alpha$  (Palacios, Carmona et al. 2009).

Ainda relacionado ao fator de transcrição PGC1 $\alpha$ , um alvo comum de SIRT3 e SIRT1, foi demonstrado que este estimula a expressão gênica de SIRT, mediada por um elemento mapeado na região promotora de SIRT3. SIRT3 é requerida para se observar os efeitos de PGC1 $\alpha$  em expressão de genes mitocondriais, produção de ROS e biogênese mitocondrial no músculo (Kong, Wang et al. 2010).

Esta sirtuína, pela sua localização essencialmente mitocondrial, é fortemente relacionada à proteção contra dano e estresse celular. Uma das causas de morte celular causada por estresse genotóxico deve-se a depleção de NAD<sup>+</sup> no núcleo e no citoplasma. Foi demonstrado que NAMPT é uma importante enzima reguladora da via de NAD<sup>+</sup>, porém a manutenção da síntese é dependente do aumento de SIRT3. Desta forma esta sirtuína é importante para manutenção da viabilidade celular frente ao estresse genotóxico (Yang, Yang et al. 2007).

Embora SIRT3 seja uma importante enzima desacetiladora, camundongos deficientes para SIRT3, quando em condições fisiológicas normais, são viáveis, férteis e se desenvolvem normalmente (Lombard, Alt et al. 2007). Não apresentam diferença no

peso corporal, no balanço de energia e termogênese adaptativa. Em uma linhagem de ratos SIRT3<sup>-/-</sup> também foi observada ausência de alteração fenotípica; porém, foi detectado um aumento da depleção de ATP no fígado, rim e coração (Ahn, Kim et al. 2008).

Dentre as sete sirtuínas, SIRT3 é o único análogo cujo aumento da expressão está associado à longevidade em humanos. Em um estudo clínico, foi observado que indivíduos com mais de 60 anos e com estilo de vida sedentário tinham uma redução de aproximadamente 40% nos níveis de SIRT3, quando comparados com jovens ou com indivíduos idosos após estes terem sido submetidos a exercício intenso (Lanza, Short et al. 2008). Em outro estudo, a presença de um polimorfismo no promotor de SIRT3 foi associado com longevidade em homens (Rose, Dato et al. 2003; Bellizzi, Rose et al. 2005).

Uma das teorias postuladas em relação ao avanço da idade está relacionada ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio, originadas da cadeia respiratória mitocondrial e diminuição da função mitocondrial. Um estudo recente mostrou que a SIRT3 apresenta um papel importante na longevidade de mamíferos. Esta proteína é essencial para melhorar o sistema antioxidante mediado por glutathione na mitocôndria. O mecanismo envolvido está associado à desacetilação de Idh2, por SIRT3, que aumenta os níveis de NADPH, aumentando a razão de glutathione reduzida a oxidada. Neste estudo, ainda foi demonstrado que SIRT3 preveniu a perda auditiva em camundongos, após restrição calórica; uma desordem comum associada a idade e stress oxidativo, (Someya, Yu et al. 2010).

#### ***O PAPEL DA SIRTUÍNA 4***

Assim como sirtuína 3, SIRT4 também é uma proteína com localização essencialmente mitocondrial, altamente expressa nos tecidos metabolicamente ativos. Porém, enquanto SIRT1 e SIRT3 apresentam atividade desacetiladora dependente de NAD<sup>+</sup>, este mecanismo não é detectado *in vitro*, para SIRT4 (Haigis, Mostoslavsky et al. 2006). O mecanismo de ação de SIRT4 envolve a transferência de um grupo ADP-ribose de NAD<sup>+</sup> para a proteína alvo (Liszt, Ford et al. 2005; Haigis, Mostoslavsky et al. 2006).



Poucas proteínas mitocondriais são reguladas por ADP-ribosilação. A melhor caracterizada entre elas é a GDH, um dos alvos conhecidos de SIRT4. GDH, uma enzima da matriz mitocondrial, converte glutamato em  $\alpha$ -cetoglutarato e amônia no fígado, rim, cérebro e células da ilhota pancreática (Stanley 2004). Esta reação gera ATP e promove a secreção de insulina. SIRT4 atua na inibição de GDH e, conseqüentemente, inibe a produção de insulina em células  $\beta$  pancreáticas (Haigis, Mostoslavsky et al. 2006).

O papel de SIRT4 na regulação de GDH é conhecido em células pancreáticas; porém, não é claro seu papel em outros tecidos. Foi demonstrado que em hepatócitos e miotubos a diminuição dos níveis de SIRT4 promoveu aumento na expressão de enzimas mitocondriais, aumento no metabolismo da oxidação de ácidos graxos, respiração celular e aumento nos níveis de AMPK. Foi demonstrado também que a deleção gênica de SIRT4 gerou um aumento nos níveis de expressão de SIRT1 *in vitro* e *in vivo*. Ainda, os efeitos mediados por diminuição de SIRT4 foram dependentes de SIRT1 em hepatócitos. Levando em consideração a alteração metabólica observada por diminuição de SIRT4, esta poderia ser um importante alvo terapêutico para doenças como diabetes tipo 2 (Nasrin, Wu et al. 2010)

## **ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL**

O *Danio rerio* - popularmente conhecido como *zebrafish*, peixe-zebra ou peixe paulistinha – foi descrito em 1822 por Francis Hamilton e faz parte da família de vertebrados com o maior número de espécies, a família Cyprinidae. As 44 espécies do gênero *Danio* fazem parte da subfamília Raborinae, e tem como algumas de suas características o distinto padrão de coloração (alternância de listras horizontais claras e escuras) e o pequeno tamanho (<120 mm); em torno de 3 a 4 cm em *D. rerio* (Spence, Gerlach et al. 2008).

Este pequeno teleósteo de água doce é naturalmente originário do nordeste da Índia, Bangladesh e Nepal (Spence, Gerlach et al. 2008) e limitava-se a um popular peixe tropical de aquário (Roest Crolius and Weissenbach 2005). George Streisinger foi quem utilizou pela primeira vez no laboratório, este animal, como modelo experimental há cerca de 30 anos atrás (Guo 2004). Hoje, sabe-se claramente que este modelo foi escolhido pelo pesquisador por ser um pequeno vertebrado diplóide, por

apresentar um balanço entre a complexidade e simplicidade, além de alta fecundidade. Ainda, este modelo é de fácil manutenção, onde é possível manter um grande número de animais em um pequeno espaço, pré-requisito para estudos genéticos em larga escala (Gerhard and Cheng 2002; Guo 2004).

*Zebrafish* se tornou um modelo experimental amplamente utilizado nas mais diversas áreas. Na biologia do desenvolvimento, pela transparência de seus ovos e ciclo de desenvolvimento externo, fora da mãe, permite o acompanhamento da formação dos órgãos (Guo, 2004), além de o embrião não sofrer interferência alimentar até o quinto dia pós-fertilização (Patton and Zon 2001). Na genética, pela alta fecundidade, curto tempo de geração, conservação anatômica e genômica com humanos (70-80% similaridade) (Barbazuk, Korf et al. 2000; Dooley and Zon 2000) e pela disponibilidade de inúmeros mutantes e transgênicos (Guo 2004).

Pela similaridade com o genoma humano, este teleósteo é útil no *screening* de drogas e outras pesquisas aplicadas (Berghmans, Jette et al. 2005; Zon and Peterson 2005). Há aproximadamente dez anos, vem sendo usado como modelo de várias doenças humanas (Dooley and Zon 2000; Keller and Murtha 2004) especialmente doenças cardiovasculares, hematopoiéticas (Dooley e Zon, 2000; Gerhard e Cheng, 2002), neurodegenerativas e metabólicas (Gleeson, Connaughton et al. 2007). Mais recentemente, o *zebrafish* vem aparecendo como um promissor modelo vertebrado para doenças relacionadas ao envelhecimento, explorando a biologia do processo e auxiliando na identificação de genes relacionados com a longevidade (Keller and Murtha 2004).

Dois modelos de pesquisa são utilizados para realização de *screening* genético e teste de compostos químicos em *zebrafish* (1) caracterização do fenótipo e posteriormente determinação do genótipo; (2) seleção de alvos de interesse com caracterização do genótipo e posterior observação do fenótipo (Skromne and Prince 2008; Foley, Maeder et al. 2009). Outra vantagem de utilizar o pequeno animal como modelo experimental refere-se à ampla livraria de pequenas moléculas passíveis de serem testadas, já publicadas, podendo ser utilizadas em outras pesquisas (Wheeler and Brandli 2009).

O processo para liberação de novas drogas alvo, tradicionalmente iniciam com pesquisas *in vitro* e, posteriormente, passa a modelos *in vivo* e, leva em torno de 12 a 15 anos até chegar ao mercado. Neste processo, 1% das drogas testadas resultam em

sucesso e milhões de dólares são gastos. Sendo assim, a utilização do modelo *in vivo* é útil no desenvolvimento de novos compostos terapêuticos. Desta forma, *zebrafish* tem emergido como um rápido e eficiente método para identificar compostos que modulam processos biológicos, pois com um *screening* primário *in vivo* é possível determinar bioatividade do composto, toxicidade, e possíveis efeitos colaterais. Desta forma o desenvolvimento de novas drogas alvo diminui em aproximadamente 7 anos (Bowman and Zon 2010).

Apesar do uso crescente do *zebrafish* como modelo vertebrado e como modelo para doenças humanas, estudos relacionando a modulação de sirtuínas neste modelo são escassos, sendo encontrado apenas um estudo publicado (Potente and Dimmeler 2008), citado anteriormente. Da mesma forma este modelo foi pouco explorado em relação aos efeitos de restrição calórica e a relação da modulação enzimática de animais exposto a este regime.

Portanto, sendo o resveratrol extensivamente estudado, em diferentes modelos experimentais, e a este sendo atribuído um relevante potencial terapêutico; sendo a restrição calórica, atualmente, a única intervenção comprovada em exercer efeitos benéficos aumentando a longevidade bem como qualidade de vida; tornam-se necessários mais estudos para compreender o mecanismo de ação destas duas intervenções, principalmente em relação à hipótese de modulação das sirtuínas. Uma vez que o *zebrafish* constitui um modelo simples e representativo, porém pouco estudado em relação à expressão de sirtuínas, torna-se relevante investigá-lo como modelo experimental para o *screening* de compostos moduladores de sirtuínas.

## OBJETIVOS

- Analisar a expressão gênica de sirtuínas influenciados por resveratrol, etanol e restrição calórica em *zebrafish* (*Danio rerio*).

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a expressão gênica de *SIRT1* no fígado dos animais expostos a diferentes concentrações de *trans*-resveratrol em diferentes tempos de exposição;

- Analisar a expressão gênica de *SIRT3* e *SIRT4* no fígado após exposição ao *trans*-resveratrol, etanol e etanol mais resveratrol;

- Analisar a expressão gênica de *SIRT3* e *SIRT4* no fígado e músculo de *zebrafish*, após restrição calórica

- Analisar a expressão gênica de *PGC1 $\alpha$*  após diferentes concentrações de *trans*-resveratrol e, diferentes tempos de exposição, no fígado de *zebrafish*;

- Analisar a expressão gênica de *NAMPT* após diferentes concentrações de *trans*-resveratrol, no fígado de *zebrafish*;

- Analisar a concentração de NAD<sup>+</sup> e NADH após diferentes concentrações de *trans*-resveratrol, no fígado de *zebrafish*;

- Analisar a expressão gênica de *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT4*, *PGC1 $\alpha$*  e *PPAR $\gamma$*  após restrição calórica, em fígado e músculo de *zebrafish*;

- Analisar e comparar efeito do *trans*-resveratrol e restrição calórica na modulação de sirtuínas, no fígado de *zebrafish*;

- Analisar e comparar a transcrição de *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT4*, *PGC1 $\alpha$* , *PPAR $\gamma$*  e *NAMPT* no fígado de animais expostos ao etanol e etanol tratados com resveratrol, após tratamento agudo e crônico;

- Analisar o padrão histológico dos fígados dos animais tratados com etanol, etanol mais resveratrol, após tratamento crônico;

- Analisar o estado de desacetilação de H3 após tratamento com etanol, resveratrol e, etanol + resveratrol, em tratamento agudo e crônico.

## **CAPÍTULO 2**

Artigo científico sob revisão na revista *Molecular Biology Reports* (Fator de Impacto: 2,038)

Anexo I – *status* do artigo e resposta aos revisores

**Modulatory Effect of Resveratrol on *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT4*, *PGC1 $\alpha$* , and *NAMPT* Gene Expression Profiles in Wild-type Adult Zebrafish Liver**

Helena Schirmer<sup>1,2</sup>, Talita Carneiro Brandão Pereira<sup>3</sup>, Eduardo Pacheco Rico<sup>4</sup>, Denis Broock Rosemberg<sup>4</sup>, Carla Denise Bonan<sup>5</sup>, Maurício Reis Bogo<sup>3</sup>, André Arigony Souto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química Pura, Faculdade de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Biomedicina, Universidade Feevale, RS 239, 2755, 93352-000 Novo Hamburgo, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Prédio 12C, Sala 172, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>5</sup>Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Prédio 12D, 3 Andar, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

\*Corresponding author: arigony@pucrs.br

Tel: +55-51-3320-3549

Fax: +55-51-3320-3549

**Keywords:** Resveratrol, sirtuins, PGC1 $\alpha$ , NAMPT, liver

**Abstract**

Sirtuins (SIRT) are NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylases that catalyze the hydrolysis of acetyl-lysine residues. They play an important role in many physiological and pathophysiological processes, such as the regulation of lifespan and the prevention of metabolic diseases. In this study, we analyzed the effects of resveratrol on gene expression levels of *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT4*, *PGC1 $\alpha$* , and *NAMPT*, as well as their effects on NAD<sup>+</sup> and NADH levels, in the liver of nonstressed or nonimpaired wild-type zebrafish. Semiquantitative RT-PCR assays showed that resveratrol did not change the mRNA levels of *SIRT1* and *PGC1 $\alpha$*  but decreased the expression levels of the *SIRT3*, *SIRT4*, and *NAMPT* genes. The decrease in *NAMPT* mRNA levels was accompanied by an increase in NADH levels, thereby decreasing the NAD<sup>+</sup>/H ratio. Taken together, our results suggest that resveratrol plays a modulatory role in the transcription of the *NAMPT*, *SIRT3*, and *SIRT4* genes. Zebrafish is an interesting tool that can be used to understand the mechanisms of SIRTs and NAMPT metabolism and to help developing therapeutic compounds. However, further investigations using healthy experimental animals are required to study the modulation of the *SIRT* and *NAMPT* genes by resveratrol before it is used as a nutraceutical compound in healthy humans.

## 1. Introduction

Resveratrol is a naturally occurring, biologically active substance found in many plants [1]. It has been reported to increase the lifespan of *Saccharomyces cerevisiae* [2], *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* [3], and the fish *Nothobranchius furzeri* [4] but not that of rodents. The mechanism underlying this effect has been associated with the potent activation of sirtuin 1 (SIRT1) [2]. However, little is known about the interaction between resveratrol and other sirtuins (SIRTs). Since resveratrol has been shown to have potential chemoprotective activity [5], several health benefits have been reported in the literature. These include the delay of onset or prevention of age-related diseases such as autoimmune diseases and inflammation [6], neurodegeneration [7], heart disease, metabolic disorders such as obesity and type-2 diabetes [8], and several types of cancer [9, 10].

Although several studies have been conducted to investigate the effect of resveratrol in various diseases, its mechanism of action is still not well understood. Resveratrol has been reported to act on multiple targets [1]. The majority of studies on the interaction of resveratrol with SIRTs have used stressed, impaired, or knockout models [11]; few studies have analyzed this interaction in healthy experimental animals. Nevertheless, resveratrol is being used as a nutraceutical compound and tested in healthy volunteers although it has not been found to have any correlation with the modulation of SIRTs [12, 13] or other genes. Therefore, it is of great interest to understand whether and how resveratrol modulates SIRTs in healthy or wild-type experimental animals.

SIRTs are a class of evolutionarily conserved NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylases found in living organisms [14]. They are essential enzymes that catalyze the hydrolysis of acetyl-lysine residues [15]. Sir2p, which is found in prokaryotes, has attracted considerable attention because of its effect on the lifespan of yeast cells [16]. In mammals, 7 SIRT-related genes have been identified, namely, *SIRT1–7* [17]. The encoded enzymes have diverse cellular locations and target multiple factors and are key regulators of many physiological and pathophysiological processes that affect a broad range of metabolic cellular functions [18].

SIRT1 is the most well-studied SIRT and has been associated with several biological processes. It has been reported to modify the level of protein acetylation by either activating or suppressing them. In addition to deacetylating histones, SIRT1 also targets a number of transcription factors, including PGC1 $\alpha$ , PPARs, FOXO, NF $\kappa$ B, p53, Tat, NCoR, and LXR $\alpha$ ; this suggests that it is involved in the regulation of gluconeogenesis, mitochondrial biogenesis, resistance to oxidative stress, adipogenesis and lipolysis, glycolysis, inflammation, apoptosis, HIV transcription, cell differentiation, and angiogenesis [19].

There is little information on the other SIRTs. Recently, SIRT3 and SIRT4, which are mitochondrial proteins with deacetylase and ADP-ribosyltransferase activities, respectively [17], have also been shown to regulate cellular metabolic functions. Both proteins are found primarily in metabolically active tissues, such as the kidney, brown adipose tissue, brain, liver, and heart [20-22]. SIRT3 is a more effective deacetylase than SIRT4, since hyperacetylation is observed in SIRT3-deficient animals [23]. The most recent review proposed that these SIRTs might be the next targets for intensive



studies because of their potential association with metabolic diseases [24], but their role must first be understood in a wild-type model without stress or intervention.

Different targets have been reported for SIRT3, such as acetyl-CoA synthetase [25], glutamate dehydrogenase (GDH) [23, 26], Ku70 [27], cyclophilin D [28], and AMP-activated protein kinase (AMPK) [29], through which it regulates the cellular metabolism of lipids and glucose, as well as cell survival, oxidative phosphorylation of mitochondria, and maintenance of ATP level [30]. For SIRT4, only 1 target has been reported—GDH—whose enzymatic activity it inhibits through ADP-ribosylation. GDH is a mitochondrial matrix enzyme that converts glutamate to  $\alpha$ -ketoglutarate and ammonia in different tissues [21, 31]. In pancreatic islet cells, this reaction generates ATP and promotes insulin secretion [32]. One recent report also showed that SIRT4 is involved in lipid storage, where reduced levels of SIRT4 increased the mitochondrial and fatty acid metabolism in hepatocytes and liver and improved mitochondrial function in muscles [33].

Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), also known as pre-B-cell colony-enhancing factor (PBEF) or visfatin, is a 52-kDa protein that is most highly expressed in the liver and muscles [34]. NAMPT converts nicotinamide (NAM) to nicotinamide mononucleotide, which is converted to  $\text{NAD}^+$  by nicotinamide adenyltransferase in the mammalian biosynthetic pathway. NAMPT is a rate-limiting enzyme in the conversion of NAM to  $\text{NAD}^+$  and may thus alter the  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ratio, which is crucial for the activation and regulation of SIRT1 transcription [35]. Recently, NAMPT has been reported to increase the levels of SIRTs and to have cell-protective activities [36-39].

The zebrafish is a model organism widely used in various lines of biomedical research, particularly in developmental and genetic studies [40]. It is an ideal model for research because it is easy to maintain and manipulate; it is economical [41]; and its genes are highly conserved, sharing a 70–80% homology with those in humans [42]. Therefore, zebrafish may be a promising model that can be used to evaluate the modulatory effect of resveratrol on the gene expression profiles of different proteins. The aim of the present study was to analyze for the first time the potential of resveratrol to modulate the gene expression patterns of *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT4*, *NAMPT*, and *PGC1 $\alpha$*  in wild-type zebrafish liver. In addition, we also sought to correlate the concentrations of  $\text{NAD}^+$  and  $\text{NADH}$  with *NAMPT* expression.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

Adult wild-type zebrafish (*Danio rerio*) of both sexes were obtained from a commercial supplier (Delphis, Porto Alegre, RS, Brazil). All the fish were acclimated in a 50-L thermostated aquarium for 2 weeks, under a 14 h/10 h light/dark controlled photoperiod. The fishes were fed twice a day with flake fish food (Alcon Basic®, Alcon, Brazil). All animal manipulations were in accordance with the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals, and all procedures in the present study were approved by the Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUC-RS), license number 08/00082.

## 2.2. Resveratrol exposure

For the resveratrol treatment, we used wild-type zebrafish that were not treated with any other substance or any other intervention. The fish were exposed to solutions with 2 different resveratrol concentrations (5 mg/L and 50 mg/L). Resveratrol was dissolved in 100  $\mu$ L of ethanol and then homogenized in 2 L of distilled water for 1 h for complete solubilization. A preliminary study was performed to verify whether the vehicle could affect the gene expression; no significant change was noted when compared to the effect observed in water control (data not shown). For resveratrol exposure, the fish were transferred to water containing the compound for 30 or 60 min, and the aquariums were completely covered to avoid degradation of the compound by ultraviolet light. The control group was kept for 1 h in distilled water. At the end of the treatment, zebrafish livers ( $n = 4$ ) were dissected and immediately frozen in liquid nitrogen for later analysis. Each independent experiment was performed using a pool of 5 livers. SIRT3 and SIRT4 levels were analyzed after 30 min of exposure to 5 mg/L resveratrol. For NAMPT analysis, we used the same duration for all concentrations of resveratrol. To ensure that the compound reached the liver during the exposure time and the concentration of the compound added directly to the water, we determined the concentration of resveratrol by HPLC [43].

## 2.3. Semiquantitative RT-PCR analysis

After harvesting the livers, total RNA was isolated with TRIzol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's instructions. The ratio between the absorbance values at 260 and 280 nm was determined to verify RNA purity; all samples were adjusted to a final concentration of 160 ng/ $\mu$ L. cDNA species were synthesized with SuperScript<sup>™</sup> First-Strand (Synthesis System for RT-PCR) from Invitrogen, according to the manufacturer's instructions. Each RNA sample (2  $\mu$ g/mL) was mixed with 1  $\mu$ L of 50  $\mu$ M oligo(dT) and 1  $\mu$ L of annealing buffer, to give a final volume of 8  $\mu$ L. The samples were incubated at 65°C for 5 min in a thermal cycler; this was a 1-minute step on ice when 10  $\mu$ L of 2 $\times$  First-Strand Reaction Mix and 2  $\mu$ L of SuperScript<sup>™</sup> III/RNaseOUT<sup>™</sup> Enzyme Mix were added. The products were incubated for 50 min at 50°C and further incubated at 85°C for 5 min. PCR parameters, including the concentrations of MgCl<sub>2</sub> and cDNA templates and PCR cycles (25–40 cycles) were optimized (data not shown). The reactions were performed under optimal conditions that allowed product detection within the linear phase of band densitometry analyzed for each primer pair (Table 1). The  $\beta$ -actin primers were designed as described by Chen et al. [44], and the reactions were performed in a final volume of 20  $\mu$ L. *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT4*, *NAMPT*, and *PGC1 $\alpha$*  primers were designed using the Oligos 9.6 program, and the reactions were performed in a final volume of 25  $\mu$ L. The gene/ $\beta$ -actin ratio was determined after electrophoresis on a 1.0% agarose gel stained with GelRed<sup>®</sup> and visualization under ultraviolet light by using ImageJ 1.37 for Windows. Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) was used as a molecular marker. The gene expression patterns of *SIRT1* and *PGC1 $\alpha$*  were determined in all treatments with resveratrol. For *SIRT3* and *SIRT4*, we determined the gene expression only in the animals exposed to

5 mg/L for 30 min. In the case of *NAMPT*, we analyzed the gene expression in the animals exposed for 30 min to both concentrations of resveratrol (5 and 50 mg/L).

#### **2.4. NAD<sup>+</sup> and NADH concentrations**

The coenzymes were measured using the NAD<sup>+</sup>/NADH colorimetric assay kit (BioChain Hayward, CA, USA - LGC Biotechnology) in accordance with the manufacturer's instructions. Frozen tissues (20 mg) were washed in cold phosphate-buffered saline and homogenized with NAD<sup>+</sup> or NADH extraction buffer. Forty microliters of the supernatant was added to 80  $\mu$ L of the working reagent. The plate was mixed briefly and thoroughly, and the optical density (OD) was read at time zero (OD<sub>0</sub>) and at 15 min (OD<sub>15</sub>) after incubation at room temperature. The data were obtained using a SPECTRAmax Gemini XS microplate spectrofluorometer with the SoftMax Pro 5 software (Molecular Devices) at 565 nm. The concentrations of NAD<sup>+</sup> and NADH (in  $\mu$ M) were calculated from the difference between the experimental readings and the standard curve. The assay was performed with control and both concentrations of resveratrol (5 mg/L and 50 mg/L) after 60 min of exposure. For each group, the procedure was performed with  $n = 4$ , and the samples were analyzed in duplicate.

#### **2.5. Statistical analysis**

Data processing and statistical analysis were performed using Microsoft Excel and GraphPad Prism 5. The optical densitometry results were expressed as mean (SD) and statistically compared by one-way analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey's post hoc test or by unpaired  $t$  test;  $p \leq 0.05$  was considered significant.

### **3. Results**

#### **3.1. Resveratrol does not alter the mRNA level of the *SIRT1* gene in wild-type zebrafish liver**

The fish in the resveratrol group were treated with 2 doses of the compound: a lower concentration (5 mg/L) and a concentration 10 times higher (50 mg/L), for 2 different durations of exposure: 30 and 60 min. The concentrations of resveratrol and the durations of treatment were chosen after preliminary assays. In these assays, we did not observe any difference in the transcriptional levels of *SIRT1* in the liver of zebrafish at 3 different concentrations of the compound after 2 durations of exposure: 60 min and 7 days (data not shown). In our experiments, we observed no significant changes in *SIRT1* mRNA levels after resveratrol treatment, neither at different doses nor after different durations of exposure (Fig. 1).

#### **3.2. Resveratrol negatively regulates *SIRT3* and *SIRT4* gene expression**

Resveratrol has received little attention in terms of the regulation of other SIRT, especially in a nonstressed model. Therefore, we examined the gene expression levels of 2 mitochondrial SIRTs—*SIRT3* and *SIRT4*—after exposure to the compound in a nonimpaired model. We observed a significant decrease in the *SIRT3* and *SIRT4* mRNA levels after resveratrol exposure (5 mg/L, 30 min) (for both genes:  $p \leq 0.05$ , test t) (Fig. 2).

### 3.3 *PGC1 $\alpha$* mRNA levels after resveratrol treatment

SIRTs are believed to be involved in the modulation of several transcription factors, such as those related to mitochondrial biogenesis. It is well known that *PGC1 $\alpha$*  is deacetylated and regulated by SIRT1 and, as recently demonstrated, by SIRT3 [45]. In order to detect any SIRT activity, we analyzed the *PGC1 $\alpha$*  gene expression in our model after resveratrol exposure. We did not find any change in the gene expression of the transcription factor *PGC1 $\alpha$*  (Fig. 3).

### 3.4 Resveratrol modulates *NAMPT* expression

In yeast, the *PNC1* gene is essential for maintaining  $\text{NAD}^+$  levels, while in mammals, maintenance of  $\text{NAD}^+$  levels is mediated by *NAMPT*. In this study, we determined the mRNA levels of *NAMPT* and investigated whether they are correlated to the levels of  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  in the liver of zebrafish exposed to resveratrol. Resveratrol had a more significant effect on the gene expression of *NAMPT* than the control (Fig. 4). We observed a significant decrease in *NAMPT* mRNA levels at a higher concentration of resveratrol, which was accompanied by an increase in cellular levels of NADH and, consequently, a decrease in the  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ratio (Table 2). In the group treated with 5 mg/L resveratrol, we did not observe a significant decrease in the mRNA level of *NAMPT*; the NADH level increased, whereas the  $\text{NAD}^+$  level remained the same, thereby increasing the  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ratio.

## 4. Discussion

The wild-type adult zebrafish is an interesting experimental tool that can offer several advantages in biomedical research, such as in the development of therapeutics for human diseases, since this vertebrate shares common pathophysiological pathways with humans [42]. The zebrafish is a cost-effective model that can be used to rapidly identify the lead compounds modulating specific biological processes. It can also be used as an alternative *in vivo* chemical screening tool for determining the bioactivity, toxicity, and off-target side effects of novel drugs, and thus for drug optimization [46]. This model may be especially suitable for studying the effects of compounds because of the simplicity of its tissue delivery system [47].

In one of our researches, the zebrafish model has been extensively used to test different substances added directly to the water. In another study, our group demonstrated that zebrafish is an interesting model for studying SIRT modulation, since the mRNAs of all SIRTs were detected in all fish

tissues. When the resveratrol is added in the fish environment, it is absorbed by the blood vessels of the gill and the skin; thus, the compound is rapidly diffused through systemic circulation and reaches the tissues. In this study, we confirmed this observation with resveratrol, since we detected the compound in the liver after exposure and did not detect the metabolites at the indicated time points and compound concentrations (data not shown).

Resveratrol has been reported in the literature as a potent activator of SIRT1 [2, 48, 49]. In this study, the results showed that resveratrol did not affect the *SIRT1* mRNA levels in zebrafish liver (Fig. 1). A similar result was observed in the liver of Wistar rat controls treated with resveratrol, with no change detected in *SIRT1* mRNA or protein levels [50]. By contrast, in this same study, an increase was observed in the levels of *SIRT1* transcript and protein in the rats fed a low-protein, high-carbohydrate diet plus resveratrol. An increase in the SIRT1 protein level was also detected in nonstressed or nonimpaired rats treated with resveratrol (Barger, 2008). Therefore, we think that the lack of *SIRT1* mRNA modulation by resveratrol could be due to 2 factors: (1) the enzyme is modulated by resveratrol in impaired or stressed models and (2) resveratrol does not modulate SIRT1 as was previously reported [51, 52].

The regulation of SIRT1 by resveratrol may be more complex than first thought. It is not also well defined whether SIRT1 is regulated at the transcriptional, translational, or post-translational level. Previous studies have reported an increase in the enzyme level at different steps above mentioned, but most of these studies used an impaired or stressed model. Other important factors to be considered are the influence of tissue type on modulation, differences in the tissue distribution of resveratrol, the manner of compound administration, and food interference [48-50, 53, 54]

We sought to determine the effect of resveratrol on other SIRTs. To this end, we investigated the *SIRT3* and *SIRT4* genes, since both these mitochondrial enzymes are detected in metabolically active tissues, such as the liver, and are sensitive to nutrient signals.

Whether SIRT3 is modulated by resveratrol remains unclear. In rat cardiac ischemic tissue, an increase in SIRT3 protein levels was reported after 14 days of resveratrol exposure [37]. However, resveratrol inhibits the ethanol-induced increase in the *SIRT3* mRNA levels in mouse liver [55]. However, in adipocytes, resveratrol up-regulated the activity of mitochondrial genes, including *SIRT3* [56]. In a nonstressed or nonimpaired model, we observed a decrease in *SIRT3* gene expression with resveratrol treatment. In the literature, *SIRT3* regulation by resveratrol has been demonstrated in healthy experimental models; however, no studies have been performed in humans, although resveratrol is already being used as a nutraceutical compound. Furthermore, no previously reported study has demonstrated the interaction between resveratrol and *SIRT3* gene expression, as was done in the experimental model used in this study.

Most of the studies on SIRT3 and its effects on cell metabolism have employed an *SIRT3*-knockout model or have been performed under calorie restriction, with the latter intervention being known to up-regulate the SIRT3 protein [20, 22, 30, 57]. *SIRT3*<sup>-/-</sup> knockout mice appear to be phenotypically normal under baseline conditions; however, these animals showed a decrease in fatty acid oxidation, hypoglycemia, and inefficient thermogenesis under calorie restriction [57]. SIRT3 deficiency also leads to a decrease in the ATP levels in the liver, kidney, and heart cells *in vivo* [30, 57].

Among the SIRT proteins analyzed in this study, SIRT4 is still poorly understood in terms of the mechanism of its regulation. The results of this study showed a decrease in *SIRT4* gene expression in response to resveratrol (Fig. 3). SIRT4 modulation, similar to SIRT3 modulation, has been more frequently reported after fasting, and little is known about its response to resveratrol exposure. In mice, under calorie restriction, an increase in GDH activity was observed after the activation of SIRT4 was inhibited, without affecting the protein levels in the pancreas and liver [21, 58]. This increase has been associated with the stimulation of insulin secretion by amino acids. In the hepatocytes and liver of *SIRT4*-knockout mice, increases in the fatty acid oxidative capacity and mitochondrial biogenesis have been demonstrated [33]. One study showed increased levels of SIRT4 protein after treatment with resveratrol in the heart of rats after ischemia. However, the effect of this activation was not fully explained [37]. As with *SIRT3*, until now there has been no report on the interaction between resveratrol and *SIRT4* gene expression in a healthy experimental model, as was done in this study.

A known target of SIRT1 and, more recently, of SIRT3 is the transcription factor PGC1 $\alpha$ . PGC1 $\alpha$  is an important regulator of mitochondrial biogenesis and gluconeogenesis. The lack of *PGC1 $\alpha$*  mRNA modulation observed in this study is consistent with the SIRT modulation and also suggests that resveratrol does not activate SIRT1. A similar result was observed in mice after resveratrol exposure [53]. The study reported that under calorie restriction, *PGC1 $\alpha$*  gene expression did not increase in the liver of *SIRT1*<sup>-/-</sup> knockout mice unlike in their wild-type counterparts [54].

One important mechanism of SIRT activation is the biosynthesis of NAD<sup>+</sup> by NAMPT [36, 38]. Since SIRT proteins are deacetylases, their mechanism is dependent on the availability of this cofactor. In 2 other studies involving chronic exposure to resveratrol, an increase in NAMPT protein expression was observed in cardiac tissues of rats, which was accompanied by an increase in the levels of the proteins SIRT1, SIRT3, and SIRT4 [37]. In MAGI cells, resveratrol did not change either the *NAMPT* mRNA or the NAD<sup>+</sup> level, but reversed the decrease caused by HIV Tat [59]. In our study, we detected decreases in *NAMPT* gene expression (Fig. 4) and in the levels of the cofactors NAD<sup>+</sup> and NADH (Table 2). Furthermore, there was a correlation between *NAMPT* gene expression and the levels of the cofactors, which was expressed as the NAD<sup>+</sup>/NADH ratio, especially at a higher dose of resveratrol. This is reflected in the changes in protein levels or, more specifically, in activity modulation [60] mediated by resveratrol. Although at a lower concentration of resveratrol, the NAD<sup>+</sup>/NADH ratio did not change significantly, we did observe a tendency of a decreasing ratio.

As is the case with SIRT proteins, modulation of *NAMPT* gene expression will be better understood in wild-type animals, but most of the literature presents results obtained from impaired experimental models. High levels of NAMPT have been detected in pathological conditions such as obesity, atherosclerosis, and metabolic syndrome [61-63]; however, decreased levels of NAMPT have been observed in human adults with nonalcoholic fatty liver disease [64] and cirrhosis [65].

Since SIRT3 and SIRT4 are important metabolic enzymes related to glucose and insulin metabolism, more attention should be paid to these proteins both in healthy and diseased models. Given that no change was observed in the *SIRT1* gene and that the levels of *SIRT3* mRNA decreased, it is plausible that there was no modulation of *PGC1 $\alpha$*  mRNA. We also found that resveratrol influences

*NAMPT* mRNA levels and the  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ratio, and more studies are required to understand its mechanism and physiological effects in the wild-type model. An important finding was that resveratrol modulates gene expression in nonimpaired or nonstressed experimental models and *in vivo*. We have shown that the zebrafish can be a useful tool for understanding the mechanisms of SIRT and *NAMPT* metabolism and for developing therapeutic compounds. However, further investigations using healthy experimental animals are required to study the modulation of the *SIRT* and *NAMPT* genes by resveratrol before it is used as a nutraceutical compound in healthy humans.

### **Acknowledgments**

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors would like to thank their laboratory colleagues for technical assistance.

## References

1. Harikumar, K.B. and B.B. Aggarwal, *Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases*. Cell Cycle, 2008. **7**(8): p. 1020-35.
2. Howitz, K.T., et al., *Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan*. Nature, 2003. **425**(6954): p. 191-6.
3. Wood, J.G., et al., *Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans*. Nature, 2004. **430**(7000): p. 686-9.
4. Valenzano, D.R., et al., *Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate*. Curr Biol, 2006. **16**(3): p. 296-300.
5. Jang, M., et al., *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes*. Science, 1997. **275**(5297): p. 218-20.
6. Yar, A.S., et al., *The effects of resveratrol on cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNA and protein levels in diabetic rat kidneys*. Mol Biol Rep, 2010. **37**(5): p. 2323-31.
7. Marques, F.Z., M.A. Markus, and B.J. Morris, *Resveratrol: cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(11): p. 2125-8.
8. Szkudelska, K. and T. Szkudelski, *Resveratrol, obesity and diabetes*. Eur J Pharmacol, 2010. **635**(1-3): p. 1-8.
9. Patel, K.R., et al., *Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients*. Cancer Res, 2010. **70**(19): p. 7392-9.
10. Hsieh, T.C. and J.M. Wu, *Resveratrol: Biological and pharmaceutical properties as anticancer molecule*. Biofactors, 2010. **36**(5): p. 360-9.
11. Baur, J.A., *Biochemical effects of SIRT1 activators*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(8): p. 1626-34.
12. Nunes, T., et al., *Pharmacokinetics of trans-resveratrol following repeated administration in healthy elderly and young subjects*. J Clin Pharmacol, 2009. **49**(12): p. 1477-82.
13. Almeida, L., et al., *Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers*. Mol Nutr Food Res, 2009. **53 Suppl 1**: p. S7-15.
14. Sauve, A.A., et al., *The biochemistry of sirtuins*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 435-65.



15. Hernick, M. and C.A. Fierke, *Zinc hydrolases: the mechanisms of zinc-dependent deacetylases*. Arch Biochem Biophys, 2005. **433**(1): p. 71-84.
16. Lin, S.J., P.A. Defossez, and L. Guarente, *Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae*. Science, 2000. **289**(5487): p. 2126-8.
17. Michan, S. and D. Sinclair, *Sirtuins in mammals: insights into their biological function*. Biochem J, 2007. **404**(1): p. 1-13.
18. Haigis, M.C. and L.P. Guarente, *Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction*. Genes Dev, 2006. **20**(21): p. 2913-21.
19. Feige, J.N. and J. Auwerx, *Transcriptional targets of sirtuins in the coordination of mammalian physiology*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(3): p. 303-9.
20. Shi, T., et al., *SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(14): p. 13560-7.
21. Haigis, M.C., et al., *SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells*. Cell, 2006. **126**(5): p. 941-54.
22. Palacios, O.M., et al., *Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle*. Aging (Albany NY), 2009. **1**(9): p. 771-83.
23. Lombard, D.B., et al., *Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(24): p. 8807-14.
24. Imai, S. and L. Guarente, *Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: implications for metabolic diseases*. Trends Pharmacol Sci, 2010. **31**(5): p. 212-20.
25. Hallows, W.C., S. Lee, and J.M. Denu, *Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(27): p. 10230-5.
26. Schlieker, C., et al., *Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5*. J Mol Biol, 2008. **382**(3): p. 790-801.
27. Sundaresan, N.R., et al., *SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(20): p. 6384-401.
28. Shulga, N., R. Wilson-Smith, and J.G. Pastorino, *Sirtuin-3 deacetylation of cyclophilin D induces dissociation of hexokinase II from the mitochondria*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 6): p. 894-902.

29. Shi, T., G.Q. Fan, and S.D. Xiao, *SIRT3 reduces lipid accumulation via AMPK activation in human hepatic cells*. J Dig Dis, 2010. **11**(1): p. 55-62.
30. Ahn, B.H., et al., *A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(38): p. 14447-52.
31. Ahuja, N., et al., *Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase*. J Biol Chem, 2007. **282**(46): p. 33583-92.
32. Stanley, C.A., *Hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome: insights into the regulatory role of glutamate dehydrogenase in ammonia metabolism*. Mol Genet Metab, 2004. **81 Suppl 1**: p. S45-51.
33. Nasrin, N., et al., *SIRT4 regulates fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression in liver and muscle cells*. J Biol Chem, 2010.
34. Samal, B., et al., *Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(2): p. 1431-7.
35. Revollo, J.R., et al., *Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme*. Cell Metab, 2007. **6**(5): p. 363-75.
36. Yang, H., et al., *Nutrient-sensitive mitochondrial NAD<sup>+</sup> levels dictate cell survival*. Cell, 2007. **130**(6): p. 1095-107.
37. Mukherjee, S., et al., *Expression of the longevity proteins by both red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol*. Free Radic Biol Med, 2009. **46**(5): p. 573-8.
38. Hayashida, S., et al., *Fasting promotes the expression of SIRT1, an NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase, via activation of PPARalpha in mice*. Mol Cell Biochem, 2010. **339**(1-2): p. 285-92.
39. Imai, S. and W. Kiess, *Therapeutic potential of SIRT1 and NAMPT-mediated NAD biosynthesis in type 2 diabetes*. Front Biosci, 2009. **14**: p. 2983-95.
40. Zon, L.I. and R.T. Peterson, *In vivo drug discovery in the zebrafish*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(1): p. 35-44.
41. Pichler, F.B., et al., *Chemical discovery and global gene expression analysis in zebrafish*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(8): p. 879-83.
42. Barbazuk, W.B., et al., *The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes*. Genome Res, 2000. **10**(9): p. 1351-8.

43. Souto, A.A., et al., *Determination of trans - resveratrol concentrations in Brazilian Red Wines by HPLC*. Journal of Food Composition and Analysis, 2001. **14**: p. 441-445.
44. Chen, W.Y., et al., *Expression of metallothionein gene during embryonic and early larval development in zebrafish*. Aquat Toxicol, 2004. **69**(3): p. 215-27.
45. Kong, X., et al., *Sirtuin 3, a New Target of PGC-1alpha, Plays an Important Role in the Suppression of ROS and Mitochondrial Biogenesis*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11707.
46. Bowman, T.V. and L.I. Zon, *Swimming into the future of drug discovery: in vivo chemical screens in zebrafish*. ACS Chem Biol, 2010. **5**(2): p. 159-61.
47. Rosemberg, D.B., et al., *Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain*. Neuroscience, 2010. **171**(3): p. 683-92.
48. Baur, J.A., et al., *Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet*. Nature, 2006. **444**(7117): p. 337-42.
49. Lagouge, M., et al., *Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha*. Cell, 2006. **127**(6): p. 1109-22.
50. Franco, J.G., et al., *Resveratrol (RSV) reduces lipid peroxidation and increases sirtuin1 (SIRT1) expression in adult animals programmed by neonatal protein restriction*. J Endocrinol, 2010. **207**(3): p. 319-28.
51. Beher, D., et al., *Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity*. Chem Biol Drug Des, 2009. **74**(6): p. 619-24.
52. Pacholec, M., et al., *SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1*. J Biol Chem, 2010. **285**(11): p. 8340-51.
53. Barger, J.L., et al., *A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2264.
54. Chen, D., et al., *Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction*. Genes Dev, 2008. **22**(13): p. 1753-7.
55. Oliva, J., et al., *Sirt1 is involved in energy metabolism: the role of chronic ethanol feeding and resveratrol*. Exp Mol Pathol, 2008. **85**(3): p. 155-9.
56. Rayalam, S., et al., *Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes*. Phytother Res, 2008. **22**(10): p. 1367-71.

57. Hirschey, M.D., et al., *SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 121-5.
58. Chen, Y.R., et al., *Calorie restriction on insulin resistance and expression of SIRT1 and SIRT4 in rats*. Biochem Cell Biol, 2010. **88**(4): p. 715-22.
59. Zhang, H.S., et al., *Nicotinamide phosphoribosyltransferase/sirtuin 1 pathway is involved in human immunodeficiency virus type 1 Tat-mediated long terminal repeat transactivation*. J Cell Biochem, 2010. **110**(6): p. 1464-70.
60. Kelly, G., *A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 1*. Altern Med Rev, 2010. **15**(3): p. 245-63.
61. Dahl, T.B., et al., *Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization*. Circulation, 2007. **115**(8): p. 972-80.
62. Rasouli, N. and P.A. Kern, *Adipocytokines and the metabolic complications of obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(11 Suppl 1): p. S64-73.
63. Sommer, G., et al., *Visfatin/PBEF/Nampt: structure, regulation and potential function of a novel adipokine*. Clin Sci (Lond), 2008. **115**(1): p. 13-23.
64. Dahl, T.B., et al., *Intracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase protects against hepatocyte apoptosis and is down-regulated in nonalcoholic fatty liver disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(6): p. 3039-47.
65. de Boer, J.F., et al., *Plasma levels of PBEF/Nampt/visfatin are decreased in patients with liver cirrhosis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **296**(2): p. G196-201.

### Figure Legends

**Figure 1:** *SIRT1* expression in zebrafish liver after exposure to resveratrol (5 and 50 mg/L) for 30 and 60 min. The graph shows the *SIRT1*/ $\beta$ -actin ratio obtained by optical densitometry analysis [mean (SD);  $n = 4$ ]. A representative gel of RT-PCR products is also shown.

**Figure 2:** *SIRT3* and *SIRT4* expression in zebrafish liver after exposure to resveratrol (5 mg/L) for 30 min. The graph shows the *gene*/ $\beta$ -actin ratio obtained by optical densitometry analysis [mean (SD);  $n = 4$ ]. A representative gel of RT-PCR products is shown. \*, significant difference compared to the control group (unpaired  $t$  test,  $p \leq 0.05$ ).

**Figure 3:** *PGC1 $\alpha$*  expression in zebrafish liver after exposure to resveratrol (5 and 50 mg/L) for 30 and 60 min. The graph shows the *PGC1 $\alpha$* / $\beta$ -actin ratio obtained by optical densitometry analysis [mean (SD);  $n = 4$ ]. A representative gel of RT-PCR products is shown.

**Figure 4:** *NAMPT* expression in zebrafish liver after exposure to resveratrol (5 and 50 mg/L) for 30 min. The graph shows the *NAMPT*/ $\beta$ -actin ratio obtained by optical densitometry analysis [mean (SD);  $n = 4$ ]. A representative gel of RT-PCR products is shown (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test,  $p \leq 0.05$ ).

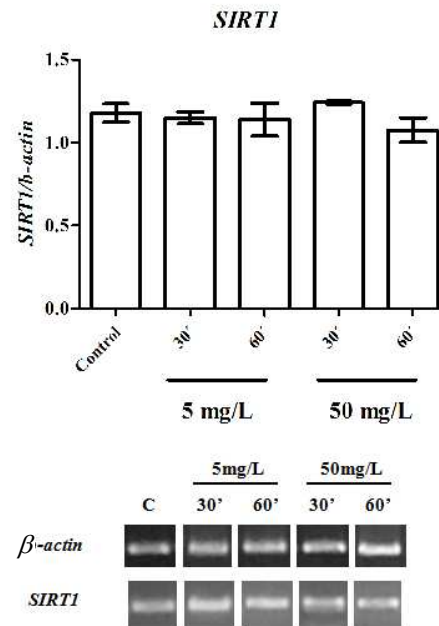


Figure 1

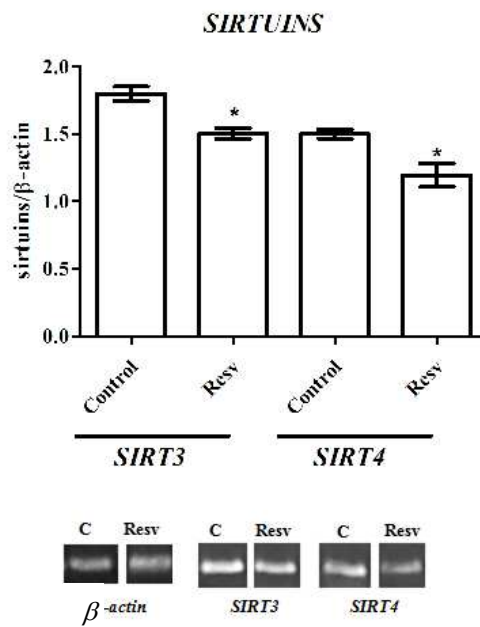


Figure 2

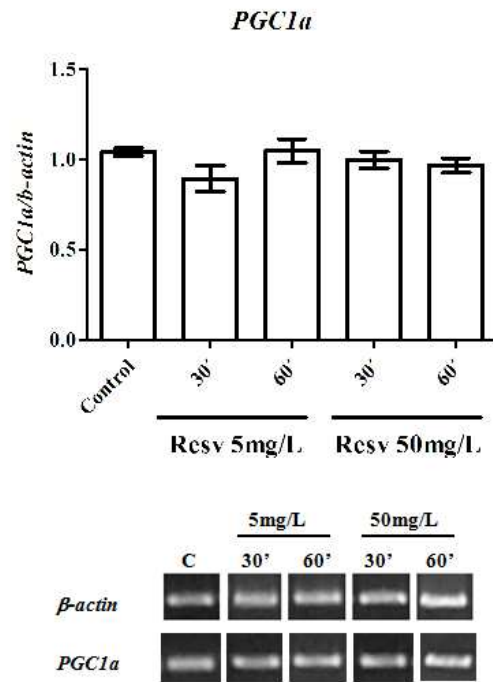


Figure 3

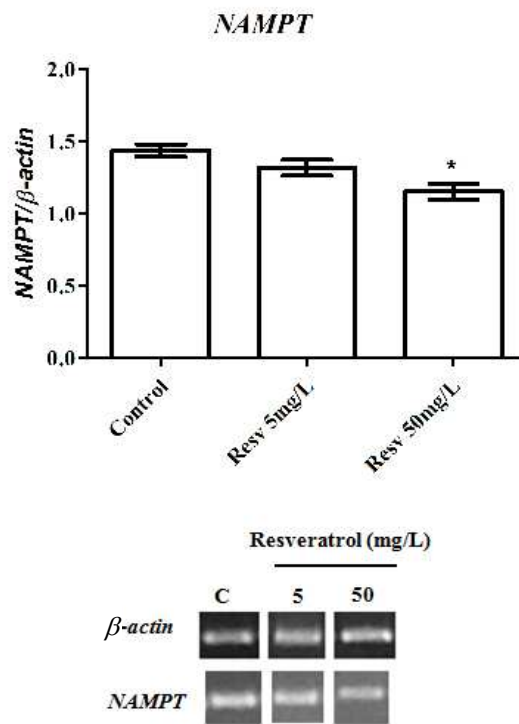


Figure 4

Table 1: PCR primers for *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT4*, *PGC1 $\alpha$* , *NAMPT* and amplification conditions

PCR Conditions		Tm (°C)	Cycles
Sirtuin	Primers (5' - 3')		
	F		
SIRT 1	- CAGCTCTGCTACAATTCATCGCGTC		
	R		
	- AATCTCTGTAGAGTCCAGCGCGTGTG	62	30
	F		
SIRT 3	- CATTAAATGTGGTGAACAAGAGGCCTG		
	R		
	- AGTTCCTCTCTTTGTAATCCCTCCGAC	61	30
	F		
SIRT 4	- TGTGGTGAAGTACTCCTCGTGCTGAGC		
	R		
	- CGGAAGTTTTCTTTCACTAGCAGCGAGG	63	30
	F		
PGC1a	- CCCCTTTGCCCTGACCTGCCTGAG		
	R		
	- GAAGGACAGCTCTGATCACTGGCATTGG	62	35
	F		
NAMPT	- GGAAGCAAAGGAAGTGTACCGGGAAC		
	R		
	- TCGTGCAGCTTATATTCAAGCCCGTC	59	35

Tm: Melting temperature.

Table 2. Levels of NAD<sup>+</sup>/NADH ratio, in the wild-type zebrafish liver, after resveratrol treatment. The results of NAD<sup>+</sup> and NADH are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 4).

	NAD <sup>+</sup>	NADH	NAD <sup>+</sup> /H
<b>Control</b>	2,91 $\pm$ 0,72	4,34 $\pm$ 1,90	0,67
<b>5mg/L</b>	2,92 $\pm$ 0,28	6,17 $\pm$ 1,04	0,47
<b>50mg/L</b>	3,13 $\pm$ 0,71	7,32 $\pm$ 2,75	0,43



## CAPÍTULO 3

Artigo científico submetido à revista *Zebrafish*

**Modulation of *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT4*, *PGC1 $\alpha$*  and *PPAR $\gamma$*  in Wild-type Adult Zebrafish Subjected to Calorie Restriction**

Helena Schirmer<sup>1,2</sup>, Talita Carneiro Brandão Pereira<sup>3</sup>, Eduardo Pacheco Rico<sup>4</sup>, Denis Broock Rosemberg<sup>4</sup>, Carla Denise Bonan<sup>5</sup>, Maurício Reis Bogo<sup>3</sup>, André Arigony Souto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química Pura, Faculdade de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Biomedicina, Universidade Feevale – RS 239, 2755, 93352-000, Novo Hamburgo, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681, Prédio 12C, Sala 172. 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>5</sup>Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681, Prédio 12D, 3º Andar. 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

\* Corresponding author: arigony@puers.br

Tel: +55-51-3320-3549

Fax: +55-51-3320-3549

**Abstract**

Zebrafish, a small teleost of easy maintenance and manipulation, have been extensively used in biomedical research but, the adult vertebrate yet is few explored. Calorie restriction (CR) is a known intervention that provides healthy benefits extending life-span in several models and preventing age-related diseases in mammals. Resveratrol is a compound with health benefits that is able to mimic CR effects. Both interventions have mechanisms related to sirtuin modulation, especially with SIRT1 and transcription factors that regulate cellular metabolism pathways. Thus, we sought to analyze mRNA levels of *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT4*, *PGC1 $\alpha$*  and *PPAR $\gamma$*  in liver and skeletal muscle of wild-type adult zebrafish after CR. Additionally; we compared the SIRTs gene expression pattern following CR and resveratrol. Using sqRT-PCR after CR, we detected a decrease in mRNA levels of *SIRT3*, *SIRT4* and *PGC1 $\alpha$*  but not in *SIRT1*, in both tissues analyzed. As expected, we observed a reduction in *PPAR $\gamma$*  mRNA levels in liver, but not in muscle after CR. Resveratrol showed a similar gene expression pattern to that presented by CR upon SIRTs modulation. Thereby, the zebrafish can be used as an experimental model organism to help to understand the CR mechanism. Furthermore, it is possible to conclude that resveratrol can exert health benefits similar to CR effects, by acting not in SIRT1, but in other SIRTs members.

**Keywords:** Calorie Restriction, Sirtuins, *Pgc1 $\alpha$* , *PPAR $\gamma$* , zebrafish, resveratrol

## Introduction

*Zebrafish* a small vertebrate of easy maintenance and manipulation has been used as model organism in different biomedical research, particularly in developmental and genetic studies [1]. However, the mature fish as experimental model is unexplored, despite their tremendous potential as an animal model for diseases that occurs in later life [2]. The genes of this teleost are highly conserved, sharing 70-80% of those human [3] so, representing an important tool as a model to human in aging diseases.

Caloric restriction diet, is a know intervention that influences the lifespan and delay or prevent age diseases in animals [4]. This intervention was firstly described by promoting metabolic fitness, long life and disease protection in rodent models [5, 6]. Since then, several studies shows the effects of CR in different models but, the majority still use rodents as experimental model [7-9] and, zebrafish has been few explored to it diet intervention [10-12]. The physiological effects of CR, in yeast cells, were related with the regulation of Sir2p [13] and, in mammalians cells with the homolog SIRT1, where both are dependent of NAD<sup>+</sup> [13-16].

Resveratrol, a polyphenol demonstrated as the most potent SIRT1 activator, was related by extended the lifespan of evolutionary distant species including *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster* in a SIR2 manner dependent [17, 18]. In a vertebrate fish, the compound extendend the lifespan in 59%, but the mechanism was not related [19]. And in rodents, resveratrol improved health and survival of mice subject a high fat diet, but not in chow fed animals [20].

Based on the mechanism related to resveratrol as SIRT regulation and, in health benefits observed, this polyphenol was shown by mimic CR diet [20, 21]. However it comparison is more complex than firstly reported and has been demonstrated that resveratrol, in low doses, mimic partially the CR diet and, it is independent of SIRT1 modulation [7]. Also, have been demonstrated that the ability of resveratrol to activate yeast Sir2 or mammal SIRT1 is substrate-specific *in vitro* [22] and resveratrol has no effect on Sir2 activity *in vivo* [23-25].

Sirtuin/Sir2 is a family of NAD<sup>+</sup> - dependent deacetylases and mono – ADP – ribosyltransferases that mediate cellular physiological effects. In mammals, seven sirtuins genes have been identified [26, 27] and, SIRT1 regulates metabolic processes as insulin production, fat metabolism and cell survival [24]. Despite SIRT1 modulation is

the most studied in CR and resveratrol intervention, other sirtuins, as SIRT3 and SIRT4, also can be involved in those interventions and can provided health benefits.

SIRT3 and SIRT4 are mitochondrial enzymes related to maintain survival cell, survivorship among the elderly, increase chronological age [28-31]. Recently a report suggested that SIRT3-dependent mitochondrial adaptations may be a central mechanism of aging retardation in mammal [32]. So, the comprehension of the molecular mechanism of it sirtuins, modulate by CR and resveratrol, could be aid to developmental of therapeutic tool, in the future.

So, being SIRT1 related to be modulated by CR and resveratrol in rodents and, has not been explored in wild-type adult zebrafish, we sought to compare if our experimental model shown the similar pattern expression of *SIRT1* in both interventions. Also, we also sought analyzed if CR and resveratrol can modulate the gene expression of *SIRT3*, *SIRT4* and two transcription factors *PGC1 $\alpha$*  and *PPAR $\gamma$*  in liver and muscle of adult wild-type zebrafish.

## **Material and Methods**

### **2.1. Animals**

Adult wild-type zebrafish (*Danio rerio*) of both sexes were obtained from a commercial supplier (Delphis, Porto Alegre, RS, Brazil). All the fish were acclimated in a 50-L thermostated aquarium for 2 weeks, under a 14 h/10 h light/dark controlled photoperiod. The fishes were fed twice a day with flake fish food (Alcon Basic®, Alcon, Brazil). All animal manipulations were in accordance with the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals, and all procedures in the present study were approved by the Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUC-RS), license number 08/00082.

### **2.2. Calorie restriction**

For the CR diet, the fishes were placed in a 20L aquarium during 14 days, and completely deprived of food, according to Novak et al. [10]. In this period none of the fishes died and, apparently we did not observe any behavioral change. In the end of diet intervention, zebrafish liver (n = 4) and muscle (n=4) were dissected and immediately

frozen in liquid nitrogen to after analysis. Each independent experiment was performed using a pool of five liver and three muscles. The animals of the control group were kept during 14 days in distilled water and were feed normally.

### 2.3 Resveratrol Exposure

For the resveratrol treatment, we used wild-type zebrafish that were not treated with any other substance or any other intervention. The fish were exposed to solutions with 2 different resveratrol concentrations (5 mg/L and 50 mg/L). Resveratrol was dissolved in 100  $\mu$ L of ethanol and then homogenized in 2 L of distilled water for 1h for complete solubilization. A preliminary study was performed to verify whether the vehicle could affect the gene expression; no significant change was noted when compared to the effect observed in water control (data not shown). For resveratrol exposure, the fish were transferred to water containing the compound for 30 or 60 min, and the aquariums were completely covered to avoid degradation of the compound by ultraviolet light. The control group was kept for 1h in distilled water. At the end of the treatment, zebrafish livers ( $n = 4$ ) were dissected and immediately frozen in liquid nitrogen for later analysis. Each independent experiment was performed using a pool of 5 livers. *SIRT3* and *SIRT4* levels were analyzed after 30 min of exposure to 5 mg/L resveratrol.

### 2.4. Semiquantitative RT-PCR analysis

After harvesting the liver and muscle, total RNA was isolated with the TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen) in accordance with the manufacturer instructions. The purity of the RNA was spectrophotometrically quantified by calculating the ratio between absorbance values at 260 and 280 nm. Afterwards all samples were adjusted to 160 ng/ $\mu$ L and cDNA species were synthesized with SuperScript<sup>™</sup> III First-Strand (Synthesis System for RT-PCR) from Invitrogen, following the manufacturer's instructions. Each RNA sample (2  $\mu$ g/mL) was mixed with 1  $\mu$ L of 50  $\mu$ M Oligo(dT) and 1  $\mu$ L of Annealing Buffer up to a final volume of 8  $\mu$ L. Samples were incubated at 65°C for 5 minutes in a thermal cycler, following a 1 minute step on ice, when 10  $\mu$ L of 2X First-Strand Reaction Mix and 2  $\mu$ L of SuperScript<sup>™</sup> III/RNaseOUT<sup>™</sup> Enzyme Mix were added. Products were incubated for 50 minutes at 50°C and further incubated at 85°C for 5 minutes. For the PCR reaction the optimum conditions were determined

for each pair of primers. The  $\beta$ -actin primers were designed as described by Chen et al. [42] and the reactions were performed in a final volume of 20  $\mu$ L. *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT4*, *PGC1 $\alpha$*  and *PPAR $\gamma$*  primers were designed using the Oligos 9.6 program, and the reactions were performed in a final volume of 25  $\mu$ L. The *gene*/ $\beta$ -actin ratio was determined, after electrophoresis on a 1.0% agarose gel stained with GelRed<sup>®</sup> and visualization under ultraviolet light, using ImageJ1.37 for Windows. Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) was used as a molecular marker.

## 2.5. Statistical analysis

Data processing and statistical analysis were performed using GraphPad Prism 5 to generate tables and graphs shown in the text, and to perform appropriate statistical tests. The optical densitometry results were expressed as mean  $\pm$  S.D. and statistically compared by unpaired *t* test, considering  $P \leq 0.05$  as significant.

## Results and Discussion

### 3.1 Calorie restriction did not modulate *SIRT1* mRNA levels in liver or muscle of adult wild-type zebrafish

The health benefits provided by CR diet was firstly related to be dependent of SIRT1 in lower organisms and rodents but, have not been reported in adult zebrafish. In our experimental model we did not detected change in mRNA levels of *SIRT1* after CR, in none of the tissues analyzed (Fig 1 and 2). In accordance with our results, the lack of modulation in *SIRT1* mRNA levels also have been reported in heart [33], liver [34], brain, kidney, muscle and WAT of mice [9]. However, in skeletal muscle of human [16], human mononuclear [35] and liver of mice [36], up regulated of it transcripts were reported.

One hypothesis to our results is that CR acts at protein level or activity improves of SIRT1, rather than gene expression. But, still is not clear in which level CR modulate it enzyme and have been described in all levels. In liver of mice, no change was detected in the mRNA and protein levels of SIRT1, after CR [34]. However in brain, kidney, muscle and WAT of mice the SIRT1 protein was up regulated, although there was no change in mRNA levels [9, 37].

The regulation of SIRT1 by CR is complex and not well understood. One reported showed that the global gene expression can be different according with the tissue analyzed [38]. And, in mice, have been described that SIRT1 protein levels is tissue dependent, being observed increase in the muscle and white adipose tissue and decrease in the liver [8]. At gene expression level, we did not detected regulation tissue dependent to SIRT1.

Furthermore, beyond tissue-specific, the modulation can be contextual model and may be related to the time of analysis, after the start of the scheme, once was reported that half of the eventual changes in gene expression were detectable at 2 weeks of intervention [34]. To comprehension the *SIRT1* gene expression in zebrafish further studies will be necessary, once it the first that analyzed the interaction of CR and *SIRT1* gene expression.

### **3.2 *SIRT3* and *SIRT4* were down regulated by calorie restriction in liver and muscle of adult wild-type zebrafish**

The role of another sirtuins in CR effects is not well established. One report showed that survival maintenance of the cell was dependent of SIRT3 and SIRT4 after dietary restriction [31]. As zebrafish is not explored to SIRTs expression modulation by CR, we determine the gene expression of the mitochondrial sirtuins, in two different tissues after diet intervention. Although have been described that it SIRTs are up regulated by CR, in our experimental model we detected down regulation of both SIRTs in both analyzed tissues (Fig 1 and 2),

Sirtuin 3 is the main mitochondrial deacetylase and, CR leads to increases in transcriptional and proteins levels of it SIRT, in white and brown adipose tissue of mice [39]. Also, in mice, subjected to it diet intervention was reported up regulation of SIRT3 protein in muscle [40], liver and brown adipose tissue, but not in brain, heart or kidney [41]. To SIRT4, little is known and, in mice pancreatic islets was observed decrease in SIRT4 proteins [42]. However, did not change was observed in pancreatic islets of rats after 21 days of CR [43].

Mitochondria are central to cellular metabolism, and mitochondrial dysfunction has been linked to several age related diseases [44]. SIRT3 and SIRT4 are referred to be sensors that can modulate the activity of several proteins of this organelle involved in metabolism and, need to be more explored after CR modulation. The increased of



SIRT3 has been related to several metabolic events as adaptative thermogenesis, reduced free radical levels, increase of mitochondrial respiration [39], ATP regulation levels and gluconeogenesis [45], cellular survival after stress [31] and, lipid accumulation [46]. Recently, was demonstrated that SIRT3 enhanced the mitochondrial antioxidant defense, during CR and, may be a central mechanism of aging retardation in mammals [32].

As, in our experimental model, we detected decreased in SIRT3 gene expression levels would be interesting investigate if it would reflect in protein and physiologic change after CR intervention. In fasted mice, under standard laboratory conditions the loss of SIRT3 did not affect overall metabolism and adaptative thermogenesis [47]. However, in liver of mice receiving high fat diet, the SIRT3 activity but not protein decrease affected fatty accumulated [48]. Still, we observed modulation of SIRT3 in adult zebrafish after CR so it experimental model could aid to understand the effects of it diet intervention in this mitochondrial enzyme.

SIRT4 is an enzyme associated with insulin regulation and increase of it protein inhibit GDH enzyme that converts glutamate in  $\alpha$ -ketoglutarate and ammonia in different tissues [42, 49]. One report also showed that SIRT4 is implicated in lipid storage, where reduced levels of SIRT4 increased the mitochondrial and fatty acid metabolism in hepatocytes and liver, and improved mitochondrial function in muscle [50]. Also, knockout SIRT4 was showed to improve the insulin blood levels [42]. In zebrafish we detected decrease of *SIRT4* mRNA after CR, which could reflect in benefits in insulin regulation.

### **3.3 Calorie restriction modulate gene expression levels of *PGC1 $\alpha$* and *PPAR $\gamma$***

Calorie restriction, by modulate SIRT1 and some transcription factors, has been associated with several metabolic effects as gluconeogenesis and lipolysis, so providing health benefits. The protein SIRT1 and SIRT3 has been described to regulate gluconeogenesis and mitochondrial biogenesis by act in *PGC1 $\alpha$*  [51, 52] and, SIRT1 regulate lipolysis by act in *PPAR $\gamma$*  [37], among other proteins. So we determine the gene expression of both transcriptions factors in liver and muscle of wild-type adult zebrafish subjected to CR. It diet intervention significantly decreased the *PGC1 $\alpha$*

mRNA levels in both tissues analyzed. To *PPAR $\gamma$*  gene, only in the liver, was detected decreasing in mRNA levels (Fig 3).

The PGC1 $\alpha$  is a transcription factor responsive to multiple diverse stimuli, among them changes in nutrient availability [53]. In male mice, after CR, the levels of *PGC1 $\alpha$*  mRNA were up regulated in brain, liver, heart and brown adipose tissue [15]. In liver of mouse was detected increase of mRNA and protein levels, accompanied by SIRT1 protein increase [37]. Did not change in *PGC1 $\alpha$*  mRNA levels was described in heart and white adipose tissue, of rats after CR diet intervention [38]. After CR diet we would expected an increase in PGC1a gene expression, once it regulate the energy metabolism. In our experiment we saw a decrease in both tissues analyzed and, its expressions would agree with SIRTs modulation.

One of the most life-extending benefits of CR can be attributed to decrease of fat stores, being observed the loss of fat mass in calorically restriction animals [54]. In part, its effect has been associated with SIRT1 deacetylase activity that represses PPAR $\gamma$ , an important transcription factor that promotes lipid storage and preadipocyte differentiation to mature adipocytes [55]. In our study, we detected decrease in *PPAR $\gamma$*  mRNA levels in liver but not in muscle. Its results suggest one possible modulation in lipid metabolism in the zebrafish liver when subject to CR. In a recent report using zebrafish model diet induced obesity (DIO) was showed that it vertebrate share a common pathway in lipid metabolism, as PPAR $\gamma$  expression [11]. So, the zebrafish can be an important experimental model to aid to elucidate the metabolism modulation provided by CR.

### **3.4 Resveratrol and CR in the SIRTs gene expression modulation in the liver of wild-type adult zebrafish**

As was proposed in other experimental model and *in vitro* experiments, resveratrol is an important SIRT1 activator, thus mimics CR diet. So, we compared the pattern of SIRTs gene expression modulated by resveratrol and CR in the zebrafish liver. In previous study, we did not detect change in *SIRT1* mRNA levels, when compared with the control, after exposition of two different concentrations of resveratrol when compared with the control. Similar we saw after CR intervention.

In agreement with our results, in heart of mice neither CR nor physiological doses of resveratrol modulated SIRT1 gene expression [33]. In other research also was reported that resveratrol could act by another pathway than SIRT1, in yeast cells [24]. So, as Barger et al., we also can suggested that the modulation of SIRT1 activity may not be essential to elicit a biological response by CR, neither with low and, in our study also high dose of resveratrol.

Is unexplored the comparison of gene expression of other sirtuins after CR and resveratrol treatment. So we analyzed SIRT3 and SIRT4 mRNA levels after both interventions. Both CR (Fig. 1) and resveratrol treatment (previous result) decreased the gene expression of those sirtuins, in liver of adult zebrafish. As it two mitochondrial enzymes are responsible by metabolism regulation, furthermore studies will be interesting to the comprehension of the protein and physiological effect of it modulation, in zebrafish experimental model.

In zebrafish liver we observed similar pattern of gene expression in all sirtuins here analyzed after CR and resveratrol treatment. Our results can suggest that other sirtuins, as the mitochondrial SIRT3 and SIRT4, can be important regulators of the effects mediate by CR and resveratrol exposure, but other researches are need to confirm it. In our experimental model resveratrol mimicked CR diet intervention in the SIRTs gene expression and, zebrafish can be an interesting toll to aid in the comprehension of resveratrol and CR mechanism.

According with our results we conclude that wild-type adult zebrafish, an can be useful as experimental model to understand the mechanism of CR and resveratrol intervention. Here, we not detected gene expression tissue-dependent to any sirtuin analyzed after CR, but we saw that it intervention modulate *SIRT3* and *SIRT4* gene expression. So, further studies will be necessary to understand this mechanism. As *PGC1 $\alpha$*  mRNA levels were decreased here, is important to detected how the metabolism is maintenance, hence it transcription factor is related with gluconeogenesis in fasted experimental model. And, with *PPAR $\gamma$*  mRNA levels decreased, in the liver, we suggested that in lipid metabolism CR act by the same pathway in zebrafish than rodents. And last, in liver of zebrafish, resveratrol showed a similar gene expression of SIRTs than CR, suggesting that the compound act by similar pathway but by modulation of other sirtuins, rather than SIRT1.

### **Acknowledgments**

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors would like to thank their laboratory colleagues for technical assistance.

## References

1. Zon, L.I. and R.T. Peterson, *In vivo drug discovery in the zebrafish*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(1): p. 35-44.
2. Keller, E.T. and J.M. Murtha, *The use of mature zebrafish (Danio rerio) as a model for human aging and disease*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2004. **138**(3): p. 335-41.
3. Barbazuk, W.B., et al., *The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes*. Genome Res, 2000. **10**(9): p. 1351-8.
4. Koubova, J. and L. Guarente, *How does calorie restriction work?* Genes Dev, 2003. **17**(3): p. 313-21.
5. McCay, C., M. Crowell, and L. Maynard, *The effect of retarded growth upon the length of lifespan and upon the ultimate size*. J Nutr 1935. **10**: p. 63-79.
6. Weindruch, R. and R.L. Walford, *Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence*. Science, 1982. **215**(4538): p. 1415-8.
7. Barger, J.L., et al., *A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2264.
8. Chen, D., et al., *Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction*. Genes Dev, 2008. **22**(13): p. 1753-7.
9. Kanfi, Y., et al., *Regulation of SIRT1 protein levels by nutrient availability*. FEBS Lett, 2008. **582**(16): p. 2417-23.
10. Novak, C.M., et al., *Caloric restriction and physical activity in zebrafish (Danio rerio)*. Neurosci Lett, 2005. **383**(1-2): p. 99-104.
11. Oka, T., et al., *Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity*. BMC Physiol, 2010. **10**(1): p. 21.
12. Jury, D.R., et al., *Effects of calorie restriction on the zebrafish liver proteome*. Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics, 2008. **3**(4): p. 275-82.
13. Lin, S.J., P.A. Defossez, and L. Guarente, *Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae*. Science, 2000. **289**(5487): p. 2126-8.
14. Cohen, H.Y., et al., *Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase*. Science, 2004. **305**(5682): p. 390-2.
15. Nisoli, E., et al., *Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS*. Science, 2005. **310**(5746): p. 314-7.
16. Civitarese, A.E., et al., *Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans*. PLoS Med, 2007. **4**(3): p. e76.
17. Howitz, K.T., et al., *Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan*. Nature, 2003. **425**(6954): p. 191-6.
18. Wood, J.G., et al., *Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans*. Nature, 2004. **430**(7000): p. 686-9.
19. Valenzano, D.R. and A. Cellerino, *Resveratrol and the pharmacology of aging: a new vertebrate model to validate an old molecule*. Cell Cycle, 2006. **5**(10): p. 1027-32.

20. Baur, J.A., et al., *Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet*. Nature, 2006. **444**(7117): p. 337-42.
21. Lagouge, M., et al., *Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha*. Cell, 2006. **127**(6): p. 1109-22.
22. Borra, M.T., B.C. Smith, and J.M. Denu, *Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17187-95.
23. Beher, D., et al., *Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity*. Chem Biol Drug Des, 2009. **74**(6): p. 619-24.
24. Kaeberlein, M., et al., *Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17038-45.
25. Pacholec, M., et al., *SIRT1720, SIRT2183, SIRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1*. J Biol Chem, 2010. **285**(11): p. 8340-51.
26. Frye, R.A., *Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **260**(1): p. 273-9.
27. Frye, R.A., *Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **273**(2): p. 793-8.
28. Rose, G., et al., *Variability of the SIRT3 gene, human silent information regulator Sir2 homologue, and survivorship in the elderly*. Exp Gerontol, 2003. **38**(10): p. 1065-70.
29. Bellizzi, D., et al., *A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages*. Genomics, 2005. **85**(2): p. 258-63.
30. Zino, S.M.W., *Investigations into the expression of sirtuins in breast cancer: in vivo and in vitro studies* 2010.
31. Yang, H., et al., *Nutrient-sensitive mitochondrial NAD<sup>+</sup> levels dictate cell survival*. Cell, 2007. **130**(6): p. 1095-107.
32. Someya, S., et al., *Sirt3 Mediates Reduction of Oxidative Damage and Prevention of Age-Related Hearing Loss under Caloric Restriction*. Cell, 2010. **143**: p. 802-812.
33. Barger, J.L., et al., *Short-term consumption of a resveratrol-containing nutraceutical mixture mimics gene expression of long-term caloric restriction in mouse heart*. Exp Gerontol, 2008. **43**(9): p. 859-66.
34. Mulligan, J.D., A.M. Stewart, and K.W. Saupe, *Downregulation of plasma insulin levels and hepatic PPARgamma expression during the first week of caloric restriction in mice*. Exp Gerontol, 2008. **43**(3): p. 146-53.
35. Crujeiras, A.B., et al., *Sirtuin gene expression in human mononuclear cells is modulated by caloric restriction*. Eur J Clin Invest, 2008. **38**(9): p. 672-8.
36. Hayashida, S., et al., *Fasting promotes the expression of SIRT1, an NAD<sup>+</sup> - dependent protein deacetylase, via activation of PPARalpha in mice*. Mol Cell Biochem, 2010. **339**(1-2): p. 285-92.
37. Rodgers, J.T., et al., *Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1*. Nature, 2005. **434**(7029): p. 113-8.
38. Linford, N.J., et al., *Transcriptional response to aging and caloric restriction in heart and adipose tissue*. Aging Cell, 2007. **6**(5): p. 673-88.

39. Shi, T., et al., *SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(14): p. 13560-7.
40. Palacios, O.M., et al., *Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle*. Aging (Albany NY), 2009. **1**(9): p. 771-83.
41. Hirschey, M.D., et al., *SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 121-5.
42. Haigis, M.C., et al., *SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells*. Cell, 2006. **126**(5): p. 941-54.
43. do Amaral, M.E., et al., *Reduced expression of SIRT1 is associated with diminished glucose-induced insulin secretion in islets from calorie-restricted rats*. J Nutr Biochem, 2010.
44. Smith, B.C., et al., *SIRT3 Substrate Specificity Determined by Peptide Arrays and Machine Learning*. ACS Chem Biol, 2010.
45. Schlicker, C., et al., *Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5*. J Mol Biol, 2008. **382**(3): p. 790-801.
46. Shi, T., G.Q. Fan, and S.D. Xiao, *SIRT3 reduces lipid accumulation via AMPK activation in human hepatic cells*. J Dig Dis, 2010. **11**(1): p. 55-62.
47. Lombard, D.B., et al., *Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(24): p. 8807-14.
48. Kendrick, A.A., et al., *Fatty liver is associated with reduced SIRT3 activity and mitochondrial protein hyperacetylation*. Biochem J, 2010.
49. Ahuja, N., et al., *Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase*. J Biol Chem, 2007. **282**(46): p. 33583-92.
50. Nasrin, N., et al., *SIRT4 regulates fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression in liver and muscle cells*. J Biol Chem, 2010.
51. Nemoto, S., M.M. Fergusson, and T. Finkel, *SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1{alpha}*. J Biol Chem, 2005. **280**(16): p. 16456-60.
52. Kong, X., et al., *Sirtuin 3, a New Target of PGC-1alpha, Plays an Important Role in the Suppression of ROS and Mitochondrial Biogenesis*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11707.
53. Feige, J.N. and J. Auwerx, *Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(6): p. 292-301.
54. Barzilai, N. and I. Gabriely, *The role of fat depletion in the biological benefits of caloric restriction*. J Nutr, 2001. **131**(3): p. 903S-906S.
55. Floyd, Z.E., et al., *Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma stability and transcriptional activity in adipocytes by resveratrol*. Metabolism, 2008. **57**(7 Suppl 1): p. S32-8.

## Figure Legends

**Figure 1:** *SIRT6* expression in zebrafish liver after CR diet intervention. The graph shows the *SIRT6*/ $\beta$ -actin ratio obtained by optical densitometry analysis [mean (SD);  $n = 4$ ]. A representative gel of RT-PCR products is also shown. <sup>a, b</sup> significant difference compared to the control group (unpaired  $t$  test,  $p \leq 0.05$ ).

**Figure 2:** *SIRT6* expression in zebrafish muscle after CR diet intervention. The graph shows the *SIRT6*/ $\beta$ -actin ratio obtained by optical densitometry analysis [mean (SD);  $n = 4$ ]. A representative gel of RT-PCR products is shown. <sup>a, b</sup> significant difference compared to the control group (unpaired  $t$  test,  $p \leq 0.05$ ).

**Figure 3:** *PGC1 $\alpha$*  and *PPAR $\gamma$*  expression in zebrafish liver and muscle after CR diet intervention. The graph shows the *genes*/ $\beta$ -actin ratio obtained by optical densitometry analysis [mean (SD);  $n = 4$ ]. White bar represents liver tissue and gray bar muscle tissue. <sup>a, b</sup> significant difference compared to the control group (unpaired  $t$  test,  $p \leq 0.05$ ). A representative gel of RT-PCR products is shown.



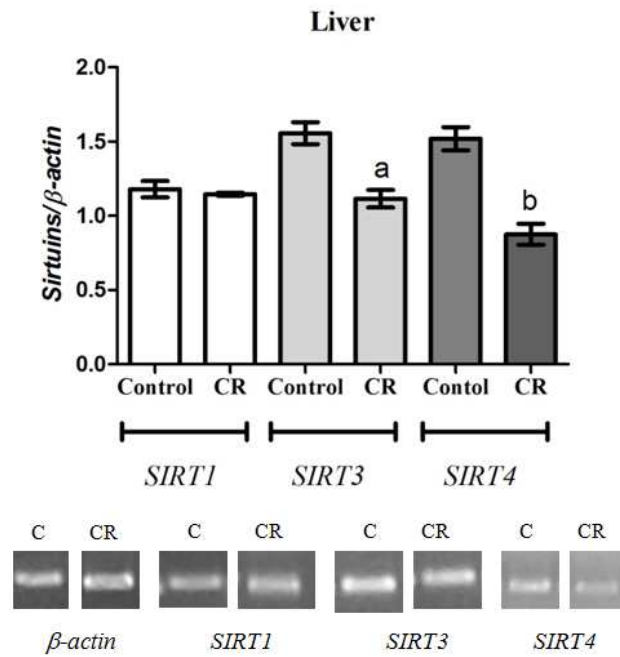


Figure 1

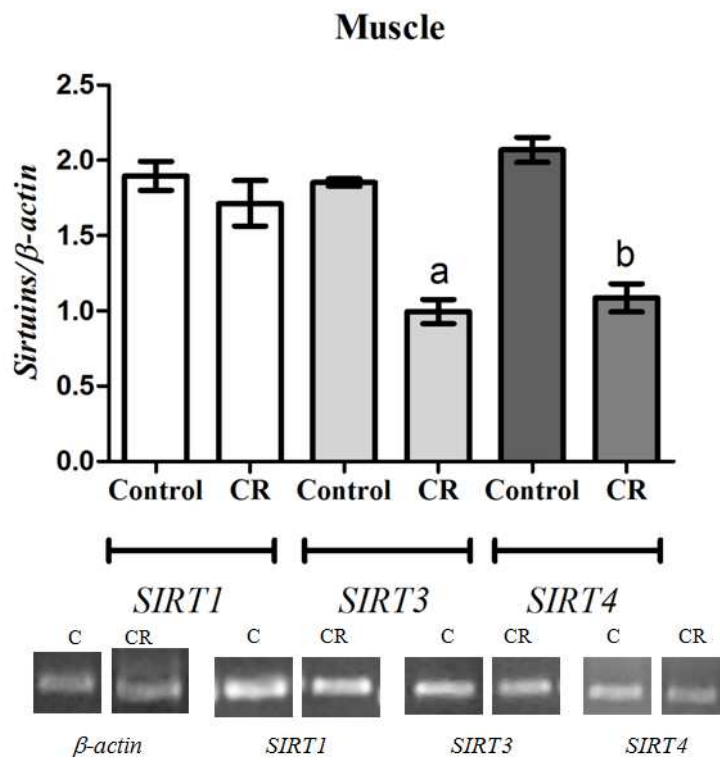


Figure 2

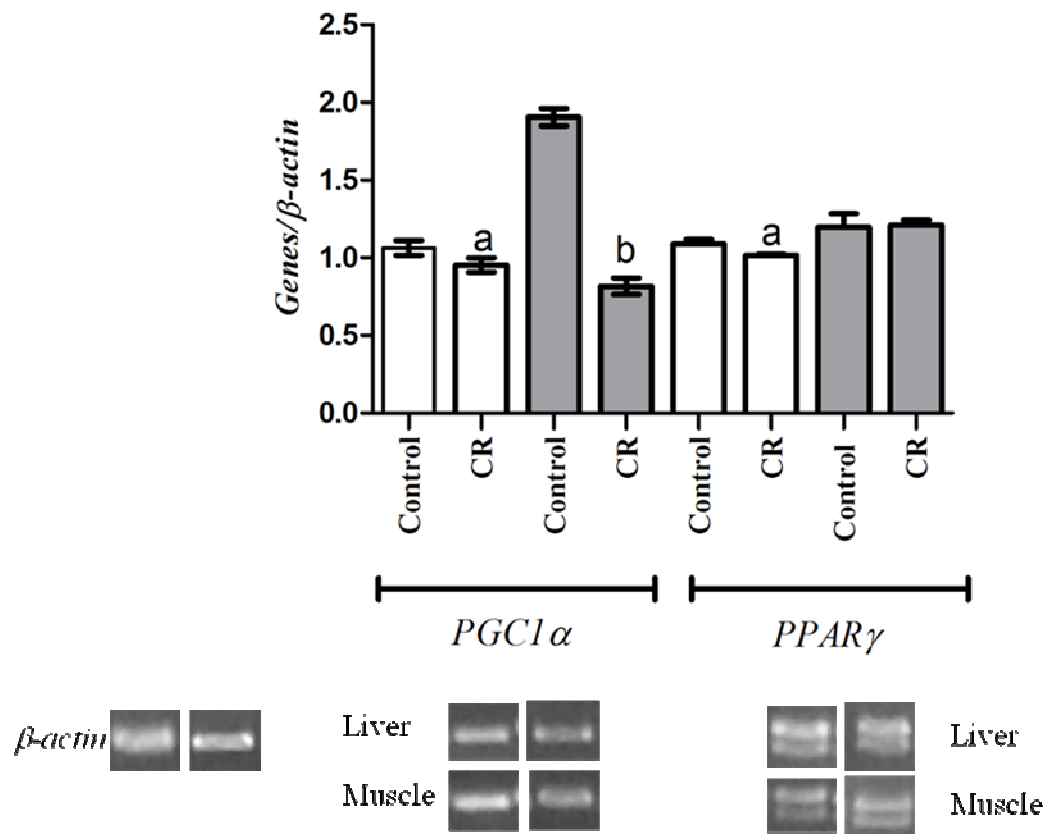


Figure 3

## CAPÍTULO 4

Manuscrito em preparação: Efeito de resveratrol e etanol na transcrição de *Sirtuínas*,  
*PGC1 $\alpha$*  e *NAMPT*

## MATERIAIS E MÉTODOS

### TRATAMENTOS DE RESVERATROL E ETANOL

Foram realizados, para ambos compostos, tratamento agudo e crônico. No tratamento agudo, os animais foram expostos durante 1h, aos compostos e no tratamento crônico, durante 14 dias. No tratamento crônico, os aquários eram limpos e o composto adicionado a cada dois dias. Os animais, em ambos tratamentos, foram divididos em 4 grupos: (i) controle, (ii) resveratrol, (iii) etanol e; (iv) resveratrol mais etanol.

Os animais do grupo controle foram mantidos em água destilada durante 1h ou 14 dias até serem eutanasiados. Para o tratamento com resveratrol, foi utilizada uma concentração de 20 mg/L, em ambos grupos que receberam este composto. Nos grupos que foram expostos ao etanol foi utilizada solução de 1% em água destilada. No grupo, resveratrol + etanol, os animais foram expostos aos dois compostos simultaneamente, em ambos os tempos de exposição.

Para o preparo da solução de resveratrol 20 mg/L do composto foram dissolvidos em 100 µL de etanol e, então, homogeneizados em 2L de água destilada até completa solubilização. Os aquários dos animais que foram expostos ao polifenol foram vedados para evitar degradação do composto pela luz ultravioleta. Os animais utilizados neste estudo faziam parte de um estudo prévio e já em andamento onde outras análises foram realizadas utilizando outros órgãos; isso justifica porque a dose do composto utilizada nestes experimentos foi diferente das citadas anteriormente no Capítulo 2.

### ANÁLISE DE RT-PCR SEMIQUANTITATIVO

Para análise transcricional, após o tratamento, os fígados foram dissecados (n=4) e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Para cada experimento foi realizado um “pool” de 5 fígados. Para ambos tratamentos, agudo e crônico, foram realizadas análises transcricionais para *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT4*, *NAMPT* e *PGC1α*. A metodologia utilizada foi a mesma já descrita no capítulo 3 e 4.

## **ANÁLISE DE ACETILAÇÃO DE PROTEÍNA H3-LYS9**

### **PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS**

Após o tempo de tratamento, os fígados foram dissecados (n=3) e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Cada experimento foi realizado com um “pool” de 5 fígados. O extrato de células foi preparado utilizando tampão RIPA (25 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.1% SDS; 1.0% deoxicolato de sódio; 1.0% Triton X-100) contendo inibidores de proteases (Roche). As amostras foram homogeneizadas até a obtenção de uma solução levemente transparente. A concentração de proteína de cada uma das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976).

### **WESTERN-BLOTTING**

Foram adicionadas quantidades iguais de proteínas (25 µg) de cada extrato para 7,5% SDS-gel de poliacrilamida e, por eletroforese, posteriormente transferidos a uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com 5% de solução de leite em pó em PBS, contendo 0,02% Tween-20 e incubada “overnight” com os seguintes anticorpos: Rabbit monoclonal anti acetyl-histone H3 (Lys9) (Cell Signaling C5B11), mouse anti-β-actina (abcam) ambos na diluição 1:5000. Como anticorpos secundários foram utilizados: goat anti-mouse IgG (invitrogen: G21040) e Goat anti-rabbit (abcam ab6721), ambos HRP (horseradish peroxidase), na concentração de 1:2000. As bandas foram detectadas utilizando kit de quimioluminescência (PerkinElmer, Lifesciences). Um marcador de peso molecular foi utilizado para determinar o peso molecular das bandas de interesse. A intensidade das bandas foi determinada utilizando-se o programa Image J. O experimento foi realizado em triplicata para cada um dos grupos analisados.

### **ANÁLISE HISTOLÓGICA**

Após 14 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e os fígados removidos e armazenados em formalina 10%. Após, foram lavados com água, desidratados em álcool e incluídos em historresina – LEICA. Cortes de 8 µm foram preparados em lâminas e cobertos com solução salina. Após, foi realizada coloração de hematoxilina-eosina para posterior análise. Pelo menos duas lâminas com 4 a 5 cortes de cada fígado foram examinadas sob a microscopia óptica (Olympus CX 41) com câmera CCD (Olympus DSC 3000) acoplada para obtenção das imagens.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5 para gerar as tabelas e gráficos apresentados no texto, bem como os testes estatísticos. Os resultados da densitometria ótica das bandas foram expressados como média e desvio padrão e, foram comparados estatisticamente com ANOVA de uma via seguido de Teste de Turkey. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados como indicativos de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### EXPRESSÃO GÊNICA *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT4*, *NAMPT* E *PGC1 $\alpha$*

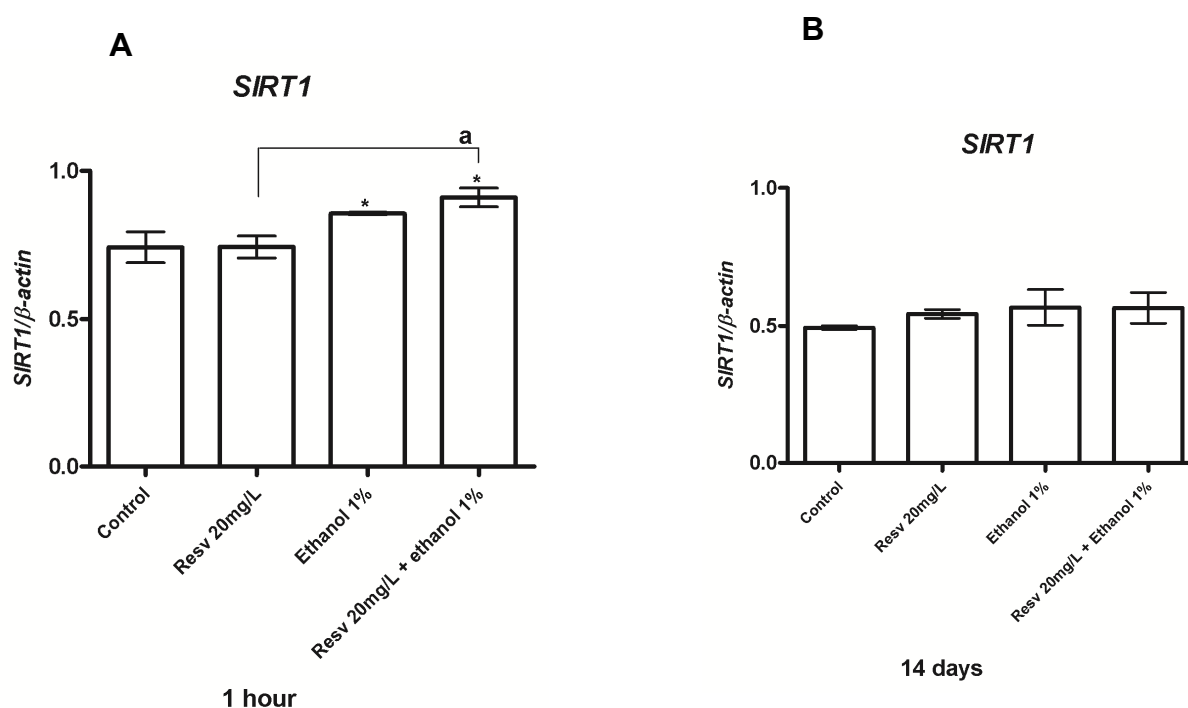
Sendo etanol um composto sabidamente hepatotóxico, nesse estudo, nós analisamos o padrão de transcrição de sirtuínas e outros genes relacionados após exposição aguda e crônica e, verificamos se resveratrol poderia reverter esta modulação. Para todos os genes analisados, foi possível observar que existiu diferença no padrão transcricional entre o tratamento agudo e crônico. Essa mesma observação foi reportada em hepatócitos de ratos após exposição aguda e crônica a etanol, onde a análise de microarranjo demonstrou diferença na expressão gênica entre os dois tratamentos (Bardag-Gorce, Oliva et al. 2009).

Para o gene de *SIRT1*, neste experimento, nós observamos um aumento significativo nos níveis de mRNA no grupo exposto ao etanol e, no que recebeu etanol mais resveratrol, quando comparados ao controle, após o tratamento agudo. No tratamento crônico, não foi observada nenhuma alteração significativa nos níveis de mRNA para *SIRT1* em nenhum dos grupos analisados (figura 1).

Ainda em relação ao tratamento agudo, no grupo que recebeu apenas resveratrol não foi observado aumento transcricional de *SIRT1* em relação ao controle. Comparando com nossos resultados prévios, onde outras foram utilizadas outras doses de resveratrol, nós podemos sugerir que em nosso modelo, a modulação transcricional de *SIRT1* por resveratrol parece não ser dose dependente, como demonstrado *in vitro* (Chen, Yu et al. 2009). Ainda, a ausência de modulação transcricional em animal naïve,

sem dano ou estresse, também foi observada em outro estudo em fígado de roedores (Franco, Moura et al. 2010).

Foi possível observar que em nosso modelo experimental, o etanol aumenta a expressão gênica de *SIRT1* e esta não é revertida pela administração conjunta de resveratrol. Um aumento de *SIRT1* após o tratamento agudo com etanol também foi observado em hepatócitos de ratos quando comparado ao controle. Neste estudo, não foi utilizado o polifenol e, este aumento não foi significativamente diferente do tratamento crônico (Bardag-Gorce, Oliva et al. 2009).



**Figura 1.** Perfil de transcrição gênica de *SIRT1* após tratamentos agudo (A) e crônico (B) no fígado de zebrafish. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle; <sup>a</sup>  $p < 0,05$  quando comparado entre os grupos entre si.

Já em relação ao tratamento crônico, diferente de nossos resultados, em fígados de ratos que receberam dieta líquida intragastricamente, contendo etanol, durante 1 mês, foi observado aumento na expressão gênica de *SIRT1*. Neste mesmo experimento os animais que receberam resveratrol juntamente com etanol, foi observada reversão deste aumento, retornando a expressão gênica aos níveis do controle (Oliva, French et al.

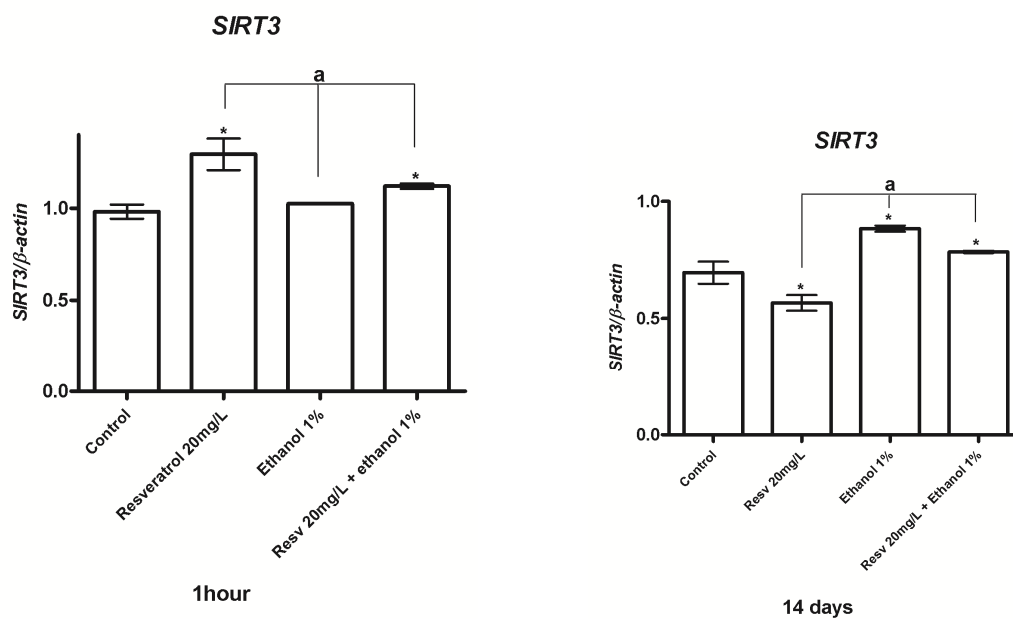
2008). Por outro lado, Lieber e colaboradores (2008) demonstraram diminuição nos níveis de *SIRT1* mRNA após exposição crônica ao etanol. Este último estudo também não utilizou o composto resveratrol.

Em relação às sirtuínas mitocondriais 3 e 4, foi observada modulação da transcrição em ambos os tempos testados; porém, o padrão transcricional foi diferente no tratamento agudo em relação ao crônico. SIRT3, que é uma das principais desacetiladoras mitocondriais, teve os níveis de mRNA aumentados em ambos grupos tratados com resveratrol, durante 1 h de exposição (Figura 2). Como foi observado aumento de transcrição no grupo que recebeu somente resveratrol, diferente do observado em experimentos anteriores, nós sugerimos que o resveratrol pode ser um composto modulador de SIRT3 e, esta modulação pode ser dose e tempo dependente. No grupo exposto somente ao etanol, não foi observada modulação em relação ao controle, o que sugere que frente à exposição ao etanol, o resveratrol pode reverter danos principalmente relacionados ao metabolismo energético, através da transcrição e posteriormente, alteração protéica.

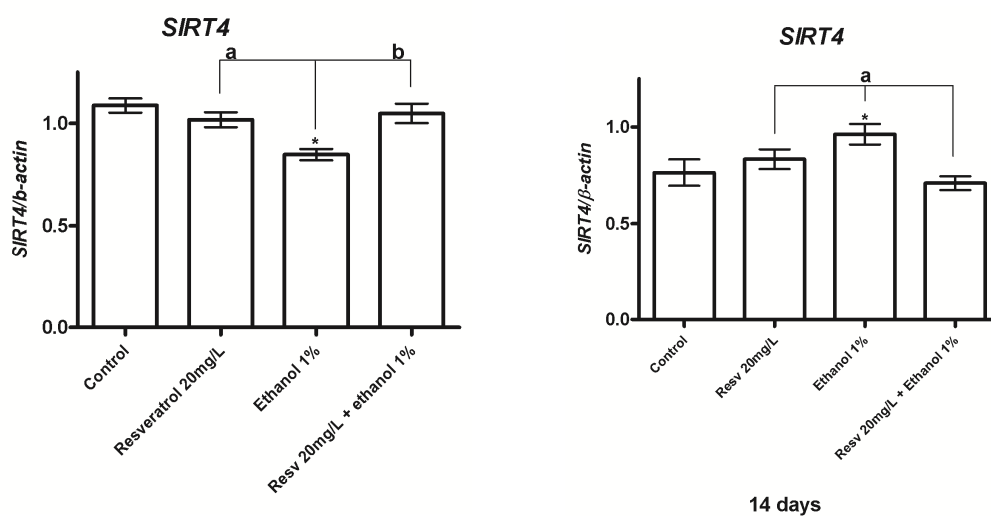
Sirtuína 4 apresentou expressão gênica significativamente diminuída em relação ao controle e, teve seus níveis reestabelecidos após exposição a etanol mais resveratrol (Figura 3). Em células pancreáticas, a diminuição da atividade de SIRT4, está relacionada à regulação de insulina. Em fígados, ainda é necessário determinar qual o efeito gerado por esta diminuição nos níveis de mRNA e se esta refletiria ao nível protéico. Nós sugerimos que resveratrol também parece atuar na modulação desta enzima mitocondrial.

No tratamento crônico, o padrão de transcrição observado para os dois genes foi diferente do observado no tratamento agudo. Assim como em fígados de rato, os níveis de mRNA de *SIRT3* aumentaram após a exposição crônica ao etanol (Oliva, French et al. 2008). Quando o resveratrol foi administrado junto com o etanol, observou-se diminuição significativa em relação ao grupo somente exposto ao etanol, mas ainda maior expressão, em relação ao controle. O grupo que recebeu apenas resveratrol teve os níveis de mRNA diminuídos para *SIRT3*.





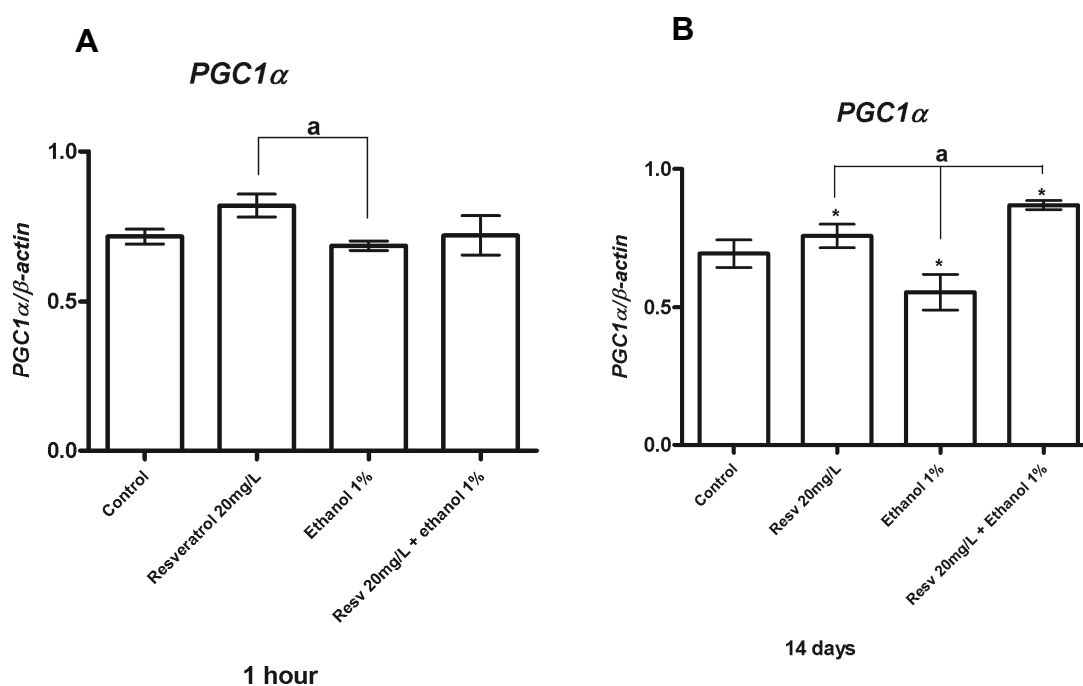
**Figura 2.** Perfil de transcrição gênica de SIRT3 após tratamentos agudo (A) e crônico (B) no fígado de zebrafish. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle; <sup>a</sup>  $p < 0,05$  quando comparado entre os grupos entre si.



**Figura 3.** Perfil de transcrição gênica de SIRT4 após tratamentos agudo (A) e crônico (B) no fígado de zebrafish. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle; <sup>a</sup>  $p < 0,05$  quando comparado entre os grupos entre si; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  quando comparado etanol com etanol + resveratrol.

Para o gene de SIRT4, em relação ao controle, após tratamento crônico, somente no grupo exposto ao etanol apresentou aumento significativo de mRNA. Porém, a modulação transcricional foi significativa quando comparada entre os grupos, onde resveratrol e, resveratrol mais etanol, apresentaram níveis de mRNA semelhantes ao do controle. O efeito fisiológico desta modulação no fígado de zebrafish deve ser investigado.

O fator de transcrição  $PGC1\alpha$  é um dos principais alvos de SIRT1 e também correlacionado com SIRT3. Em nosso estudo, nos grupos tratados durante 1 h, foi observado aumento na transcrição gênica dos que receberam resveratrol; porém este aumento só foi significativo quando comparado ao grupo que recebeu etanol isoladamente (Figura 4).



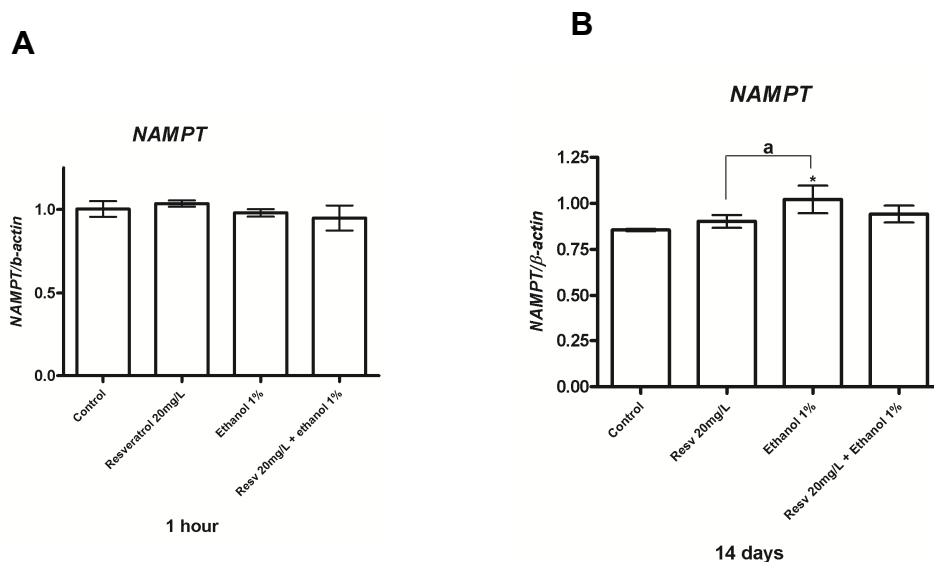
**Figura 4.** Perfil de transcrição gênica de  $PGC1\alpha$  após tratamentos agudo (A) e crônico (B) no fígado de zebrafish. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle; <sup>a</sup>  $p < 0,05$  quando comparado entre os grupos entre si.

No tratamento crônico, ocorreu modulação dos níveis de mRNA em todos os grupos tratados quando comparados ao controle. O resveratrol aumentou a transcrição de  $PGC1\alpha$  o que pode justificar uma modulação dose e tempo dependente, ou estar

associado à ação de metabólitos do resveratrol que podem estar presentes na água. O etanol diminuiu os níveis de mRNA, achado que já foi reportado em fígados de ratos após exposição ao etanol (Lieber, Leo et al. 2008). Quando ambos os compostos foram administrados juntos na água, foi observado novamente aumento de transcrição, sendo este aumento significativo em relação a todos os grupos.

A modulação transcricional de PGC1 $\alpha$  em nosso estudo parece não estar relacionada à expressão gênica de *SIRT1*, uma vez que as alterações significativas foram observadas após 14 dias de tratamento. Em nosso estudo, não ocorreu modulação de SIRT1 em nenhum dos grupos, quando comparados ao controle e/ou entre os tratamentos. A diminuição transcricional de PGC1 $\alpha$  causada pela administração de etanol pode estar associada a alterações no estado redox da célula e disfunção mitocondrial, características normalmente observadas em doença hepática alcoólica (Lieber, Leo et al. 2008)

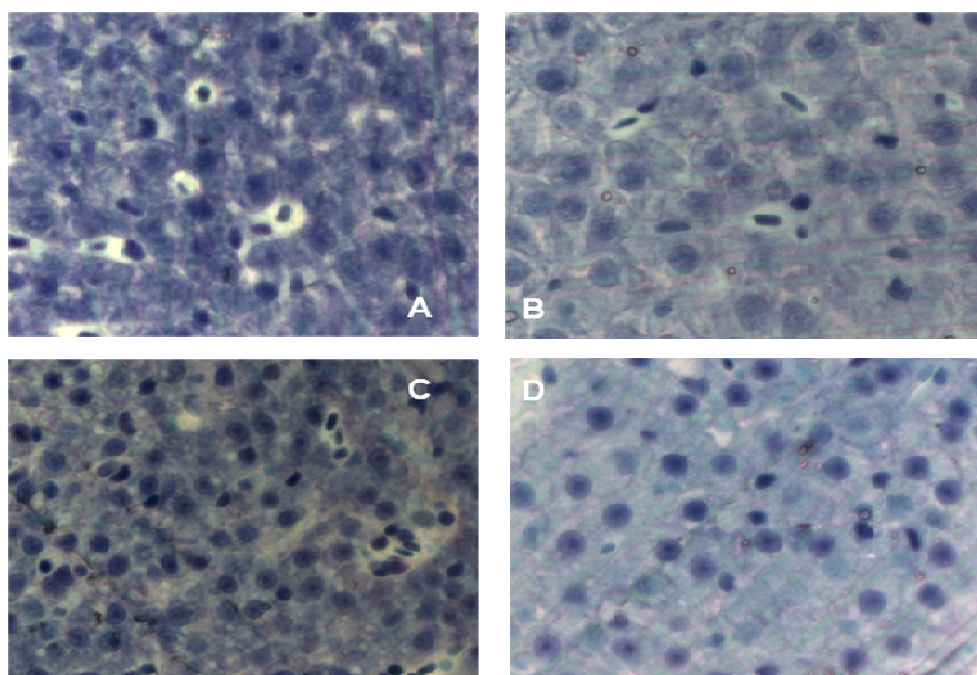
NAMPT é descrita como uma importante enzima que participa da via de síntese de NAD<sup>+</sup>, a partir de nicotinamida e, por isso, pode atuar na regulação de sirtuínas. Sendo assim, nós determinamos o perfil de expressão deste gene a fim de correlacionar com as sirtuínas. A expressão de NAMPT não alterou significativamente após 1 h de exposição aos compostos, quando comparado ao controle ou entre os grupos. Após tratamento crônico, foi observado aumento nos níveis de *NAMPT* após exposição ao etanol isolado (Figura 5). Este aumento foi significativo em relação ao controle e ao grupo exposto ao resveratrol. No plasma e em hepatócitos de indivíduos com acúmulo de gordura hepática não-alcoólica, a expressão de NAMPT é diminuída (Dahl, Yndestad et al. 2007).



**Figura 5.** Perfil de transcrição gênica de *NAMPT* após tratamentos agudo (A) e crônico (B) no fígado de zebrafish. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle; <sup>a</sup>  $p < 0,05$  quando comparado entre os grupos entre si.

#### ANÁLISE HISTOLÓGICA

Como um dos primeiros danos causados pela administração crônica de etanol é a disfunção lipídica e o acúmulo de triglicerídeos em hepatócitos, nós realizamos análise histológica dos fígados dos animais tratados cronicamente (Figura 6). Em fígados de zebrafish, após 14 dias de exposição ao etanol, não foi observada esteatose hepática. Contrário aos nossos achados, em larvas de zebrafish, 4 dias pós-fertilização, a administração de 2% de etanol, durante 32 h causou esteatose hepática (Passeri, Cinaroglu et al. 2009). Em nosso modelo e nas condições de tratamento utilizadas, o etanol aparentemente não foi um composto causador de dano hepático.



**Figura 6.** Análise histológica de fígado de zebrafish após tratamento crônico (A) Controle (B) Resveratrol 20mg/L (C) Etanol 1% (D) Resveratrol 20mg/L + etanol 1%. Em nenhum dos tratamentos foi observado esteatose hepática. Aumento 400x.

### ACETILAÇÃO DE HISTONA H3 (LYS9)

Uma das alterações observadas em tecidos e/ou células, após exposição ao etanol, é o aumento na expressão gênica e, esta alteração, foi relacionada ao estado de acetilação de H3 no resíduo de lisina 9 (Park, Lim et al. 2005; Kim and Shukla 2006). Sendo assim, nós determinamos o padrão de acetilação de H3 lis9 após tratamentos agudo e crônico com etanol e, combinado com resveratrol (Figura 7). Após 1h de exposição aos compostos, nós observamos aumento significativo, na acetilação de H3AcK9 no grupo tratado com resveratrol em relação aos demais. No grupo que recebeu somente etanol, também foi observada acetilação aumentada, quando comparado ao controle. Porém, foi significativamente menor que no grupo que recebeu resveratrol. Quando os dois compostos foram administrados conjuntamente, o nível de acetilação foi semelhante ao observado no grupo controle.

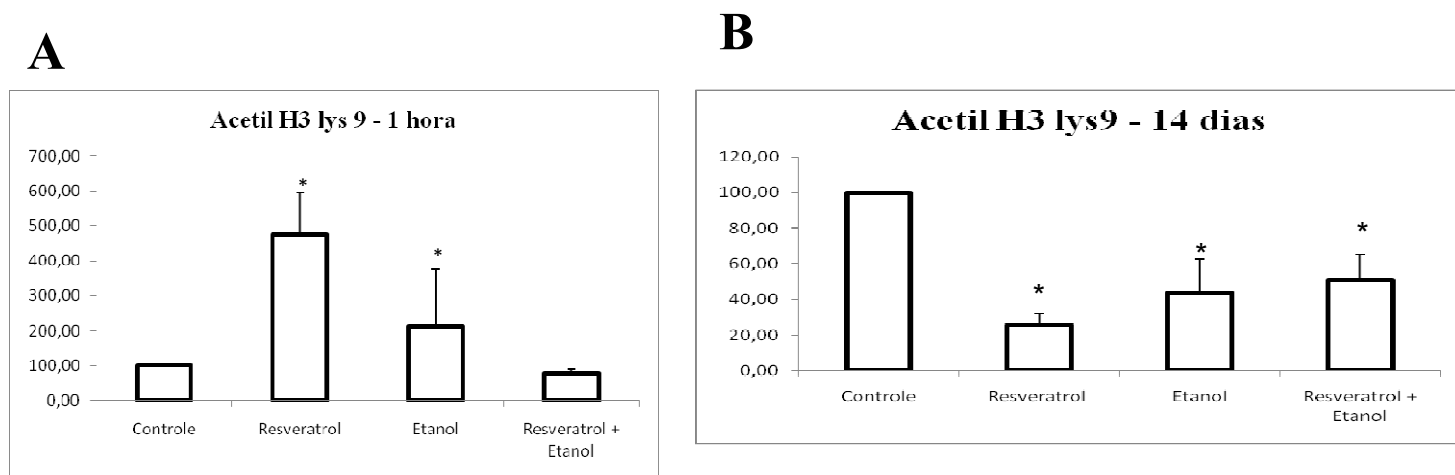
Diferente do que era esperado, o tratamento agudo com resveratrol gerou aumento de acetilação na histona 3. Como consequência desta modulação, seria esperada uma diminuição na expressão gênica global, nos fígados aqui testados mas, ao contrário nós observamos modulação transcricional positiva, após tratamento agudo, indicando expressão gênica ativa. Para melhor compreensão do padrão de acetilação de H3AcK9 observado e para uma correlação com as sirtuínas testadas, nós sugerimos um estudo para determinação de atividade destas enzimas, além de determinação celular no modelo experimental utilizado.

Em nosso modelo crônico, tanto etanol quanto resveratrol aparentemente exerceram efeito protetor, uma vez que foi observado diminuição no estado de acetilação de H3, quando comparado com o controle. Sendo resveratrol associado como ativador de sirtuínas e, que estas possuem atividade de desacetilação, esta diminuição no estado de acetilação de H3, seria um efeito esperado, mesmo quando administrado com etanol, o que demonstraria efeito hepatoprotetor do polifenol. Porém, o padrão de acetilação observado no grupo que recebeu somente etanol, não era esperado, mas, estes resultados corroboram com a falta de alterações observadas na análise histológica.

Neste experimento, novamente, observamos que resveratrol, pelo menos *in vivo*, não modulou SIRT1 transcionalmente, no grupo que não recebeu um agente estressor. Além disso, o resveratrol pode ter como importante alvo modulador de seus

efeitos SIRT3 e esta deve ser melhor avaliada. Apesar de alguns estudos apresentarem correlação, nós não observamos correlação nos níveis transcricionais de sirtuínas como os outros genes testados. Em nosso modelo experimental, aparentemente, o etanol não apresentou hepatotoxicidade, pelo menos no modelo crônico.

Por último, o zebrafish pode ser um modelo experimental promissor para o estudo de compostos moduladores de expressão gênica e protéica, como resveratrol e, ainda pouco explorado no estudo de sirtuínas. Porém, nós sugerimos que, pelo menos para resveratrol, o zebrafish é mais eficaz em estudos de exposição rápida, como 1h, pois os efeitos observados após um período maior de exposição podem ser gerados pelos metabólitos do composto presentes na água.



**Figura 7.** Análise de acetilação de Histona 3 (H3AcK9) por Western Blotting após tratamento agudo (A) e tratamento crônico (B). \* $p < 0,05$  em relação ao controle.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Evidentemente, o aumento da expectativa de vida é acompanhado de um impacto social e econômico referente ao aumento de doenças associadas à idade. Tendo em vista este aspecto, torna-se interessante o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que previnam ou retardem tais manifestações associadas ao envelhecimento e garanta qualidade de vida.

O resveratrol, assim como outros compostos naturais, foram relacionados como importantes ferramentas terapêuticas em distúrbios relacionados à idade, devido ao seu potencial antioxidante (Baur and Sinclair 2006; Pallas, Verdaguer et al. 2008). Também, este composto teve maior expressão na comunidade científica após a demonstração do seu potencial quimioprotetor (Jang, Cai et al. 1997) e, efeito cardioprotetor associado ao consumo de vinho tinto, relacionado principalmente a presença do polifenol (Pallas, Verdaguer et al. 2008).

Além disso, o resveratrol foi apresentado por aumentar a longevidade de pequenos organismos (Howitz, Bitterman et al. 2003) e, melhorar a performance e qualidade de vida de roedores obesos (Baur, Pearson et al. 2006). Efeitos estes demonstrados por serem dependentes de Sir2 ou, SIRT1 em mamíferos. E, desta forma, o polifenol teve seu mecanismo e efeito benéfico relacionado à restrição calórica. Apesar de restrição calórica ser uma conhecida intervenção não genética de efeitos benéficos, trata-se de uma intervenção de difícil aderência, justificando o desenvolvimento e compreensão de compostos antiidade, como vem sendo demonstrado com o resveratrol.

Apesar de primeiramente, tanto a restrição calórica, quanto o resveratrol, terem seu mecanismo relacionado à modulação de SIRT1, esta hipótese vem sendo discutida e resultados contraditórios são apresentados (Barger, Kayo et al. 2008; Barger, Kayo et al. 2008; Beher, Wu et al. 2009). O mecanismo associado às duas intervenções parece ser mais complexo do que primeiramente apresentado e dependente de outros fatores, tais como o tecido analisado, o tempo de intervenção, o modelo experimental utilizado, a concentração do composto, o modo de administração, as interações com alimentos e outros compostos, estes últimos no caso de resveratrol.

Além disso, o resveratrol vem sendo amplamente estudado em modelos de doença ou em associação com agentes estressores de modo a causarem dano celular, como o etanol. Sendo assim, justifica-se a necessidade de conhecimento deste composto em um modelo naïve, *in vivo*, para compreensão de mecanismo de ação, eficácia, toxicidade e metabolização do composto, entre outros fatores.

Na tentativa de compreender o mecanismo do resveratrol na modulação de sirtuínas em modelo experimental tipo-selvagem sem injúria, após injúria com etanol e, comparar este mecanismo com o de RC, nós determinamos a expressão gênica de sirtuínas e alguns genes alvos correlacionados com esta família de enzimas, em zebrafish adulto. Este é um modelo ainda pouco explorado frente a estas intervenções e genes analisados.

A partir de nossos resultados é possível concluir que o zebrafish é uma importante ferramenta experimental que pode ser utilizada na compreensão do mecanismo de modulação de sirtuínas mediadas por resveratrol, na interação entre etanol e resveratrol e, RC. Apesar da maioria dos estudos utilizarem o embrião ou larva para *screening* de moléculas na compreensão do desenvolvimento e toxicidade, estes apresentam algumas limitações, tais como perda de análise tecido específica. Sendo a expressão de sirtuínas variável de tecido a tecido, justifica-se a necessidade de utilização do animal adulto para a compreensão dos mecanismos destas enzimas.

Para estudos com resveratrol, em nosso modelo experimental, nós sugerimos que os resultados são melhores interpretados e fidedignos, após tratamento agudo em relação ao tratamento crônico. Isto se deve a dois fatores: (i) ao composto, que uma vez absorvido é metabolizado e excretado pelo animal na água; (ii) pela alta permeabilidade do peixe, característica esta que associa a facilidade de seu uso em estudos para *screening* de drogas. Desta forma, a modulação gênica observada após tratamento crônico com resveratrol pode estar sofrendo interferência de ação dos metabólitos não sendo possível determinar esta interação.

Ainda, este trabalho apresenta que tanto o resveratrol quanto, a restrição calórica, podem exercer seus efeitos benéficos atuando em outras sirtuínas, que não por modulação de SIRT1. Em fígado de zebrafish nós podemos observar um padrão de



expressão gênica similar após o tratamento com resveratrol em relação à restrição calórica, sugerindo que o resveratrol pode mimetizar RC.

Utilizando um modelo de zebrafish sem dano nós observamos que o resveratrol modula o metabolismo celular e, isto pode ser observado por regulação dos genes de sirtuínas mitocondriais e por aumento na acetilação de histonas 3. Sendo o composto utilizado por indivíduos como suplementação nutracêutica é de extrema importância a compreensão dos efeitos fisiológicos causados por esta modulação.

Sendo zebrafish um modelo experimental bem consolidado, porém pouco explorado quanto ao estudo de sirtuínas e utilização de resveratrol, nós pudemos contribuir e estabelecer este como uma importante ferramenta para a melhor compreensão dos mecanismos do polifenol e das enzimas. Ainda pudemos contribuir, demonstrando que o composto natural pode atuar em outras sirtuínas, como SIRT3 e SIRT4 e, ser este um dos mecanismos associados aos efeitos benéficos do resveratrol.

## LISTA DE REFERÊNCIAS

- Ahn, B. H., H. S. Kim, et al. (2008). "A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(38): 14447-52.
- Alfaras, I., M. E. Juan, et al. (2010). "trans-Resveratrol reduces precancerous colonic lesions in dimethylhydrazine-treated rats." J Agric Food Chem **58**(13): 8104-10.
- Almeida, L., M. Vaz-da-Silva, et al. (2009). "Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers." Mol Nutr Food Res **53 Suppl 1**: S7-15.
- Anastasiou, D. and W. Kerk (2006). "SIRT1: linking adaptive cellular responses to aging-associated changes in organismal physiology." Physiology (Bethesda) **21**: 404-10.
- Barbazuk, W. B., I. Korf, et al. (2000). "The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes." Genome Res **10**(9): 1351-8.
- Bardag-Gorce, F., J. Oliva, et al. (2009). "Chronic ethanol feeding alters hepatocyte memory which is not altered by acute feeding." Alcohol Clin Exp Res **33**(4): 684-92.
- Barger, J. L., T. Kayo, et al. (2008). "Short-term consumption of a resveratrol-containing nutraceutical mixture mimics gene expression of long-term caloric restriction in mouse heart." Exp Gerontol **43**(9): 859-66.
- Barger, J. L., T. Kayo, et al. (2008). "A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice." PLoS One **3**(6): e2264.
- Baur, J. A. (2010). "Resveratrol, Sirtuins, and the Promise of a DR Mimetic." Mech Ageing Dev.
- Baur, J. A., K. J. Pearson, et al. (2006). "Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet." Nature **444**(7117): 337-42.
- Baur, J. A. and D. A. Sinclair (2006). "Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence." Nat Rev Drug Discov **5**(6): 493-506.
- Begriche, K., A. Igoudjil, et al. (2006). "Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it." Mitochondrion **6**(1): 1-28.
- Behr, D., J. Wu, et al. (2009). "Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity." Chem Biol Drug Des **74**(6): 619-24.
- Bellizzi, D., G. Rose, et al. (2005). "A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages." Genomics **85**(2): 258-63.
- Berghmans, S., C. Jette, et al. (2005). "Making waves in cancer research: new models in the zebrafish." Biotechniques **39**(2): 227-37.
- Blander, G. and L. Guarente (2004). "The Sir2 family of protein deacetylases." Annu Rev Biochem **73**: 417-35.
- Boocock, D. J., G. E. Faust, et al. (2007). "Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(6): 1246-52.
- Bordone, L., M. C. Motta, et al. (2006). "Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells." PLoS Biol **4**(2): e31.
- Bowman, T. V. and L. I. Zon (2010). "Swimming into the future of drug discovery: in vivo chemical screens in zebrafish." ACS Chem Biol **5**(2): 159-61.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Cahill, A., S. Hershman, et al. (2005). "Ethanol feeding enhances age-related deterioration of the rat hepatic mitochondrion." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **289**(6): G1115-23.
- Castilla, R., R. Gonzalez, et al. (2004). "Dual effect of ethanol on cell death in primary culture of human and rat hepatocytes." Alcohol Alcohol **39**(4): 290-6.
- Chen, C. J., W. Yu, et al. (2009). "Resveratrol protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis through the SIRT1-FoxO1 pathway." Biochem Biophys Res Commun **378**(3): 389-93.
- Chen, D., J. Bruno, et al. (2008). "Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction." Genes Dev **22**(13): 1753-7.
- Chen, W. Y., D. H. Wang, et al. (2005). "Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses." Cell **123**(3): 437-48.
- Cheung, W. L., S. D. Briggs, et al. (2000). "Acetylation and chromosomal functions." Curr Opin Cell Biol **12**(3): 326-33.
- Civitarese, A. E., S. Carling, et al. (2007). "Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans." PLoS Med **4**(3): e76.
- Cohen, H. Y., C. Miller, et al. (2004). "Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase." Science **305**(5682): 390-2.
- Colman, R. J., R. M. Anderson, et al. (2009). "Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys." Science **325**(5937): 201-4.
- Crowell, J. A., P. J. Korytko, et al. (2004). "Resveratrol-associated renal toxicity." Toxicol Sci **82**(2): 614-9.
- Dahl, T. B., A. Yndestad, et al. (2007). "Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization." Circulation **115**(8): 972-80.
- de Ruijter, A. J., A. H. van Gennip, et al. (2003). "Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family." Biochem J **370**(Pt 3): 737-49.
- Demeilliers, C., C. Maisonneuve, et al. (2002). "Impaired adaptive resynthesis and prolonged depletion of hepatic mitochondrial DNA after repeated alcohol binges in mice." Gastroenterology **123**(4): 1278-90.
- Dooley, K. and L. I. Zon (2000). "Zebrafish: a model system for the study of human disease." Curr Opin Genet Dev **10**(3): 252-6.
- Duan, W. and M. P. Mattson (1999). "Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration improve behavioral outcome and reduce degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease." J Neurosci Res **57**(2): 195-206.
- Engelman, R. W., N. K. Day, et al. (1990). "Calorie consumption level influences development of C3H/Ou breast adenocarcinoma with indifference to calorie source." Proc Soc Exp Biol Med **193**(1): 23-30.
- Feige, J. N. and J. Auwerx (2008). "Transcriptional targets of sirtuins in the coordination of mammalian physiology." Curr Opin Cell Biol **20**(3): 303-9.
- Fernandes, G. and R. A. Good (1984). "Inhibition by restricted-calorie diet of lymphoproliferative disease and renal damage in MRL/lpr mice." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(19): 6144-8.

- Fernandes, G., E. J. Yunis, et al. (1976). "Suppression of adenocarcinoma by the immunological consequences of calorie restriction." *Nature* **263**(5577): 504-7.
- Foley, J. E., M. L. Maeder, et al. (2009). "Targeted mutagenesis in zebrafish using customized zinc-finger nucleases." *Nat Protoc* **4**(12): 1855-67.
- Franco, J. G., E. G. Moura, et al. (2010). "Resveratrol (RSV) reduces lipid peroxidation and increases sirtuin1 (SIRT1) expression in adult animals programmed by neonatal protein restriction." *J Endocrinol* **207**(3): 319-28.
- Frye, R. A. (1999). "Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity." *Biochem Biophys Res Commun* **260**(1): 273-9.
- Frye, R. A. (2000). "Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins." *Biochem Biophys Res Commun* **273**(2): 793-8.
- Fulco, M., Y. Cen, et al. (2008). "Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt." *Dev Cell* **14**(5): 661-73.
- Galli, M., F. Van Gool, et al. (2010). "Sirtuins and inflammation: friends or foes?" *Biochem Pharmacol*.
- Gerhard, G. S. and K. C. Cheng (2002). "A call to fins! Zebrafish as a gerontological model." *Aging Cell* **1**(2): 104-11.
- Giovannelli, L., V. Pitozzi, et al. (2011). "Protective effects of resveratrol against senescence-associated changes in cultured human fibroblasts." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **66**(1): 9-18.
- Gleeson, M., V. Connaughton, et al. (2007). "Induction of hyperglycaemia in zebrafish (*Danio rerio*) leads to morphological changes in the retina." *Acta Diabetol* **44**(3): 157-63.
- Guarente, L. (2006). "Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome." *Nature* **444**(7121): 868-74.
- Guarente, L. and F. Picard (2005). "Calorie restriction--the SIR2 connection." *Cell* **120**(4): 473-82.
- Guo, S. (2004). "Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish?" *Genes Brain Behav* **3**(2): 63-74.
- Haigis, M. C., R. Mostoslavsky, et al. (2006). "SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells." *Cell* **126**(5): 941-54.
- Hallows, W. C., S. Lee, et al. (2006). "Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(27): 10230-5.
- Harikumar, K. B. and B. B. Aggarwal (2008). "Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases." *Cell Cycle* **7**(8): 1020-35.
- Hassan-Khabbar, S., C. H. Cottart, et al. (2008). "Postischemic treatment by trans-resveratrol in rat liver ischemia-reperfusion: a possible strategy in liver surgery." *Liver Transpl* **14**(4): 451-9.
- Hirschey, M. D., T. Shimazu, et al. (2010). "SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation." *Nature* **464**(7285): 121-5.
- Howitz, K. T., K. J. Bitterman, et al. (2003). "Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan." *Nature* **425**(6954): 191-6.
- Hung, C. W., Y. C. Chen, et al. (2010). "Ageing and neurodegenerative diseases." *Ageing Res Rev* **9** Suppl 1: S36-46.

- Imai, S., C. M. Armstrong, et al. (2000). "Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase." Nature **403**(6771): 795-800.
- Jang, M., L. Cai, et al. (1997). "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes." Science **275**(5297): 218-20.
- Jin, L., H. Galonek, et al. (2009). "Biochemical characterization, localization, and tissue distribution of the longer form of mouse SIRT3." Protein Sci **18**(3): 514-25.
- Kaeberlein, M., T. McDonagh, et al. (2005). "Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol." J Biol Chem **280**(17): 17038-45.
- Kasdallah-Grissa, A., B. Mornagui, et al. (2007). "Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver." Life Sci **80**(11): 1033-9.
- Keller, E. T. and J. M. Murtha (2004). "The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **138**(3): 335-41.
- Kelly, G. (2010). "A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 1." Altern Med Rev **15**(3): 245-63.
- Kim, J. S. and S. D. Shukla (2006). "Acute in vivo effect of ethanol (binge drinking) on histone H3 modifications in rat tissues." Alcohol Alcohol **41**(2): 126-32.
- Klar, A. J., S. Fogel, et al. (1979). "MAR1-a Regulator of the HMa and HMalpha Loci in SACCHAROMYCES CEREVISIAE." Genetics **93**(1): 37-50.
- Kong, X., R. Wang, et al. (2010). "Sirtuin 3, a New Target of PGC-1alpha, Plays an Important Role in the Suppression of ROS and Mitochondrial Biogenesis." PLoS One **5**(7): e11707.
- Koubova, J. and L. Guarente (2003). "How does calorie restriction work?" Genes Dev **17**(3): 313-21.
- Kubo, C., B. C. Johnson, et al. (1984). "Calorie source, calorie restriction, immunity and aging of (NZB/NZW)F1 mice." J Nutr **114**(10): 1884-99.
- Kwon, H. S. and M. Ott (2008). "The ups and downs of SIRT1." Trends Biochem Sci **33**(11): 517-25.
- Lagouge, M., C. Argmann, et al. (2006). "Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha." Cell **127**(6): 1109-22.
- Lanza, I. R., D. K. Short, et al. (2008). "Endurance exercise as a countermeasure for aging." Diabetes **57**(11): 2933-42.
- Lieber, C. S., M. A. Leo, et al. (2008). "Effect of chronic alcohol consumption on Hepatic SIRT1 and PGC-1alpha in rats." Biochem Biophys Res Commun **370**(1): 44-8.
- Lin, J. F., S. M. Lin, et al. (2008). "Resveratrol reduces infarct size and improves ventricular function after myocardial ischemia in rats." Life Sci **83**(9-10): 313-7.
- Lin, S. J., P. A. Defossez, et al. (2000). "Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*." Science **289**(5487): 2126-8.
- Lin, S. J., E. Ford, et al. (2004). "Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH." Genes Dev **18**(1): 12-6.
- Liszt, G., E. Ford, et al. (2005). "Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase." J Biol Chem **280**(22): 21313-20.
- Lombard, D. B., F. W. Alt, et al. (2007). "Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation." Mol Cell Biol **27**(24): 8807-14.

- Luo, J., A. Y. Nikolaev, et al. (2001). "Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress." *Cell* **107**(2): 137-48.
- Ma, W., H. J. Sung, et al. (2007). "A pivotal role for p53: balancing aerobic respiration and glycolysis." *J Bioenerg Biomembr* **39**(3): 243-6.
- Malhi, H. and G. J. Gores (2008). "Cellular and molecular mechanisms of liver injury." *Gastroenterology* **134**(6): 1641-54.
- McCay, C., M. Crowell, et al. (1935). "The effect of retarded growth upon the length of lifespan and upon the ultimate size." *J Nutr* **10**: 63-79.
- Michan, S. and D. Sinclair (2007). "Sirtuins in mammals: insights into their biological function." *Biochem J* **404**(1): 1-13.
- Milne, J. C., P. D. Lambert, et al. (2007). "Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes." *Nature* **450**(7170): 712-6.
- Modica-Napolitano, J. S., M. Kulawiec, et al. (2007). "Mitochondria and human cancer." *Curr Mol Med* **7**(1): 121-31.
- Morrison, B. E., N. Majdzadeh, et al. (2007). "Histone deacetylases: focus on the nervous system." *Cell Mol Life Sci* **64**(17): 2258-69.
- Mukherjee, S., J. I. Dudley, et al. (2010). "Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits." *Dose Response* **8**(4): 478-500.
- Nagy, L. E. (2004). "Molecular aspects of alcohol metabolism: transcription factors involved in early ethanol-induced liver injury." *Annu Rev Nutr* **24**: 55-78.
- Nasrin, N., X. Wu, et al. (2010). "SIRT4 regulates fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression in liver and muscle cells." *J Biol Chem*.
- Navasumrit, P., T. H. Ward, et al. (2000). "Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented in vivo by antioxidants: effects of acute and chronic ethanol exposure." *Carcinogenesis* **21**(1): 93-9.
- Ndiaye, M., C. Philippe, et al. (2011). "The Grape Antioxidant Resveratrol for Skin Disorders: Promise, Prospects, and Challenges." *Arch Biochem Biophys*.
- Nisoli, E., C. Tonello, et al. (2005). "Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS." *Science* **310**(5746): 314-7.
- Nunes, T., L. Almeida, et al. (2009). "Pharmacokinetics of trans-resveratrol following repeated administration in healthy elderly and young subjects." *J Clin Pharmacol* **49**(12): 1477-82.
- Oliva, J., B. A. French, et al. (2008). "Sirt1 is involved in energy metabolism: the role of chronic ethanol feeding and resveratrol." *Exp Mol Pathol* **85**(3): 155-9.
- Onyango, P., I. Celic, et al. (2002). "SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(21): 13653-8.
- Ozaras, R., V. Tahan, et al. (2003). "N-acetylcysteine attenuates alcohol-induced oxidative stress in the rat." *World J Gastroenterol* **9**(1): 125-8.
- Pacholec, M., J. E. Bleasdale, et al. (2010). "SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1." *J Biol Chem* **285**(11): 8340-51.
- Palacios, O. M., J. J. Carmona, et al. (2009). "Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle." *Aging (Albany NY)* **1**(9): 771-83.
- Pallas, M., E. Verdaguer, et al. (2008). "Modulation of sirtuins: new targets for antiaging." *Recent Pat CNS Drug Discov* **3**(1): 61-9.
- Pan, J. G. and T. W. Mak (2007). "Metabolic targeting as an anticancer strategy: dawn of a new era?" *Sci STKE* **2007**(381): pe14.

- Park, P. H., R. W. Lim, et al. (2005). "Involvement of histone acetyltransferase (HAT) in ethanol-induced acetylation of histone H3 in hepatocytes: potential mechanism for gene expression." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **289**(6): G1124-36.
- Passeri, M. J., A. Cinaroglu, et al. (2009). "Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation." Hepatology **49**(2): 443-52.
- Patton, E. E. and L. I. Zon (2001). "The art and design of genetic screens: zebrafish." Nat Rev Genet **2**(12): 956-66.
- Pearson, K. J., J. A. Baur, et al. (2008). "Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span." Cell Metab **8**(2): 157-68.
- Pedersen, P. L. (2007). "Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen." J Bioenerg Biomembr **39**(3): 211-22.
- Petersen, K. F., D. Befroy, et al. (2003). "Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance." Science **300**(5622): 1140-2.
- Picard, F., M. Kurtev, et al. (2004). "Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma." Nature **429**(6993): 771-6.
- Potente, M. and S. Dimmeler (2008). "Emerging roles of SIRT1 in vascular endothelial homeostasis." Cell Cycle **7**(14): 2117-22.
- Powell, M. J., M. C. Casimiro, et al. (2010). "Disruption of a Sirt1 Dependent Autophagy Checkpoint in the Prostate Results in Prostatic Intraepithelial Neoplasia Lesion Formation." Cancer Res.
- Qiao, L. and J. Shao (2006). "SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex." J Biol Chem **281**(52): 39915-24.
- Redman, L. M., C. K. Martin, et al. (2008). "Effect of caloric restriction in non-obese humans on physiological, psychological and behavioral outcomes." Physiol Behav **94**(5): 643-8.
- Renaud, S. and M. de Lorgeril (1992). "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease." Lancet **339**(8808): 1523-6.
- Revollo, J. R., A. A. Grimm, et al. (2004). "The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells." J Biol Chem **279**(49): 50754-63.
- Rine, J. and I. Herskowitz (1987). "Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **116**(1): 9-22.
- Rodgers, J. T., C. Lerin, et al. (2005). "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1." Nature **434**(7029): 113-8.
- Rodgers, J. T. and P. Puigserver (2007). "Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(31): 12861-6.
- Roest Crollius, H. and J. Weissenbach (2005). "Fish genomics and biology." Genome Res **15**(12): 1675-82.
- Rose, G., S. Dato, et al. (2003). "Variability of the SIRT3 gene, human silent information regulator Sir2 homologue, and survivorship in the elderly." Exp Gerontol **38**(10): 1065-70.

- Sakakibara, I., T. Fujino, et al. (2009). "Fasting-induced hypothermia and reduced energy production in mice lacking acetyl-CoA synthetase 2." Cell Metab **9**(2): 191-202.
- Sauve, A. A., C. Wolberger, et al. (2006). "The biochemistry of sirtuins." Annu Rev Biochem **75**: 435-65.
- Schlicker, C., M. Gertz, et al. (2008). "Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5." J Mol Biol **382**(3): 790-801.
- Sebastian, C. and R. Mostoslavsky (2010). "SIRT3 in calorie restriction: can you hear me now?" Cell **143**(5): 667-8.
- Shi, T., G. Q. Fan, et al. (2010). "SIRT3 reduces lipid accumulation via AMPK activation in human hepatic cells." J Dig Dis **11**(1): 55-62.
- Shi, T., F. Wang, et al. (2005). "SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes." J Biol Chem **280**(14): 13560-7.
- Shulga, N., R. Wilson-Smith, et al. (2010). "Sirtuin-3 deacetylation of cyclophilin D induces dissociation of hexokinase II from the mitochondria." J Cell Sci **123**(Pt 6): 894-902.
- Skromne, I. and V. E. Prince (2008). "Current perspectives in zebrafish reverse genetics: moving forward." Dev Dyn **237**(4): 861-82.
- Smith, B. C., B. Settles, et al. (2010). "SIRT3 Substrate Specificity Determined by Peptide Arrays and Machine Learning." ACS Chem Biol.
- Someya, S., W. Yu, et al. (2010). "Sirt3 Mediates Reduction of Oxidative Damage and Prevention of Age-Related Hearing Loss under Caloric Restriction." Cell **143**: 802-812.
- Spence, R., G. Gerlach, et al. (2008). "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*." Biol Rev Camb Philos Soc **83**(1): 13-34.
- Stanley, C. A. (2004). "Hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome: insights into the regulatory role of glutamate dehydrogenase in ammonia metabolism." Mol Genet Metab **81 Suppl 1**: S45-51.
- Sundaresan, N. R., S. A. Samant, et al. (2008). "SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70." Mol Cell Biol **28**(20): 6384-401.
- Szkudelska, K. and T. Szkudelski (2010). "Resveratrol, obesity and diabetes." Eur J Pharmacol.
- Trincheri, N. F., G. Nicotra, et al. (2007). "Resveratrol induces cell death in colorectal cancer cells by a novel pathway involving lysosomal cathepsin D." Carcinogenesis **28**(5): 922-31.
- Tsai, S. H., S. Y. Lin-Shiau, et al. (1999). "Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol." Br J Pharmacol **126**(3): 673-80.
- Valenzano, D. R. and A. Cellerino (2006). "Resveratrol and the pharmacology of aging: a new vertebrate model to validate an old molecule." Cell Cycle **5**(10): 1027-32.
- Valenzano, D. R., E. Terzibasi, et al. (2006). "Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate." Curr Biol **16**(3): 296-300.
- Vaziri, H., S. K. Dessain, et al. (2001). "hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase." Cell **107**(2): 149-59.
- Vogelstein, B., D. Lane, et al. (2000). "Surfing the p53 network." Nature **408**(6810): 307-10.



- Wadsworth, T. L. and D. R. Koop (1999). "Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages." Biochem Pharmacol **57**(8): 941-9.
- Wallace, D. C. (2005). "A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine." Annu Rev Genet **39**: 359-407.
- Walle, T. (2007). "Methylation of dietary flavones greatly improves their hepatic metabolic stability and intestinal absorption." Mol Pharm **4**(6): 826-32.
- Wheeler, G. N. and A. W. Brandli (2009). "Simple vertebrate models for chemical genetics and drug discovery screens: lessons from zebrafish and *Xenopus*." Dev Dyn **238**(6): 1287-308.
- Wood, J. G., B. Rogina, et al. (2004). "Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans." Nature **430**(7000): 686-9.
- Wu, J. M., Z. R. Wang, et al. (2001). "Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review)." Int J Mol Med **8**(1): 3-17.
- Yamamoto, H., K. Schoonjans, et al. (2007). "Sirtuin functions in health and disease." Mol Endocrinol **21**(8): 1745-55.
- Yang, H., T. Yang, et al. (2007). "Nutrient-sensitive mitochondrial NAD<sup>+</sup> levels dictate cell survival." Cell **130**(6): 1095-107.
- Yar, A. S., S. Menevse, et al. (2010). "The effects of resveratrol on cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNA and protein levels in diabetic rat kidneys." Mol Biol Rep **37**(5): 2323-31.
- Yi, J. and J. Luo (2010). "SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond." Biochim Biophys Acta **1804**(8): 1684-9.
- Zon, L. I. and R. T. Peterson (2005). "In vivo drug discovery in the zebrafish." Nat Rev Drug Discov **4**(1): 35-44.

## **ANEXO I**

**Patente Internacional: *Method and kit for determining sirtuin modulating agents, sirtuin modulating procedure, sirtuin modulating compounds and compositions including the same***





(11) **EP 2 246 442 A1**

(12) **EUROPEAN PATENT APPLICATION**

(43) Date of publication:  
03.11.2010 Bulletin 2010/44

(51) Int Cl.:  
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Application number: 09173271.9

(22) Date of filing: 16.10.2009

(84) Designated Contracting States:  
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR  
HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL  
PT RO SE SI SK SM TR  
Designated Extension States:  
AL BA RS

- Bonan, Carla Denise  
91350-300 Porto Alegre RS (BR)
- Carneiro Brandao Pereira, Talita  
90670-020 Porto Alegre RS (BR)
- Schirmer, Helena  
93700-000 Campo Born RS (BR)
- Pacheco Rico, Eduardo  
90619-900 Porto Alegre RS (BR)
- Broock Rosemberg, Denis  
90619-900 Porto Alegre RS (BR)

(30) Priority: 17.10.2008 BR 08060444

(71) Applicant: União Brasileira De Educação E  
Assistência  
- Mantenedora Da Pucrs  
CEP: 90619-900 Porto Alegre - RS (BR)

(74) Representative: Capasso, Olga et al  
De Simone & Partners S.p.A.  
Via Vincenzo Bellini, 20  
00198 Roma (IT)

(72) Inventors:  
• Reis Bogo, Mauricio  
90630-130 Bairro-Petropolis (BR)  
• Arigony Souto, Andre  
90670-020 Porto Alegre RS (BR)

Remarks:

Claims 16-21 are deemed to be abandoned due to non-payment of the claims fees (Rule 45(3) EPC).

(54) **Method and kit for determining sirtuin modulating agents, sirtuin modulating procedure, sirtuin modulating compounds and compositions including the same**

(57) The invention herein describes a kit and a method for determining modulating agents of sirtuins; specifically, the modulation of sirtuin expression, by way of the detection and comparison of mRNAs in the sirtuins and  $\beta$ -actin.

The invention herein also provides a process for modulating the activity of sirtuins, as well as pharmaceutical compounds and compositions capable of modulating the gene expression of sirtuins.

EP 2 246 442 A1



US 20100184869A1

(19) **United States**(12) **Patent Application Publication** (10) **Pub. No.: US 2010/0184869 A1****Bogo et al.** (43) **Pub. Date: Jul. 22, 2010**(54) **METHOD AND KIT FOR DETERMINING SIRTUIN MODULATING AGENTS, SIRTUIN MODULATING PROCEDURE, SIRTUIN MODULATING COMPOUNDS AND COMPOSITIONS INCLUDING THE SAME**(76) Inventors: **Mauricio Reis Bogo, (US); Andre Arigony Souto, (US); Carla Denise Bonan, (US); Talita Cameiro Brandao Pereira, (US); Helena Schirmer, (US); Eduardo Pacheco Rico, (US); Denis Broock Rosemberg, (US)**

Correspondence Address:

**SMITH, GAMBRELL & RUSSELL  
SUITE 3100, PROMENADE II, 1230 PEACHTREE STREET, N.E.  
ATLANTA, GA 30309-3592 (US)**(21) Appl. No.: **12/578,876**(22) Filed: **Oct. 14, 2009**(30) **Foreign Application Priority Data**

Oct. 17, 2008 (BR) ..... PI0806044-4

**Publication Classification**(51) **Int. Cl.**  
**A61K 31/05** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12N 5/02** (2006.01)  
**C12N 5/07** (2010.01)(52) **U.S. Cl.** ..... **514/733; 435/6; 435/375; 435/349; 435/354; 435/366**(57) **ABSTRACT**A kit and a method for determining modulating agents of sirtuins; specifically, the modulation of sirtuin expression, by way of the detection and comparison of mRNAs in the sirtuins and  $\beta$ -actin. A process for modulating the activity of sirtuins, as well as pharmaceutical compounds and compositions capable of modulating the gene expression of sirtuins.



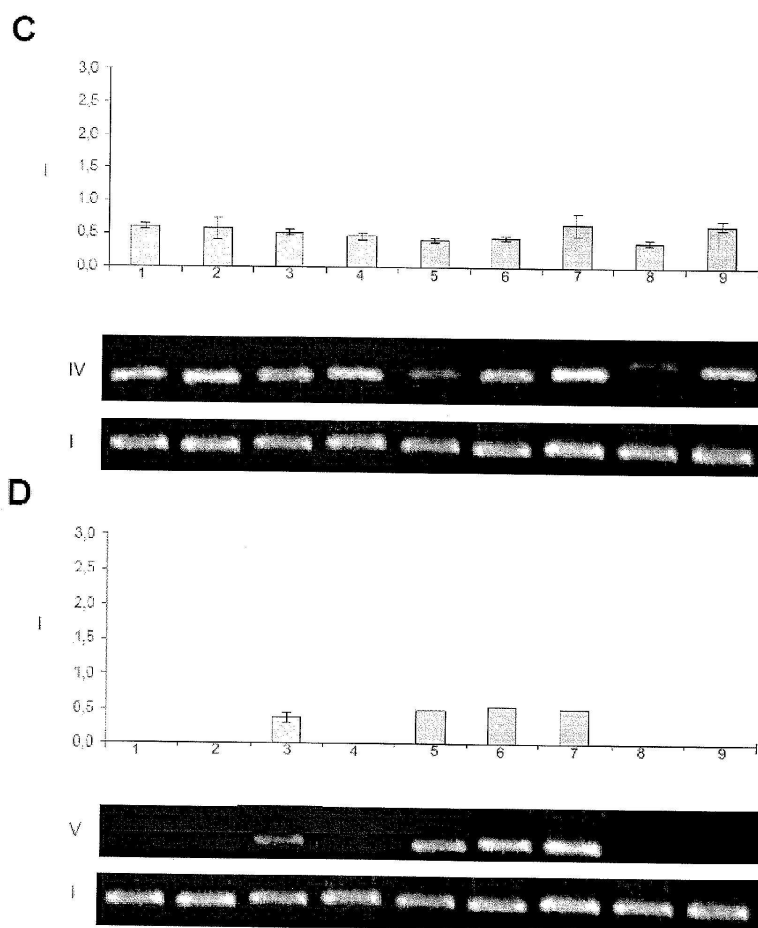


FIG. 2 (CONT'D)

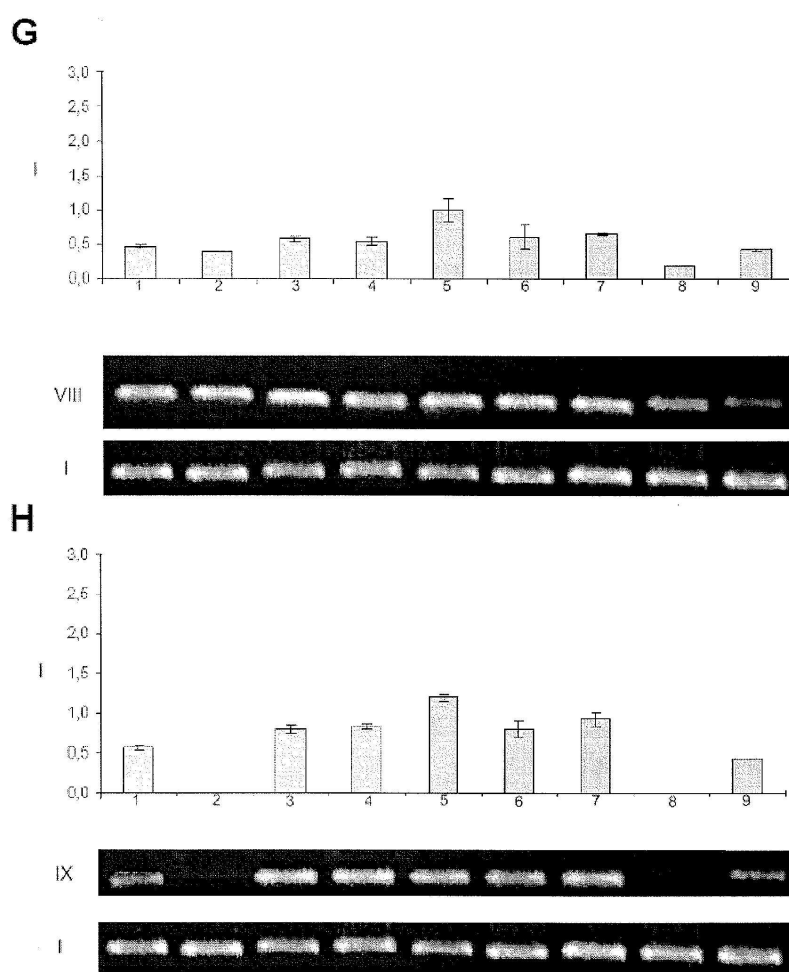


FIG. 2 (CONT'D)



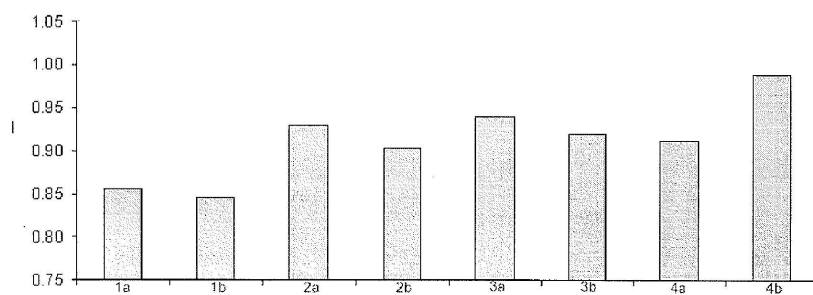


FIGURE 3

**METHOD AND KIT FOR DETERMINING  
SIRTIUIN MODULATING AGENTS, SIRTIUIN  
MODULATING PROCEDURE, SIRTIUIN  
MODULATING COMPOUNDS AND  
COMPOSITIONS INCLUDING THE SAME**

STATEMENT OF RELATED APPLICATIONS

[0001] This patent application is based on and claims convention priority on Brazilian Patent Application No. P10806044-4 having a filing date of 17 Oct. 2008.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] 1. Technical Field

[0003] The invention herein describes a kit and a method for determining sirtuin modulating agents; specifically the modulation of the expression of sirtuins, by way of the detection and comparison of mRNAs of sirtuins and of  $\beta$ -actin.

[0004] The invention herein also provides a process for the modulation of sirtuin activity as well as pharmaceutical compounds and compositions capable of modulating the gene expression of sirtuins.

[0005] 2. Related Art

[0006] Sirtuins are part of a large group of enzymes, the histone deacetylases or HDACs family, whose principal role is to reverse the regulatory acetylation of histone-type proteins, by influencing directly in the structure of nucleosomes and, consequently, in gene transcription. Other than histones, a growing number of proteins have been identified as a target of HDACs, structural proteins and different transcription factors being among those. Sirtuins affect a broad number of physiological processes, including regulation of life expectancy, regulation of metabolic and enzymatic activity, cellular response to stress, neurodegeneration, DNA repair, rDNA recombination, apoptosis and the control of cellular proliferation. Currently, sirtuins are the important targets of research linked to caloric restriction, cancer, neurodegenerative diseases, muscular differentiation, inflammation and obesity.

[0007] Different studies have been performed aiding in the identification of sirtuin modulators. Blander et al ("SIRT1 shows no substrate specificity in vitro" J Biol Chem. 280(11): 9780-5, 2005) describe a previously unpublished method for identifying specificity for a sequence of deacetylase by using peptide libraries containing acetylated lysine. After incubation with SIRT1, the subassembly of deacetylated peptides was captured selectively using a biotinylated N-hydroxysuccinimide photolabile linker and small beads of streptavidin, subsequently analysed. Said studies revealed that the recognition of the substrate by SIRT1 occurs irrespectively of the sequence of amino acids close to the acetylated lysine. Furthermore, Garske et al. ("SIRT1 top 40 hits: use of one-bead, one-compound peptide libraries and quantum dots to probe deacetylase specificity." Biochemistry 45(1):94-101, 2006) also describe a new method of high scalability for determining the specificity of deacetylase substrates using an acetylated peptide library of one-bead, one-compound (OBOC). A library of 104,907 unique peptides was constructed and screened utilising NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 for more efficient peptide sequences. As a result, it was discovered that SIRT1 can discriminate between peptide substrates depending on the context in which they find themselves.

[0008] The document, WO 08/27379, describes a method for monitoring the modulation of sirtuin activity by determining the level of acetylation of sirtuin substrates.

[0009] Documents, WO 07/149270 and WO 06/096780, describe a method for screening modulating molecules of sirtuin activity, which include as a crucial stage the determination of the level of acetylation of a specific peptide.

[0010] The document, WO 07/084162, describes new molecules with sirtuin inhibiting activity that are useful in the treatment and/or prevention of cancer and autoimmune diseases.

[0011] The abovementioned studies illustrate the difficulties and discrepancies that arise from methods for identifying specific substrates for sirtuins. With regard to peptide libraries, such libraries were limited to small sequences and are influenced by amino acids that can be incorporated and they provide information about artificial sequences in an artificial context.

[0012] As the methods proposed by publicly disclosed research do not demonstrate a consensus regarding their results, one can see that there exists a need for a method for identifying sirtuin modulators and in an appropriate cellular environment. The identification of modulating agents will help to clarify the role of sirtuins in cells and will aid in the development of diagnostic tests and the treatment of patients with modulators of the respective activity, as well as methods for identifying new modulating compounds.

[0013] The invention herein is different from all the documents relating to publicly disclosed research, as it proposes a new method for determining the modulation of sirtuin activity through the modulation of its gene expression. None of the documents from publicly disclosed research describes or even suggests that sirtuin activity can be modulated with agents that modulates its expression. Until now, publicly disclosed research has been concerned solely with the modulation of enzymatic sirtuin activity, which has already been expressed in the cell.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0014] Firstly, the invention herein provides a method and a kit for determining modulating agents of sirtuin gene expression.

[0015] An object of this invention is therefore a method for determining modulating agents comprised of the following stages:

[0016] a) contacting tissue cell(s) comprising at least of gene of the sirtuin family and the  $\beta$ -actin gene, with a modulating agent;

[0017] b) determining the relative abundance of mRNA of gene(s) of the sirtuin family;

[0018] c) determining the relative abundance of mRNA of the  $\beta$ -actin gene; and

[0019] d) determining the mRNA SIRT1/mRNA  $\beta$ -actin ratio.

[0020] In particular, tissue cell(s) comprising the abovementioned genes are those of zebrafish.

[0021] A further object of the invention herein is a kit for determining modulating agents comprising:

[0022] a) means for determining the relative abundance of mRNA of sirtuin-family genes; and

[0023] b) means for determining the relative abundance of mRNA of the  $\beta$ -actin gene.

[0024] Secondly, the invention herein provides a process for modulating sirtuins, in which the modulation of sirtuins is performed by way of the modulation of the gene expression of sirtuins.

[0025] An additional object of the invention herein is a modulating agent of sirtuin expression.

[0026] Another object of the invention herein is a pharmaceutical composition comprising:

[0027] a) a modulating agent of sirtuin expression; and

[0028] b) an acceptable pharmaceutical vehicle.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING FIGURES

[0029] Further features of the invention can be gathered from the accompanying drawings, in which:

[0030] FIG. 1 demonstrates one of the trees generated that was constructed utilising a proportional distance (p-distance) by way of the Neighbour-Joining (NJ) method, using the MEGA4.02 program. The tree contains seven well-settled terminal cladistic groupings with a high support amount, corresponding to each one of the sirtuins described. The phylogenetic tree consistently grouped together the orthologous sequences, SIRT1-SIRT7 of *Danio rerio* (Dr), *Gallus gallus* (Gg), *Mus musculus* (Mm) and *Homo sapiens* (Hs)

[0031] FIG. 2 demonstrates the pattern of expression of SIRT1 (A), SIRT2 (B), SIRT3 (C), SIRT3.2 (D), SIRT4 (E), SIRT5 (F), SIRT6 (G) and SIRT7 (H) in zebrafish. These results are expressed as an mRNA ratio of sirtuin/ $\beta$ -actin (mean  $\pm$ S.E.) from seven repeated, independent experiments. On the Y axis, I is the rate of mRNA, on the X axis, 1 is the spleen, 2 is the gills, 3 is the brain, 4 is the heart, 5 is the liver, 6 is the female sexual organ, 7 is the male sexual organ, 8 is muscle and 9 is the kidney, I is  $\beta$ -actin, II is SIRT1, III is SIRT2, IV is SIRT3, V is SIRT3.2, VI is SIRT4, VII is SIRT5, VIII is SIRT6, IX is SIRT7.

[0032] FIG. 3 demonstrates the evaluation of the effect of resveratrol in the modulation of sirtuin activity in zebrafish in different tissues in 4 animals (groups 1 to 4 on the X axis). On the Y axis, I is the rate of mRNA X, a is muscle and b is liver.

#### DETAILED DESCRIPTION OF PREFERRED EMBODIMENTS

[0033] The examples shown here have the single aim of exemplifying one of the numerous ways of carrying out the invention, however, without detracting from its purpose.

[0034] Sirtuins

[0035] For the purpose of this invention, the expression, "sirtuins", refers to the sequences (DNA and/or RNA), as well as the respective proteins, comprising at least 50% of homology with the sequences (DNA and/or RNA), as well as the respective proteins of the chosen genes of the group comprising SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7 and combinations of the same.

[0036] The respective sequences of the SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 and SIRT7 genes are described in the GenBank, under the access codes for the species, *Danio rerio* (XP\_001334440, AAH67165, XP\_684225, XP\_690925 (SIRT 3.2), AAH83418, AAH75987, NP\_001002071, XP\_698800), *Homo sapiens* (Q96EB6, Q8IXJ6, Q9NTG7, Q9Y6E7, Q9NXA8, Q8N6T7, Q9NRC8), *Mus musculus* (BAD38898, BAS38897, XP\_420920, XP\_415273, XP\_418925, NP\_001034409,

NP\_001026277) and *Gallus gallus* (NP\_062786, NP\_071877, CAJ18608, Q8R216, NP\_849179, NP\_853617, AAP83960).

[0037] Ideally, sirtuins that are useful in the invention herein possess DNA sequences with at least 50% homology with the sequences illustrated in FIG. 1.

[0038]  $\beta$ -Actin

[0039] For the purposes of this invention, the expression, " $\beta$ -actin" refers to sequences (DNA and/or RNA), as well as respective proteins, comprising at least 50% homology with the sequences (DNA and/or RNA), as well as respective proteins of the  $\beta$ -actin gene.

[0040] Ideally, the  $\beta$ -actin sequence is described in the GenBank under the access number, NM\_001101.

[0041] Cells comprising at least of gene of the sirtuin family

[0042] For the purposes of this invention, adequate cells are cells of vertebrate animals. Preferably, the vertebrate should be chosen from the group comprising fish, birds, mammals and combinations of the same.

[0043] Ideally, the vertebrate should be chosen from the group comprising *Danio rerio*, *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens* and combinations of the same.

[0044] The cell is chosen from different tissues in the animal. Examples of organs/tissues include, but are not limited to, the brain, kidney, sexual organs (male and female), spleen, gills, liver, muscle, heart and combinations of the same.

[0045] The zebrafish (*Danio rerio*) possess numerous advantageous characteristics that firstly make it the principal vertebrate model for biology studies in development and genetics and, subsequently, expansion to other areas of biological sciences. The zebrafish combines the characteristic of being a vertebrate with the study size of an invertebrate organism. The knowledge accumulated from the "Zebrafish Genome Project" together with the capability to quickly absorb chemical substances directly from water have the effect that it is increasingly used as well as a model species for studies in toxicology, pharmacology and human diseases.

[0046] The identification of genes related to sirtuins in zebrafish genomes and the determination of expression patterns in different tissues constitute a very powerful tool for screening modulating molecules for the activities of these proteins.

[0047] Method for Determining Modulating Agents

[0048] The method for determining modulating agents of sirtuin gene expression is comprised of the following stages:

[0049] a) contacting cells comprising at least on gene of the sirtuin family and the  $\beta$ -actin gene, with a modulating agent;

[0050] b) determining the relative abundance of mRNA of the sirtuin-family gene;

[0051] c) determining the relative abundance of the mRNA of the  $\beta$ -actin gene; and

[0052] d) determining the mRNA SIRTImRNA  $\beta$ -actin ratio.

[0053] Ideally, one determines the relative abundance by way of mRNA amplification tests in both genes. Said tests are common knowledge to experts in the subject and do not need to be described here in greater detail.

US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

3

**[0054]** In the event that the compound possesses a mRNA SIRTImRNA  $\beta$ -actin ratio that is greater than 1, the compound is classified as a positive modulator (amplifier) of sirtuin gene expression.

**[0055]** In the event that the compound possesses a mRNA SIRTImRNA  $\beta$ -actin ratio that is less than 1, the compound is classified as a negative modulator (inhibitor) of sirtuin gene expression.

**[0056]** Pharmaceutical Composition

**[0057]** For the purposes of this invention, pharmaceutical compositions include all compositions that contain an active principle, with prophylactic, palliative and/or curative purposes, which acts so as to maintain and/or restore homeostasis. It can be administered topically, parenterally, enterally and/or intrathecally.

**[0058]** The expression, "pharmaceutically acceptable", is employed here when referring to compounds, materials, compositions and/or dosage methods which, within the medical field, are appropriate for use in contact with human and animal tissue without excessive toxicity, irritation, allergic response or other problems or complications, it having a reasonable benefit/risk relationship.

**[0059]** The composition in the invention herein can be administered by way of an oral dosage, in the form of tablets, capsules (each one includes sustained liberation or formula-

tions with liberation time), pills, powders, granules, elixirs, dyes, suspensions, syrups and emulsions.

**[0060]** The pharmaceutical composition in this invention is comprised of:

**[0061]** a) a modulating agent for sirtuin expression; and

**[0062]** b) a vehicle which is acceptable pharmaceutically,

in which the mRNA SIRTImRNA  $\beta$ -actin ratio of the cell without the presence of the modulating agent is different from the mRNA SIRTImRNA  $\beta$ -actin ratio of the cell without the presence of the modulating agent.

#### Example

**[0063]** Eight genes related to sirtuins were identified in the zebrafish genome SIRT1-7 and a SIRT3 paralogue, named SIRT3.2 (Table 1) utilising the sequences deduced from *Homo sapiens* amino acids (Q96EB6, Q8IXJ6, Q9NTG7, Q9Y6E7, Q9NXA8, Q8N6T7, Q9NRC8) *Mus musculus* (BAD38898, BAD38897, Xp\_420920, XP\_415273, XP\_418925, NP\_001034409, NP\_001026277) and *Gallus gallus* (NP\_062786, NP\_071877, CAJ18608, Q8R216, NP\_849179, NP\_853617, AAP83960). The identity of each one of the eight sequences of zebrafish was confirmed by way of phylogenetic analysis (FIG. 1)

TABLE 1

Sequences Summary: Access number, primers sequence and PCR amplification conditions.			
		PCR Conditions	
Sirtuin	GenBank ID	Primers (5'-3')	Tm (° C.) Ciclos
SIRT 1	XP_001334440	F-CAGCTCTGCTACAATTCATCGCGTC R-AATCTCTGTAGAGTCCAGCGCGTGTG	62 30
SIRT 2	AAH67165.1	F-TCTCTGAAGAAATTCCTAAGTGCATTCC R-TTATCTGAATCAAAATCCATCCGCCCTC	61 30
SIRT 3	NP_001073643	F-CATTAATGTGGTGGACAAGAGGCCTG R-AGTCCCTCTCCTTTGTAATCCCTCCGAC	61 30
SIRT 3.2	NP_001038173.1	F-CGGCAGGCTGATGAAGCTTGGTCG R-TAGCTTGCTTGGCTTCTCTGCAGG	63 30
SIRT 4	AAH83418.1	F-TGTGCTGAAGTACTCCTCGTCTGAGC R-CGGAAGTTTTCTTCACTAGCAGCGAGG	63 30
SIRT 5	AAH75987.1	F-CCACGGTAGTCTGTTTAAACCCGCTG R-AGTGATATTTGAAGCCTTGGGTAGCAGG	61 30
SIRT 6	NP_001002071	F-GGACTGGGAGGACTCTCTGCCCGAC R-GCCCGGCCACTCCGGAACG	68 30
SIRT 7	AA155852.1	F-GCATTTTGGAGAAGCTGGCACTTTGG R-GTTTAGCCATGCTGAAGATGGGTCC	61 45

[0064] The mapping of the pattern and levels of expression in each one of the eight genes related to zebrafish sirtuin was determined in eight tissues (spleen, gills, brain, heart, liver, female sexual organs and male sexual organs, skeletal muscle

and kidneys), by way of the analysis of semi-quantitative RT-PCR comparing the relative abundance of mRNA of each one of the genes related to sirtuins with the mRNA of the gene codifying for  $\beta$ -actin (mean  $\pm$  S.E.) (FIG. 2 and Table 2).

TABLE 2

Gene expression pattern: relative expression of mRNA in genes related to sirtuin in different zebrafish tissues.								
Optical Density (O.D.) for SIRT $\beta$ -actin mRNA ratio (mean $\pm$ S.E.)								
Tissues	SIRT1	SIRT2	SIRT3	SIRT3.2	SIRT4	SIRT5	SIRT6	SIRT7
Spleen	1.07 $\pm$ 0.07	*	0.61 $\pm$ 0.05	*	*	0.44 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.03 <sup>g</sup>	0.56 $\pm$ 0.04 <sup>d,g</sup>
Gills	1.01 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.00 <sup>a,d,e</sup>	0.57 $\pm$ 0.16	*	0.36 $\pm$ 0.10 <sup>f</sup>	0.24 $\pm$ 0.01 <sup>e,f</sup>	0.38 $\pm$ 0.01 <sup>g</sup>	*
Brain	0.98 $\pm$ 0.05	0.65 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.52 $\pm$ 0.04	0.37 $\pm$ 0.03	0.46 $\pm$ 0.03	0.55 $\pm$ 0.03	0.56 $\pm$ 0.04 <sup>g,h</sup>	0.79 $\pm$ 0.10 <sup>g</sup>
Heart	1.05 $\pm$ 0.04	0.77 $\pm$ 0.05 <sup>b,h</sup>	0.46 $\pm$ 0.05	*	0.61 $\pm$ 0.07 <sup>h</sup>	0.45 $\pm$ 0.09	0.53 $\pm$ 0.06 <sup>g,h</sup>	0.83 $\pm$ 0.05
Liver	1.33 $\pm$ 0.34	0.56 $\pm$ 0.02	0.41 $\pm$ 0.04	0.49 $\pm$ 0.09	0.33 $\pm$ 0.06 <sup>f</sup>	0.56 $\pm$ 0.12	0.98 $\pm$ 0.17 <sup>a,b,c,d,e,f,h</sup>	1.19 $\pm$ 0.04 <sup>a,c,f,i</sup>
Female Sexual Organ	1.00 $\pm$ 0.04	0.51 $\pm$ 0.06	0.43 $\pm$ 0.03	0.54 $\pm$ 0.07	0.39 $\pm$ 0.06	0.61 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.59 $\pm$ 0.17 <sup>g,h</sup>	0.79 $\pm$ 0.05 <sup>g</sup>
Male Sexual Organ	1.97 $\pm$ 0.49 <sup>h,i</sup>	0.68 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.64 $\pm$ 0.17	0.51 $\pm$ 0.08	0.52 $\pm$ 0.12 <sup>h</sup>	0.56 $\pm$ 0.01	0.65 $\pm$ 0.03 <sup>g,h</sup>	0.92 $\pm$ 0.11 <sup>i,j</sup>
Skeletal Muscle	0.87 $\pm$ 0.01 <sup>g</sup>	0.37 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>	0.38 $\pm$ 0.05	*	0.19 $\pm$ 0.01 <sup>e,d,f</sup>	0.29 $\pm$ 0.02 <sup>f</sup>	0.19 $\pm$ 0.00 <sup>a,c,d,e,f</sup>	*
Kidney	0.89 $\pm$ 0.04 <sup>g</sup>	*	0.64 $\pm$ 0.06	*	0.69 $\pm$ 0.03 <sup>b,g,m</sup>	0.62 $\pm$ 0.09 <sup>b,h</sup>	0.41 $\pm$ 0.02 <sup>g</sup>	0.45 $\pm$ 0.09 <sup>d,g</sup>

The results were analysed by ANOVA followed by the post-hoc Tukey HSD test, considering  $P \leq 0.05$  as significant.

The mRNA levels were significantly different from

<sup>a</sup>spleen,

<sup>b</sup>gills,

<sup>c</sup>brain,

<sup>d</sup>heart,

<sup>e</sup>liver,

<sup>f</sup>female sexual organ,

<sup>g</sup>male masculine organ,

<sup>h</sup>skeletal muscle,

<sup>i</sup>kidney.

[0065] So as to evaluate modulation in this protein family, the effect of resveratrol (3,4',5-trihydroxy-trans-stilbene), a phytoalexin which is found in some food items, such as egg shell, peanuts and red wine, was evaluated and it promoted a significant increase in SIRT1 gene expression in skeletal muscle and liver in the proposed model (FIG. 3).

## SEQUENCE LISTING

<160> NUMBER OF SEQ ID NOS: 46

<210> SEQ ID NO 1

<211> LENGTH: 251

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Danio rerio

<400> SEQUENCE: 1

Met Ala Asp Gly Glu Asn Lys Arg Ala Glu Ser Ala Glu Pro Asp Glu  
1 5 10 15

Pro Leu Pro Lys Lys Pro Arg Leu Leu Glu Leu Ser Gly Asp Ser Glu  
20 25 30

His Ser Ala Thr Ala Gly Ala Asp Thr Leu Asp Glu Lys Pro Ala Arg  
35 40 45

Met Asp Glu Ser Gln Gln Ala Leu Ser Ile Asn Asn Asn Asn Thr  
50 55 60

Arg Pro Thr Glu Pro Gly Gln Pro Ala Asp Pro Glu Pro Glu Ile Ser  
65 70 75 80

US 2010/0184869 A1

5

Jul. 22, 2010

-continued

---

Glu Leu Thr Asp Glu Gly Val His Pro Asn Gly Phe Thr Ser Pro Asp  
 85 90 95  
 Leu Leu Arg Asp Asp Asp Asp Cys Ser Ser Arg Ala Ser Ser Ser Asp  
 100 105 110  
 Trp Thr Pro Gln Pro Gln Ile Gly Ser Tyr Arg Phe Ile Gln Gln His  
 115 120 125  
 Ile Met Arg Gly Thr Asp Pro Arg Ala Ile Leu Lys Asp Leu Leu Pro  
 130 135 140  
 Glu Thr Val Leu Pro Pro Asp Leu Asp Asp Met Thr Leu Trp Gln Ile  
 145 150 155  
 Ile Ile Asn Ile Ser Glu Pro Pro Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ile  
 165 170 175  
 Asn Thr Leu Glu Asp Val Val Arg Leu Leu Asn Glu Arg Lys Lys Ile  
 180 185 190  
 Leu Val Leu Thr Gly Ala Gly Val Ser Val Ser Cys Gly Ile Pro Asp  
 195 200 205  
 Phe Arg Ser Arg Asp Gly Ile Tyr Ala Arg Leu Ala Val Asp Phe Pro  
 210 215 220  
 Asp Leu Pro Asp Pro Gln Ala Met Phe Asp Ile Asp Tyr Phe Arg Arg  
 225 230 235 240  
 Asp Pro Arg Pro Phe Phe Lys Phe Ala Lys Val  
 245 250

<210> SEQ ID NO 2  
 <211> LENGTH: 379  
 <212> TYPE: PRT  
 <213> ORGANISM: Danio rerio  
 <400> SEQUENCE: 2

Met Ser Glu Glu Val Ser Lys Arg Val Glu Glu Glu Ala Asp Thr Pro  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Glu Gly Gln Ser Asp Asp Ser Ser Asp Glu Gly Asp Ala Ser  
 20 25 30  
 Gly Asp Thr Glu Met Asp Phe Leu Arg Ser Leu Phe Ser Arg Thr Leu  
 35 40 45  
 Gly Leu Ser Pro Gly Asp Lys Val Leu Asp Glu Leu Thr Leu Asp Ser  
 50 55 60  
 Val Ala Arg Tyr Ile Leu Ser Gly Lys Cys Lys Asn Ile Ile Cys Met  
 65 70 75 80  
 Val Gly Ala Gly Ile Ser Thr Ser Ala Gly Ile Pro Asp Phe His Ser  
 85 90 95  
 Pro Gly Thr Gly Leu Tyr Ala Asn Leu Gln Lys Tyr Asn Leu Pro Tyr  
 100 105 110  
 Pro Glu Ala Ile Phe Gln Ile Asp Tyr Phe Lys Lys His Pro Glu Pro  
 115 120 125  
 Phe Phe Ala Leu Ala Arg Glu Leu Tyr Pro Gly Gln Phe Lys Pro Thr  
 130 135 140  
 Val Cys His Tyr Phe Ile Lys Met Leu Lys Asp Lys Gly Leu Leu Arg  
 145 150 155 160  
 Arg Cys Tyr Ser Gln Asn Ile Asp Thr Leu Glu Arg Val Ala Gly Leu  
 165 170 175  
 Glu Gly Glu Asp Leu Ile Glu Ala His Gly Thr Phe His Thr Ser His

US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

6

-continued

180					185					190					
Cys	Val	Ser	Phe	Leu	Cys	Arg	Lys	Glu	Tyr	Ser	Met	Asp	Trp	Met	Lys
	195						200					205			
Asn	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Glu	Ile	Pro	Lys	Cys	Asp	Ser	Cys	Gly	Ser
	210					215					220				
Leu	Val	Lys	Pro	Asp	Ile	Val	Phe	Phe	Gly	Glu	Ser	Leu	Pro	Ser	Arg
	225					230					235				240
Phe	Phe	Thr	Ser	Met	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Gln	Cys	Asp	Leu	Leu	Ile
				245					250					255	
Ile	Met	Gly	Thr	Ser	Leu	Gln	Val	Gln	Pro	Phe	Ala	Ser	Leu	Val	Ser
		260						265						270	
Arg	Val	Ser	Asn	Arg	Cys	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Asn	Met	Glu	Lys	Thr
		275					280						285		
Gly	Gln	Ser	Glu	Phe	Gly	Met	Gly	Leu	Phe	Ser	Phe	Gly	Gly	Gly	Met
		290				295					300				
Asp	Phe	Asp	Ser	Asp	Lys	Ala	Tyr	Arg	Asp	Val	Ala	His	Leu	Ser	Thr
		305				310					315				320
Cys	Asp	Asp	Gly	Cys	Met	Thr	Leu	Ala	Glu	Leu	Leu	Gly	Trp	Lys	Lys
				325					330					335	
Glu	Leu	Glu	Glu	Met	Val	Lys	Arg	Glu	His	Ala	Leu	Ile	Asp	Ser	Lys
				340				345					350		
Asp	Ala	Lys	Lys	Thr	Asp	Lys	Glu	Ala	Ser	Gln	Ser	Ser	Lys	Ser	Ala
		355					360						365		
Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Thr	Asp	Lys	Thr	Glu					
		370					375								

&lt;210&gt; SEQ ID NO 3

&lt;211&gt; LENGTH: 357

&lt;212&gt; TYPE: PRT

&lt;213&gt; ORGANISM: Danio rerio

&lt;400&gt; SEQUENCE: 3

Met	Leu	Tyr	Leu	Asn	Thr	Phe	Leu	Pro	Ser	Val	Cys	Arg	Arg	Cys	Phe
1				5					10					15	
Ala	Glu	Asn	Leu	Leu	Trp	Arg	Arg	Gly	Leu	Thr	Thr	Thr	Gln	Asn	Leu
		20						25					30		
Ser	Arg	Thr	Lys	Leu	Val	His	Gln	Lys	Thr	Leu	Ser	His	Phe	Pro	His
		35				40						45			
Ala	Gln	Lys	Gly	Ala	Ala	Phe	Leu	Ser	Gln	Phe	Ile	Tyr	Cys	Pro	Ala
		50			55						60				
Ala	Phe	Ile	Lys	Cys	Gly	Gly	Thr	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Gly	Gly	Arg
		65			70				75					80	
Asp	Asn	Val	His	Gln	Gln	Thr	Leu	Glu	Asp	Ile	Ala	Glu	Lys	Ile	Arg
				85					90					95	
Glu	Arg	Lys	Phe	Lys	Arg	Ile	Val	Val	Met	Ala	Gly	Ala	Gly	Ile	Ser
			100					105					110		
Thr	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Phe	Arg	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Leu	Tyr
		115				120							125		
Asp	Asn	Leu	Gln	Gln	Tyr	Asn	Leu	Pro	Tyr	Ala	Glu	Ala	Ile	Phe	Glu
		130				135					140				
Ile	Asn	Tyr	Phe	His	His	Asn	Pro	Asn	Pro	Phe	Phe	Ala	Leu	Ala	Lys
		145			150						155				160

US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

7

-continued

---

```

Glu Leu Tyr Pro Gly Asn Tyr Gln Pro Asn Leu Thr His Tyr Phe Ile
      165                      170                      175
Arg Met Leu His Asp Lys Glu Gln Leu Leu Arg Met Tyr Thr Gln Asn
      180                      185                      190
Ile Asp Gly Leu Glu Arg Met Ala Gly Ile Pro Pro Lys Met Leu Val
      195                      200                      205
Glu Ala His Gly Thr Phe Ala Thr Ala Thr Cys Thr Val Cys Arg Arg
      210                      215                      220
Asp Tyr Lys Gly Glu Glu Leu Arg Asp Asp Ile Met Ala Gly Thr Val
      225                      230                      235                      240
Pro Lys Cys Pro Thr Cys Lys Gly Ile Ile Lys Pro Asp Ile Val Phe
      245                      250                      255
Phe Gly Glu Glu Leu Pro Gln His Phe Phe Thr Tyr Leu Thr Asp Phe
      260                      265                      270
Pro Ile Ala Asp Leu Leu Ile Val Met Gly Thr Ser Leu Glu Val Glu
      275                      280                      285
Pro Phe Ala Ser Leu Ala Gly Ala Val Arg Gly Ser Val Pro Arg Leu
      290                      295                      300
Leu Ile Asn Arg Asp Leu Val Gly Pro Phe Ala Ser Gly Ser Gln Arg
      305                      310                      315                      320
His Thr Asp Val Ala Glu Leu Gly Asp Val Val Asn Gly Val Lys Lys
      325                      330                      335
Leu Val Glu Leu Leu Gly Trp Lys Gln Glu Leu Glu Asp Leu Met Asn
      340                      345                      350
Val Gly Arg Asp Lys
      355

```

```

<210> SEQ ID NO 4
<211> LENGTH: 370
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Danio rerio
<400> SEQUENCE: 4

```

```

Met Ser Lys Ala Arg Leu Ser Arg Asp Arg Arg Ala Ala Ser Val Gly
  1      5      10      15
Val Ser Arg Val Thr Arg Ser Ser Met Met Ser Pro Gln Asp Cys Glu
  20      25      30
Arg Ser Arg Ala Pro Asp Pro Gly Leu Leu Asp Glu Leu Ser Leu Met
  35      40      45
Ser Val Ser Glu Gln Gln Ala Ser Ala Thr Arg Lys Gly Ser Ser Lys
  50      55      60
Pro Ala Leu Ser Ser Pro Ser Gly Arg Ser Val Ser Arg Gly Ala Leu
  65      70      75      80
Glu Thr Ile Gly Arg Leu Met Lys Leu Gly Arg Val Arg Asn Ile Val
  85      90      95
Val Val Ala Gly Ala Gly Ile Ser Thr Ala Ser Gly Ile Pro Asp Phe
  100     105     110
Arg Thr Pro Gly Thr Gly Leu Tyr Ala Asn Leu Ala Lys Tyr Asp Ile
  115     120     125
Pro Tyr Pro Glu Ala Val Phe Asn Ile Asp Tyr Phe Ser Asp Asn Pro
  130     135     140
His Pro Phe Phe Ser Leu Ala Lys Glu Leu Tyr Pro Gly His His Arg
  145     150     155     160

```



US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

8

-continued

---

```

Pro Asn Tyr Val His Tyr Phe Ile Arg Met Leu His Gln Lys Gly Leu
      165                               170                               175
Leu Leu Arg Met Tyr Thr Gln Asn Ile Asp Gly Leu Glu Lys Leu Cys
      180                               185                               190
Gly Ile Pro Asp Asp Lys Leu Val Glu Ala His Gly Ser Phe Ala Thr
      195                               200                               205
Ala Ala Cys His Leu Cys Tyr Thr Pro Tyr Pro Ala Glu Glu Ala Lys
      210                               215                               220
Gln Ala Ile Met Asn Gly Ser Val Pro Ile Cys Thr Phe Cys Ala Gly
      225                               230                               235                               240
Ala Val Lys Pro Asn Val Val Phe Phe Gly Glu Asp Leu Pro Glu Lys
      245                               250                               255
Tyr Phe Gln His Ala Glu Asp Phe Pro Lys Ala Asp Leu Leu Ile Ile
      260                               265                               270
Met Gly Thr Ser Leu Lys Ile Glu Pro Phe Ala Ser Leu Ile Asn Thr
      275                               280                               285
Val Lys Ser Thr Val Pro Arg Leu Leu Leu Asn Arg Asp Ala Val Gly
      290                               295                               300
Pro Phe Glu Arg Arg Pro Leu Arg Arg Ala Asp Tyr Met Glu Leu Gly
      305                               310                               315                               320
Asp Leu Ser Glu Ser Val Arg Lys Leu Ala Glu Ile Leu Gly Trp His
      325                               330                               335
Thr Glu Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser His Glu Asn Gly Leu Tyr Ser
      340                               345                               350
Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Glu Asn Ser Gly Asp Ser Glu Thr Asp Ser
      355                               360                               365
Met His
      370

```

```

<210> SEQ ID NO 5
<211> LENGTH: 310
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Danio rerio

```

```

<400> SEQUENCE: 5

```

```

Met Leu Leu Ser Cys Arg Tyr Leu Pro Pro Pro Val Ala Val Gly Arg
 1      5      10      15
Cys Ala Ser Thr Ile Gln Ala Gly Val Arg Gln Phe Val Pro Ala Ser
 20      25      30
Gly Ser Phe Asp Ser Ser Ala Leu Glu Gln Leu Gln Ala Phe Ile Ser
 35      40      45
Gln Ala Ser Arg Leu Phe Val Ile Ser Gly Ala Gly Leu Ser Thr Glu
 50      55      60
Ser Gly Ile Pro Asp Tyr Arg Ser Glu Gly Val Gly Leu Tyr Ala Arg
 65      70      75      80
Thr Asn Arg Arg Pro Met Gln His Ser Glu Phe Val Arg Ser Glu Lys
 85      90      95
Ser Arg Gln Arg Tyr Trp Ala Arg Asn Tyr Val Gly Trp Pro Gln Phe
100     105     110
Ser Ser His Gln Pro Asn Ser Ala His Leu Ala Leu Arg Asp Trp Glu
115     120     125
Glu Lys Gly Lys Leu His Trp Leu Val Thr Gln Asn Val Asp Ala Leu

```



US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

10

-continued

---

Cys Pro Ala Leu Asp Gly Lys Gly Ala Pro Asp Pro Asn Thr Lys Glu  
 180 185 190  
 Ala Arg Ile Pro Val Glu Leu Leu Pro Arg Cys Glu Arg Lys Ser Cys  
 195 200 205  
 Asn Gly Leu Leu Arg Pro His Val Val Trp Phe Gly Glu Thr Leu Asp  
 210 215 220  
 Ser Asp Ile Leu Thr Ala Val Glu Arg Glu Leu Glu Lys Cys Asp Leu  
 225 230 235 240  
 Cys Leu Val Val Gly Thr Ser Ser Ile Val Tyr Pro Ala Ala Met Phe  
 245 250 255  
 Ala Pro Gln Val Ala Ser Arg Gly Val Pro Val Ala Glu Phe Asn Met  
 260 265 270  
 Glu Cys Thr Pro Ala Thr Gln Arg Phe Lys Tyr His Phe Glu Gly Pro  
 275 280 285  
 Cys Gly Ser Thr Leu Pro Pro Ala Leu Glu Arg His Glu Ser Glu Ala  
 290 295 300  
 Val  
 305  
 <210> SEQ ID NO 7  
 <211> LENGTH: 354  
 <212> TYPE: PRT  
 <213> ORGANISM: Danio rerio  
 <400> SEQUENCE: 7  
 Met Ser Val Asn Tyr Ala Ala Gly Leu Ser Pro Tyr Ala Asp Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Ile Cys Gly Leu Pro Glu Thr Phe Asp Ser Pro Glu Glu Leu Lys Thr  
 20 25 30  
 Lys Val Glu Thr Leu Ala Gln Trp Ile Arg Glu Ser Gln Tyr Met Val  
 35 40 45  
 Val His Ser Gly Ala Gly Ile Ser Thr Ser Thr Gly Ile Pro Asp Phe  
 50 55 60  
 Arg Gly Pro Asn Gly Val Trp Thr Met Glu Glu Arg Gly Glu Thr Pro  
 65 70 75 80  
 His Phe Asn Thr Thr Phe Glu Asp Ala Arg Pro Ser Leu Thr His Met  
 85 90 95  
 Ala Leu Leu Gln Met Gln Arg Thr Gly His Leu Lys Tyr Leu Ile Ser  
 100 105 110  
 Gln Asn Val Asp Gly Leu His Val Arg Ser Gly Phe Pro Arg Asp Arg  
 115 120 125  
 Leu Ser Glu Leu His Gly Asn Met Phe Val Glu Glu Cys Glu Lys Cys  
 130 135 140  
 Gly Lys Gln Tyr Val Arg Asp Thr Val Val Gly Val Met Gly Leu Lys  
 145 150 155 160  
 Pro Thr Gly Arg Tyr Cys Asp Val Met Arg Ser Arg Gly Leu Arg Ser  
 165 170 175  
 Cys Arg Gly Lys Leu Ile Ser Ser Ile Leu Asp Trp Glu Asp Ser Leu  
 180 185 190  
 Pro Asp Arg Asp Leu Asn Arg Ala Asp Glu Ala Ser Arg Arg Ala Asp  
 195 200 205  
 Leu Ala Leu Thr Leu Gly Thr Ser Leu Gln Ile Lys Pro Ser Gly Asp  
 210 215 220

US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

11

-continued

---

```

Leu Pro Leu Leu Thr Lys Arg Thr Gly Gly Lys Leu Val Ile Val Asn
225                230                235                240

Leu Gln Pro Thr Lys His Asp Lys His Ala His Leu Arg Ile Tyr Gly
                245                250                255

Tyr Val Asp Asp Val Met Gly Gln Leu Met Lys Leu Leu Gly Leu Asp
                260                265                270

Val Pro Glu Trp Ala Gly Pro Thr Leu Cys Glu Asp Ser Gly Gly Asp
                275                280                285

Leu Asp Ile Leu Pro Tyr Gly Ala Trp Lys Lys Glu Val Lys Ile Glu
                290                295                300

Leu Lys Ile Glu Glu Ser Asn His Thr Val Ser Lys Lys Arg Lys Arg
305                310                315                320

Lys Glu Gln His Ala Glu Glu Gly Tyr Lys Asn Gly Val Lys Val Glu
                325                330                335

Glu Glu Met Lys Glu Glu Gly Lys Glu Ser Asp Ser His Val His Thr
                340                345                350

His Thr

<210> SEQ ID NO 8
<211> LENGTH: 397
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Danio rerio

<400> SEQUENCE: 8

Met Asp Val Arg Ile Asn Ser Gly Val Ser Ala Arg Ala Glu Arg Lys
1                5                10                15

Glu Gln Glu Lys Ala Lys Ile Ile Gln Arg Glu Lys Gln Arg Gln Thr
                20                25                30

Met Lys Thr Ile Ser Lys Ile Leu Gln Lys Cys Glu Ser Glu Trp Thr
                35                40                45

Glu Glu Glu Arg Ser Met Leu Gln Ala His Gln Asp Thr Val Gln Glu
50                55                60

Leu Ser Arg Arg Gln Asn Arg Arg His Leu Leu Lys Arg Lys Gln Glu
65                70                75                80

Glu Met Phe Asp Asp Ala Glu Asn Leu Lys Thr Lys Val Lys Gln Leu
                85                90                95

Ala Glu Ala Val Gln Arg Ala Lys His Leu Val Ile Tyr Thr Gly Ala
100               105               110

Gly Ile Ser Thr Ala Ala Ser Ile Pro Asp Tyr Arg Gly Pro Asn Gly
115               120               125

Val Trp Thr Gln Leu Gln Lys Gly Arg Ser Val Ser Thr Ser Asp Leu
130               135               140

Ser Gln Ala Glu Pro Thr Leu Thr His Met Ser Ile Trp Met Leu His
145               150               155               160

Lys Met Lys Met Val Arg Asn Cys Thr Ser Phe Met Trp Thr Pro Leu
165               170               175

His Val Thr Leu Ser Ser Pro Val Ser Cys Val Ser Gln Val Cys Asp
180               185               190

Ser Cys Ser Pro Pro Arg Glu Phe Ile Arg Leu Phe Asp Val Thr Glu
195               200               205

Arg Thr Ala Leu His Arg His Gly Thr Gly Arg Ser Cys Pro His Cys
210               215               220

```

US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

12

-continued

---

```

Arg Ala Glu Leu Arg Asp Thr Ile Val His Phe Gly Glu Arg Gly Thr
225                230                235                240
Leu Glu Gln Pro Leu Asn Trp Lys Gly Ala Ala Glu Ala Ala Gln Arg
                245                250                255
Ala Asp Leu Ile Leu Cys Leu Gly Ser Ser Leu Lys Val Leu Lys Lys
                260                265                270
Tyr Ser Cys Leu Trp Cys Met Asn Arg Pro Ala Ser Lys Arg Pro Lys
275                280
Leu Tyr Ile Val Asn Leu Gln Trp Thr Pro Lys Asp Asn Leu Ala Thr
290                295                300
Leu Lys Ile His Gly Lys Cys Asp Ala Val Met Ala Leu Leu Met Glu
305                310                315                320
Glu Leu Ala Leu Ala Gly Pro Val Tyr Ser Arg Leu Gln Asp Pro Ile
                325                330                335
Phe Ser Met Ala Lys Pro Leu Ser Pro Gln Glu Gln Lys Ser His Ser
                340                345                350
Arg Lys Glu Ile Ala Pro Pro Ser Ala Leu Glu Glu Val Ser Gln Ser
355                360                365
Ala Pro Pro Gln Gly Glu Gly Pro Ala Val Gln Gly Gly Trp Phe Gly
370                375                380
Arg Gly Tyr Ser Lys Gly Arg Arg Lys Lys Lys Ser Ser
385                390                395

```

```

<210> SEQ ID NO 9
<211> LENGTH: 747
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

```

```

<400> SEQUENCE: 9

```

```

Met Ala Asp Glu Ala Ala Leu Ala Leu Gln Pro Gly Gly Ser Pro Ser
1          5          10          15
Ala Ala Gly Ala Asp Arg Glu Ala Ala Ser Ser Pro Ala Gly Glu Pro
20          25          30
Leu Arg Lys Arg Pro Arg Arg Asp Gly Pro Gly Leu Glu Arg Ser Pro
35          40          45
Gly Glu Pro Gly Gly Ala Ala Pro Glu Arg Glu Val Pro Ala Ala Ala
50          55          60
Arg Gly Cys Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala Leu Trp Arg Glu Ala Glu
65          70          75          80
Ala Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Glu Gln Glu Ala Gln Ala Thr Ala
85          90          95
Ala Ala Gly Glu Gly Asp Asn Gly Pro Gly Leu Gln Gly Pro Ser Arg
100         105         110
Glu Pro Pro Leu Ala Asp Asn Leu Tyr Asp Glu Asp Asp Asp Glu
115         120         125
Gly Glu Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ile Gly Tyr Arg Asp
130         135         140
Asn Leu Leu Phe Gly Asp Glu Ile Ile Thr Asn Gly Phe His Ser Cys
145         150         155         160
Glu Ser Asp Glu Glu Asp Arg Ala Ser His Ala Ser Ser Ser Asp Trp
165         170         175
Thr Pro Arg Pro Arg Ile Gly Pro Tyr Thr Phe Val Gln Gln His Leu

```

US 2010/0184869 A1

13

Jul. 22, 2010

-continued

180			185			190									
Met	Ile	Gly	Thr	Asp	Pro	Arg	Thr	Ile	Leu	Lys	Asp	Leu	Leu	Pro	Glu
	195						200					205			
Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	Asp	Asp	Met	Thr	Leu	Trp	Gln	Ile	Val
	210						215					220			
Ile	Asn	Ile	Leu	Ser	Glu	Pro	Pro	Lys	Arg	Lys	Lys	Arg	Lys	Asp	Ile
	225						230			235					240
Asn	Thr	Ile	Glu	Asp	Ala	Val	Lys	Leu	Leu	Gln	Glu	Cys	Lys	Lys	Ile
										250					255
Ile	Val	Leu	Thr	Gly	Ala	Gly	Val	Ser	Val	Ser	Cys	Gly	Ile	Pro	Asp
										265					270
Phe	Arg	Ser	Arg	Asp	Gly	Ile	Tyr	Ala	Arg	Leu	Ala	Val	Asp	Phe	Pro
										280			285		
Asp	Leu	Pro	Asp	Pro	Gln	Ala	Met	Phe	Asp	Ile	Glu	Tyr	Phe	Arg	Lys
							295					300			
Asp	Pro	Arg	Pro	Phe	Phe	Lys	Phe	Ala	Lys	Glu	Ile	Tyr	Pro	Gly	Gln
							310			315					320
Phe	Gln	Pro	Ser	Leu	Cys	His	Lys	Phe	Ile	Ala	Leu	Ser	Asp	Lys	Glu
										330					335
Gly	Lys	Leu	Leu	Arg	Asn	Tyr	Thr	Gln	Asn	Ile	Asp	Thr	Leu	Glu	Gln
										345			350		
Val	Ala	Gly	Ile	Gln	Arg	Ile	Ile	Gln	Cys	His	Gly	Ser	Phe	Ala	Thr
										360			365		
Ala	Ser	Cys	Leu	Ile	Cys	Lys	Tyr	Lys	Val	Asp	Cys	Glu	Ala	Val	Arg
							375					380			
Gly	Asp	Ile	Phe	Asn	Gln	Val	Val	Pro	Arg	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Ala
										395					400
Asp	Glu	Pro	Leu	Ala	Ile	Met	Lys	Pro	Glu	Ile	Val	Phe	Phe	Gly	Glu
										410					415
Asn	Leu	Pro	Glu	Gln	Phe	His	Arg	Ala	Met	Lys	Tyr	Asp	Lys	Asp	Glu
										425			430		
Val	Asp	Leu	Leu	Ile	Val	Ile	Gly	Ser	Ser	Leu	Lys	Val	Arg	Pro	Val
										440			445		
Ala	Leu	Ile	Pro	Ser	Ser	Ile	Pro	His	Glu	Val	Pro	Gln	Ile	Leu	Ile
										455			460		
Asn	Arg	Glu	Pro	Leu	Pro	His	Leu	His	Phe	Asp	Val	Glu	Leu	Leu	Gly
										475					480
Asp	Cys	Asp	Val	Ile	Ile	Asn	Glu	Leu	Cys	His	Arg	Leu	Gly	Gly	Glu
										490			495		
Tyr	Ala	Lys	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro	Val	Lys	Leu	Ser	Glu	Ile	Thr	Glu
										505			510		
Lys	Pro	Pro	Arg	Thr	Gln	Lys	Glu	Leu	Ala	Tyr	Leu	Ser	Glu	Leu	Pro
										520			525		
Pro	Thr	Pro	Leu	His	Val	Ser	Glu	Asp	Ser	Ser	Ser	Pro	Glu	Arg	Thr
										535			540		
Ser	Pro	Pro	Asp	Ser	Ser	Val	Ile	Val	Thr	Leu	Leu	Asp	Gln	Ala	Ala
										555					560
Lys	Ser	Asn	Asp	Asp	Leu	Asp	Val	Ser	Glu	Ser	Lys	Gly	Cys	Met	Glu
										570					575
Glu	Lys	Pro	Gln	Glu	Val	Gln	Thr	Ser	Arg	Asn	Val	Glu	Ser	Ile	Ala
										585			590		

US 2010/0184869 A1

14

Jul. 22, 2010

-continued

---

Glu Gln Met Glu Asn Pro Asp Leu Lys Asn Val Gly Ser Ser Thr Gly  
 595 600 605  
 Glu Lys Asn Glu Arg Thr Ser Val Ala Gly Thr Val Arg Lys Cys Trp  
 610 615 620  
 Pro Asn Arg Val Ala Lys Glu Gln Ile Ser Arg Arg Leu Asp Gly Asn  
 625 630 635 640  
 Gln Tyr Leu Phe Leu Pro Pro Asn Arg Tyr Ile Phe His Gly Ala Glu  
 645 650 655  
 Val Tyr Ser Asp Ser Glu Asp Asp Val Leu Ser Ser Ser Ser Cys Gly  
 660 665 670  
 Ser Asn Ser Asp Ser Gly Thr Cys Gln Ser Pro Ser Leu Glu Glu Pro  
 675 680 685  
 Met Glu Asp Glu Ser Glu Ile Glu Glu Phe Tyr Asn Gly Leu Glu Asp  
 690 695 700  
 Glu Pro Asp Val Pro Glu Arg Ala Gly Gly Ala Gly Phe Gly Thr Asp  
 705 710 715 720  
 Gly Asp Asp Gln Glu Ala Ile Asn Glu Ala Ile Ser Val Lys Gln Glu  
 725 730 735  
 Val Thr Asp Met Asn Tyr Pro Ser Asn Lys Ser  
 740 745

&lt;210&gt; SEQ ID NO 10

&lt;211&gt; LENGTH: 389

&lt;212&gt; TYPE: PRT

&lt;213&gt; ORGANISM: Homo sapiens

&lt;400&gt; SEQUENCE: 10

Met Ala Glu Pro Asp Pro Ser His Pro Leu Glu Thr Gln Ala Gly Lys  
 1 5 10 15  
 Val Gln Glu Ala Gln Asp Ser Asp Ser Asp Ser Glu Gly Gly Ala Ala  
 20 25 30  
 Gly Gly Glu Ala Asp Met Asp Phe Leu Arg Asn Leu Phe Ser Gln Thr  
 35 40 45  
 Leu Ser Leu Gly Ser Gln Lys Glu Arg Leu Leu Asp Glu Leu Thr Leu  
 50 55 60  
 Glu Gly Val Ala Arg Tyr Met Gln Ser Glu Arg Cys Arg Arg Val Ile  
 65 70 75 80  
 Cys Leu Val Gly Ala Gly Ile Ser Thr Ser Ala Gly Ile Pro Asp Phe  
 85 90 95  
 Arg Ser Pro Ser Thr Gly Leu Tyr Asp Asn Leu Glu Lys Tyr His Leu  
 100 105 110  
 Pro Tyr Pro Glu Ala Ile Phe Glu Ile Ser Tyr Phe Lys Lys His Pro  
 115 120 125  
 Glu Pro Phe Phe Ala Leu Ala Lys Glu Leu Tyr Pro Gly Gln Phe Lys  
 130 135 140  
 Pro Thr Ile Cys His Tyr Phe Met Arg Leu Leu Lys Asp Lys Gly Leu  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Arg Cys Tyr Thr Gln Asn Ile Asp Thr Leu Glu Arg Ile Ala  
 165 170 175  
 Gly Leu Glu Gln Glu Asp Leu Val Glu Ala His Gly Thr Phe Tyr Thr  
 180 185 190  
 Ser His Cys Val Ser Ala Ser Cys Arg His Glu Tyr Pro Leu Ser Trp





US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

16

-continued

---

Gly Ser Gly Leu Tyr Ser Asn Leu Gln Gln Tyr Asp Leu Pro Tyr Pro  
 165 170 175  
 Glu Ala Ile Phe Glu Leu Pro Phe Phe Phe His Asn Pro Lys Pro Phe  
 180 185 190  
 Phe Thr Leu Ala Lys Glu Leu Tyr Pro Gly Asn Tyr Lys Pro Asn Val  
 195 200 205  
 Thr His Tyr Phe Leu Arg Leu Leu His Asp Lys Gly Leu Leu Leu Arg  
 210 215 220  
 Leu Tyr Thr Gln Asn Ile Asp Gly Leu Glu Arg Val Ser Gly Ile Pro  
 225 230 235 240  
 Ala Ser Lys Leu Val Glu Ala His Gly Thr Phe Ala Ser Ala Thr Cys  
 245 250 255  
 Thr Val Cys Gln Arg Pro Phe Pro Gly Glu Asp Ile Arg Ala Asp Val  
 260 265 270  
 Met Ala Asp Arg Val Pro Arg Cys Pro Val Cys Thr Gly Val Val Lys  
 275 280 285  
 Pro Asp Ile Val Phe Phe Gly Glu Pro Leu Pro Gln Arg Phe Leu Leu  
 290 295 300  
 His Val Val Asp Phe Pro Met Ala Asp Leu Leu Leu Ile Leu Gly Thr  
 305 310 315 320  
 Ser Leu Glu Val Glu Pro Phe Ala Ser Leu Thr Glu Ala Val Arg Ser  
 325 330 335  
 Ser Val Pro Arg Leu Leu Ile Asn Arg Asp Leu Val Gly Pro Leu Ala  
 340 345 350  
 Trp His Pro Arg Ser Arg Asp Val Ala Gln Leu Gly Asp Val Val His  
 355 360 365  
 Gly Val Glu Ser Leu Val Glu Leu Leu Gly Trp Thr Glu Glu Met Arg  
 370 375 380  
 Asp Leu Val Gln Arg Glu Thr Gly Lys Leu Asp Gly Pro Asp Lys  
 385 390 395  
  
 <210> SEQ ID NO 12  
 <211> LENGTH: 314  
 <212> TYPE: PRT  
 <213> ORGANISM: Homo sapiens  
  
 <400> SEQUENCE: 12  
 Met Lys Met Ser Phe Ala Leu Thr Phe Arg Ser Ala Lys Gly Arg Trp  
 1 5 10 15  
 Ile Ala Asn Pro Ser Gln Pro Cys Ser Lys Ala Ser Ile Gly Leu Phe  
 20 25 30  
 Val Pro Ala Ser Pro Pro Leu Asp Pro Glu Lys Val Lys Glu Leu Gln  
 35 40 45  
 Arg Phe Ile Thr Leu Ser Lys Arg Leu Leu Val Met Thr Gly Ala Gly  
 50 55 60  
 Ile Ser Thr Glu Ser Gly Ile Pro Asp Tyr Arg Ser Glu Lys Val Gly  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Ala Arg Thr Asp Arg Arg Pro Ile Gln His Gly Asp Phe Val  
 85 90 95  
 Arg Ser Ala Pro Ile Arg Gln Arg Tyr Trp Ala Arg Asn Phe Val Gly  
 100 105 110  
 Trp Pro Gln Phe Ser Ser His Gln Pro Asn Pro Ala His Trp Ala Leu  
 115 120 125

US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

17

-continued

---

```

Ser Thr Trp Glu Lys Leu Gly Lys Leu Tyr Trp Leu Val Thr Gln Asn
 130                               135                               140

Val Asp Ala Leu His Thr Lys Ala Gly Ser Arg Arg Leu Thr Glu Leu
 145                               150                               155                               160

His Gly Cys Met Asp Arg Val Leu Cys Leu Asp Cys Gly Glu Gln Thr
 165                               170                               175

Pro Arg Gly Val Leu Gln Glu Arg Phe Gln Val Leu Asn Pro Thr Trp
 180                               185                               190

Ser Ala Glu Ala His Gly Leu Ala Pro Asp Gly Asp Val Phe Leu Ser
 195                               200                               205

Glu Glu Gln Val Arg Ser Phe Gln Val Pro Thr Cys Val Gln Cys Gly
 210                               215                               220

Gly His Leu Lys Pro Asp Val Val Phe Phe Gly Asp Thr Val Asn Pro
 225                               230                               235                               240

Asp Lys Val Asp Phe Val His Lys Arg Val Lys Glu Ala Asp Ser Leu
 245                               250                               255

Leu Val Val Gly Ser Ser Leu Gln Val Tyr Ser Gly Tyr Arg Phe Ile
 260                               265                               270

Leu Thr Ala Trp Glu Lys Lys Leu Pro Ile Ala Ile Leu Asn Ile Gly
 275                               280                               285

Pro Thr Arg Ser Asp Asp Leu Ala Cys Leu Lys Leu Asn Ser Arg Cys
 290                               295                               300

Gly Glu Leu Leu Pro Leu Ile Asp Pro Cys
 305                               310

```

&lt;210&gt; SEQ ID NO 13

&lt;211&gt; LENGTH: 310

&lt;212&gt; TYPE: PRT

&lt;213&gt; ORGANISM: Homo sapiens

&lt;400&gt; SEQUENCE: 13

```

Met Arg Pro Leu Gln Ile Val Pro Ser Arg Leu Ile Ser Gln Leu Tyr
 1                               5                               10                               15

Cys Gly Leu Lys Pro Pro Ala Ser Thr Arg Asn Gln Ile Cys Leu Lys
 20                               25                               30

Met Ala Arg Pro Ser Ser Ser Met Ala Asp Phe Arg Lys Phe Phe Ala
 35                               40                               45

Lys Ala Lys His Ile Val Ile Ile Ser Gly Ala Gly Val Ser Ala Glu
 50                               55                               60

Ser Gly Val Pro Thr Phe Arg Gly Ala Gly Gly Tyr Trp Arg Lys Trp
 65                               70                               75                               80

Gln Ala Gln Asp Leu Ala Thr Pro Leu Ala Phe Ala His Asn Pro Ser
 85                               90                               95

Arg Val Trp Glu Phe Tyr His Tyr Arg Arg Glu Val Met Gly Ser Lys
 100                              105                              110

Glu Pro Asn Ala Gly His Arg Ala Ile Ala Glu Cys Glu Thr Arg Leu
 115                              120                              125

Gly Lys Gln Gly Arg Arg Val Val Val Ile Thr Gln Asn Ile Asp Glu
 130                              135                              140

Leu His Arg Lys Ala Gly Thr Lys Asn Leu Leu Glu Ile His Gly Ser
 145                              150                              155                              160

Leu Phe Lys Thr Arg Cys Thr Ser Cys Gly Val Val Ala Glu Asn Tyr

```

US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

18

-continued

---

	165		170		175
Lys Ser Pro Ile Cys Pro Ala Leu Ser Gly Lys Gly Ala Pro Glu Pro	180		185		190
Gly Thr Gln Asp Ala Ser Ile Pro Val Glu Lys Leu Pro Arg Cys Glu	195		200		205
Glu Ala Gly Cys Gly Gly Leu Leu Arg Pro His Val Val Trp Phe Gly	210		215		220
Glu Asn Leu Asp Pro Ala Ile Leu Glu Glu Val Asp Arg Glu Leu Ala	225		230		235
His Cys Asp Leu Cys Leu Val Val Gly Thr Ser Ser Val Val Tyr Pro	245		250		255
Ala Ala Met Phe Ala Pro Gln Val Ala Ala Arg Gly Val Pro Val Ala	260		265		270
Glu Phe Asn Thr Glu Thr Thr Pro Ala Thr Asn Arg Phe Arg Phe His	275		280		285
Phe Gln Gly Pro Cys Gly Thr Thr Leu Pro Glu Ala Leu Ala Cys His	290		295		300
Glu Asn Glu Thr Val Ser	305		310		

&lt;210&gt; SEQ ID NO 14

&lt;211&gt; LENGTH: 355

&lt;212&gt; TYPE: PRT

&lt;213&gt; ORGANISM: Homo sapiens

&lt;400&gt; SEQUENCE: 14

Met Ser Val Asn Tyr Ala Ala Gly Leu Ser Pro Tyr Ala Asp Lys Gly	1		5		10		15
Lys Cys Gly Leu Pro Glu Ile Phe Asp Pro Pro Glu Glu Leu Glu Arg	20		25		30		35
Lys Val Trp Glu Leu Ala Arg Leu Val Trp Gln Ser Ser Ser Val Val	40		45		50		55
Phe His Thr Gly Ala Gly Ile Ser Thr Ala Ser Gly Ile Pro Asp Phe	60		65		70		75
Arg Gly Pro His Gly Val Trp Thr Met Glu Glu Arg Gly Leu Ala Pro	80		85		90		95
Lys Phe Asp Thr Thr Phe Glu Ser Ala Arg Pro Thr Gln Thr His Met	100		105		110		115
Ala Leu Val Gln Leu Glu Arg Val Gly Leu Leu Arg Phe Leu Val Ser	120		125		130		135
Gln Asn Val Asp Gly Leu His Val Arg Ser Gly Phe Pro Arg Asp Lys	140		145		150		155
Leu Ala Glu Leu His Gly Asn Met Phe Val Glu Glu Cys Ala Lys Cys	160		165		170		175
Lys Thr Gln Tyr Val Arg Asp Thr Val Val Gly Thr Met Gly Leu Lys	180		185		190		195
Ala Thr Gly Arg Leu Cys Thr Val Ala Lys Ala Arg Gly Leu Arg Ala	200		205		210		215
Cys Arg Gly Glu Leu Arg Asp Thr Ile Leu Asp Trp Glu Asp Ser Leu	220		225		230		235
Pro Asp Arg Asp Leu Ala Leu Ala Asp Glu Ala Ser Arg Asn Ala Asp	240		245		250		255

US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

19

-continued

---

```

Leu Ser Ile Thr Leu Gly Thr Ser Leu Gln Ile Arg Pro Ser Gly Asn
 210                215                220
Leu Pro Leu Ala Thr Lys Arg Arg Gly Gly Arg Leu Val Ile Val Asn
 225                230                235                240
Leu Gln Pro Thr Lys His Asp Arg His Ala Asp Leu Arg Ile His Gly
                245                250                255
Tyr Val Asp Glu Val Met Thr Arg Leu Met Lys His Leu Gly Leu Glu
 260                265                270
Ile Pro Ala Trp Asp Gly Pro Arg Val Leu Glu Arg Ala Leu Pro Pro
 275                280                285
Leu Pro Arg Pro Pro Thr Pro Lys Leu Glu Pro Lys Glu Glu Ser Pro
 290                295                300
Thr Arg Ile Asn Gly Ser Ile Pro Ala Gly Pro Lys Gln Glu Pro Cys
 305                310                315                320
Ala Gln His Asn Gly Ser Glu Pro Ala Ser Pro Lys Arg Glu Arg Pro
                325                330                335
Thr Ser Pro Ala Pro His Arg Pro Pro Lys Arg Val Lys Ala Lys Ala
 340                345                350
Val Pro Ser
 355

<210> SEQ ID NO 15
<211> LENGTH: 400
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 15
Met Ala Ala Gly Gly Leu Ser Arg Ser Glu Arg Lys Ala Ala Glu Arg
 1      5      10      15
Val Arg Arg Leu Arg Glu Glu Gln Gln Arg Glu Arg Leu Arg Gln Val
 20     25     30
Ser Arg Ile Leu Arg Lys Ala Ala Ala Glu Arg Ser Ala Glu Glu Gly
 35     40     45
Arg Leu Leu Ala Glu Ser Ala Asp Leu Val Thr Glu Leu Gln Gly Arg
 50     55     60
Ser Arg Arg Arg Glu Gly Leu Lys Arg Arg Gln Glu Glu Val Cys Asp
 65     70     75     80
Asp Pro Glu Glu Leu Arg Gly Lys Val Arg Glu Leu Ala Ser Ala Val
 85     90     95
Arg Asn Ala Lys Tyr Leu Val Val Tyr Thr Gly Ala Gly Ile Ser Thr
 100    105    110
Ala Ala Ser Ile Pro Asp Tyr Arg Gly Pro Asn Gly Val Trp Thr Leu
 115    120    125
Leu Gln Lys Gly Arg Ser Val Ser Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ala Glu
 130    135    140
Pro Thr Leu Thr His Met Ser Ile Thr Arg Leu His Glu Gln Lys Leu
 145    150    155    160
Val Gln His Val Val Ser Gln Asn Cys Asp Gly Leu His Leu Arg Ser
 165    170    175
Gly Leu Pro Arg Thr Ala Ile Ser Glu Leu His Gly Asn Met Tyr Ile
 180    185    190
Glu Val Cys Thr Ser Cys Val Pro Asn Arg Glu Tyr Val Arg Val Phe
 195    200    205

```

US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

20

-continued

```

Asp Val Thr Glu Arg Thr Ala Leu His Arg His Gln Thr Gly Arg Thr
 210                215                220

Cys His Lys Cys Gly Thr Gln Leu Arg Asp Thr Ile Val His Phe Gly
 225                230                235                240

Glu Arg Gly Thr Leu Gly Gln Pro Leu Asn Trp Glu Ala Ala Thr Glu
                245                250                255

Ala Ala Ser Arg Ala Asp Thr Ile Leu Cys Leu Gly Ser Ser Leu Lys
                260                265                270

Val Leu Lys Lys Tyr Pro Arg Leu Trp Cys Met Thr Lys Pro Pro Ser
 275                280                285

Arg Arg Pro Lys Leu Tyr Ile Val Asn Leu Gln Trp Thr Pro Lys Asp
 290                295                300

Asp Trp Ala Ala Leu Lys Leu His Gly Lys Cys Asp Asp Val Met Arg
 305                310                315                320

Leu Leu Met Ala Glu Leu Gly Leu Glu Ile Pro Ala Tyr Ser Arg Trp
                325                330                335

Gln Asp Pro Ile Phe Ser Leu Ala Thr Pro Leu Arg Ala Gly Glu Glu
 340                345                350

Gly Ser His Ser Arg Lys Ser Leu Cys Arg Ser Arg Glu Glu Ala Pro
 355                360                365

Pro Gly Asp Arg Gly Ala Pro Leu Ser Ser Ala Pro Ile Leu Gly Gly
 370                375                380

Trp Phe Gly Arg Gly Cys Thr Lys Arg Thr Lys Arg Lys Lys Val Thr
 385                390                395                400

```

&lt;210&gt; SEQ ID NO 16

&lt;211&gt; LENGTH: 756

&lt;212&gt; TYPE: PRT

&lt;213&gt; ORGANISM: Gallus gallus

&lt;400&gt; SEQUENCE: 16

```

Met Ala Asp Gly Glu Ala Pro Leu Leu Arg Pro Arg Asp Gly Gly Pro
 1                5                10                15

Gly Ala Ala Ala Glu Ser Val Glu Pro Ala Pro Lys Arg Gln Arg Leu
 20                25                30

Asn Ser Glu Asp Gly Val Cys Gly Arg Gly Ala Pro Pro Ala His Arg
 35                40                45

Pro Asp Arg Gly Ala Gly Pro Pro Pro Ala Ala Ala Ala Thr Glu
 50                55                60

Pro Pro Gly Asp Ala Ala Ala Val Ser Ala Asp Gly Asp Val Arg Ala
 65                70                75                80

Arg Glu Glu Asp Gly Gly Ala Thr Thr Glu Gly Arg Ser Gly Ala Asp
 85                90                95

Asn Arg Ala Ala Gln Arg Gly Leu Ala Arg Ala Glu Pro Pro Pro Gln
 100               105               110

Pro Arg Arg Gln Gly Arg Gly Glu Gly Ala Glu Ala Ala Pro Gly Glu
 115               120               125

Asp Ala Ala Glu Ala Ala Ile Gly Cys Glu Arg Ala Gln Arg Ser Asn
 130               135               140

Gly Ala Ala Gly Ala Pro Ala Pro Gln Pro Asp Asn Phe Leu Leu Ser
 145               150               155               160

Asp Glu Ile Ile Ala Asn Gly Phe His Ser Cys Asp Ser Asp Glu Asp

```

US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

21

-continued

165					170					175					
Asp	Arg	Ala	Ser	His	Ala	Ser	Ser	Ser	Asp	Trp	Thr	Pro	Arg	Pro	Arg
			180					185						190	
Ile	Gly	Pro	Tyr	Thr	Phe	Val	Gln	Gln	His	Leu	Met	Leu	Gly	Thr	Asp
		195					200						205		
Pro	Arg	Thr	Ile	Leu	Lys	Asp	Leu	Leu	Pro	Glu	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro
		210				215					220				
Glu	Leu	Asp	Asp	Met	Thr	Leu	Trp	Gln	Ile	Val	Ile	Asn	Ile	Leu	Ser
		225				230					235				240
Glu	Pro	Pro	Lys	Arg	Lys	Lys	Arg	Lys	Asp	Val	Asn	Thr	Ile	Asp	Asp
			245						250					255	
Ala	Val	Lys	Leu	Leu	Gln	Glu	Cys	Lys	Lys	Ile	Met	Val	Leu	Thr	Gly
			260					265						270	
Ala	Gly	Val	Ser	Val	Ser	Cys	Gly	Ile	Pro	Asp	Phe	Arg	Ser	Arg	Asp
		275					280						285		
Gly	Ile	Tyr	Ala	Arg	Leu	Ala	Val	Asp	Phe	Pro	Asp	Leu	Pro	Asp	Pro
		290				295						300			
Gln	Ala	Met	Phe	Asp	Ile	Glu	Tyr	Phe	Arg	Lys	Asp	Pro	Arg	Pro	Phe
		305				310					315				320
Phe	Lys	Phe	Ala	Lys	Glu	Ile	Tyr	Pro	Gly	Gln	Phe	Gln	Pro	Ser	Leu
			325						330					335	
Cys	His	Lys	Phe	Ile	Ala	Leu	Met	Asp	Lys	Glu	Gly	Lys	Leu	Leu	Arg
			340					345						350	
Asn	Tyr	Thr	Gln	Asn	Ile	Asp	Thr	Leu	Glu	Gln	Val	Ala	Gly	Ile	Gln
		355				360							365		
Arg	Ile	Ile	Gln	Cys	His	Gly	Ser	Phe	Ala	Thr	Ala	Ser	Cys	Leu	Ile
		370				375						380			
Cys	Lys	Tyr	Lys	Val	Asp	Cys	Glu	Val	Val	Arg	Gly	Asp	Ile	Phe	Asn
		385				390					395				400
Gln	Val	Val	Pro	Arg	Cys	Pro	Arg	Cys	Leu	Pro	Asp	Glu	Pro	Leu	Ala
			405						410					415	
Ile	Met	Lys	Pro	Asp	Ile	Val	Phe	Phe	Gly	Glu	Asn	Leu	Pro	Glu	Gln
			420					425					430		
Phe	His	Arg	Ala	Met	Lys	Tyr	Asp	Lys	Asn	Glu	Val	Asp	Leu	Leu	Ile
		435					440					445			
Val	Ile	Gly	Ser	Ser	Leu	Lys	Val	Arg	Pro	Val	Ala	Leu	Ile	Pro	Ser
		450				455						460			
Ser	Ile	Pro	His	Glu	Val	Pro	Gln	Ile	Leu	Ile	Asn	Arg	Glu	Pro	Leu
		465				470					475				480
Pro	His	Leu	His	Phe	Asp	Val	Glu	Leu	Leu	Gly	Asp	Cys	Asp	Val	Ile
			485						490					495	
Ile	Ser	Glu	Leu	Cys	Gln	Arg	Leu	Gly	Ser	Glu	Tyr	Thr	Lys	Leu	Cys
			500					505					510		
Tyr	Asn	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Glu	Ile	Thr	Glu	Lys	Pro	Pro	Arg	Met
		515					520					525			
His	Lys	Glu	Leu	Glu	Met	His	Ser	Ser	Glu	Leu	Pro	Pro	Thr	Pro	Leu
		530				535						540			
Asp	Ile	Ser	Glu	Asp	Ser	Gly	Ser	Pro	Glu	Gln	Met	Thr	Pro	Pro	Gly
		545				550					555				560
Thr	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Glu	His	Ala	Ala	Glu	Cys	Lys	Val	Glu	Asn
			565						570					575	

US 2010/0184869 A1

22

Jul. 22, 2010

-continued

---

Ser Asp Pro Ala Ser Glu Thr Lys Gly Ile Cys Thr Glu Glu Lys Leu  
                   580                                  585                                  590  
 Gln Asp Thr Gln Ala Ser Ser Glu Asn Pro Glu Asn Pro Ala Ser Glu  
                   595                                  600                                  605  
 Leu Met Asn Ser Glu Thr Met Lys Glu Asn Gly Thr Asn Asn Gly Glu  
                   610                                  615                                  620  
 Ser Lys Glu Lys Asn Glu Ile Val Lys Lys Cys Trp Val Asn Arg Ser  
                   625                                  630                                  635  
 Ala Lys Glu Gln Ile Ser Lys Arg Leu Asp Gly Thr Gln Tyr Leu Phe  
                   645                                  650                                  655  
 Leu Pro Pro Asn Arg Tyr Ile Phe His Gly Ala Glu Val Tyr Ser Asp  
                   660                                  665  
 Ser Glu Asp Asp Met Ile Ser Ser Ser Ser Cys Gly Ser Ser Ser Glu  
                   675                                  680                                  685  
 Ser Gly Ser Cys His Ser Gln Ser Leu Asp Val Glu Asp Glu Ser Glu  
                   690                                  695                                  700  
 Ile Glu Glu Phe Tyr Asn Gly Ile Glu Asp Glu Asp Ala Pro Glu Arg  
                   705                                  710                                  715                                  720  
 Glu Val Glu Ala Ala Phe Glu Glu Asp Gly Val Glu Gln Asp Ala Ala  
                   725                                  730                                  735  
 Asp Glu Ser Ala Tyr Thr Asn Glu Ala Ala Gly Asn Asp His Pro Thr  
                   740                                  745                                  750  
 Ser Asn Lys Leu  
                   755

<210> SEQ ID NO 17  
 <211> LENGTH: 388  
 <212> TYPE: PRT  
 <213> ORGANISM: Gallus gallus

<400> SEQUENCE: 17

Met Ser Glu Ala Asp Ala Pro Pro Pro Gly Ala Asp Pro Asp Ala Glu  
 1                  5                                  10                                  15  
 Ala Glu Gly Gly Ser Glu Glu Asp Ser Asp Met Glu Leu Leu Arg Asn  
                   20                                  25                                  30  
 Leu Leu Ala Arg Thr Leu Gly Leu Gly Thr Glu Pro Pro Glu Arg Val  
                   35                                  40                                  45  
 Leu Asp Glu Leu Ser Leu Ala Gly Ile Ala Arg Phe Met Gln Ser Glu  
                   50                                  55                                  60  
 Arg Cys Arg Arg Val Val Cys Met Val Gly Ala Gly Ile Ser Thr Ala  
                   65                                  70                                  75                                  80  
 Ala Gly Ile Pro Asp Phe Arg Ser Pro Gly Thr Gly Leu Tyr Ala Asn  
                   85                                  90                                  95  
 Leu Gly Arg Tyr Glu Leu Pro Tyr Pro Glu Ala Ile Phe Asp Ile Ser  
                   100                                  105                                  110  
 Tyr Phe Lys Gln His Pro Glu Pro Phe Phe Ala Leu Ala Lys Glu Leu  
                   115                                  120                                  125  
 Leu Pro Gly Gln Leu Lys Pro Thr Val Cys His Tyr Phe Met Arg Leu  
                   130                                  135                                  140  
 Leu Lys Glu Lys Gly Leu Leu Leu Arg Cys Tyr Thr Gln Asn Ile Asp  
                   145                                  150                                  155                                  160  
 Thr Leu Glu Arg Val Ala Gly Leu Gln Pro Glu Glu Leu Val Glu Ala





US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

24

-continued

---

Leu Ala Tyr Phe Phe Ile Asn Pro Lys Pro Phe Phe Thr Leu Ala Lys  
 130 135 140  
 Glu Leu Tyr Pro Gly Asn Tyr Arg Pro Asn Tyr Ala His Tyr Phe Leu  
 145 150 155 160  
 Arg Leu Leu His Asp Lys Gly Leu Leu Leu Arg Leu Tyr Thr Gln Asn  
 165 170 175  
 Ile Asp Gly Leu Glu Arg Val Ala Gly Ile Pro Pro Asp Arg Leu Val  
 180 185 190  
 Glu Ala His Gly Thr Phe Ala Thr Ala Thr Cys Thr Val Cys Arg Arg  
 195 200 205  
 Lys Phe Pro Gly Glu Asp Phe Arg Gly Asp Val Met Ala Asp Lys Val  
 210 215 220  
 Pro His Cys Arg Val Cys Thr Gly Ile Val Lys Pro Asp Ile Val Phe  
 225 230 235 240  
 Phe Gly Glu Glu Leu Pro Gln Arg Phe Phe Leu His Met Thr Asp Phe  
 245 250 255  
 Pro Met Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Gly Thr Ser Leu Glu Val Glu  
 260 265 270  
 Pro Phe Ala Ser Leu Ala Gly Ala Val Arg Asn Ser Val Pro Arg Val  
 275 280 285  
 Leu Ile Asn Arg Asp Leu Val Gly Pro Phe Ala Trp Gln Gln Arg Tyr  
 290 295 300  
 Asn Asp Ile Ala Gln Leu Gly Asp Val Val Thr Gly Val Glu Lys Met  
 305 310 315 320  
 Val Glu Leu Leu Asp Trp Asn Glu Glu Met Gln Thr Leu Ile Gln Lys  
 325 330 335  
 Glu Lys Glu Lys Leu Asp Ala Lys Asp Lys  
 340 345

&lt;210&gt; SEQ ID NO 19

&lt;211&gt; LENGTH: 512

&lt;212&gt; TYPE: PRT

&lt;213&gt; ORGANISM: Gallus gallus

&lt;400&gt; SEQUENCE: 19

Met Ala Gly Tyr Trp Glu Lys Phe Ser Thr Ser Asn Asn Arg Ala Ser  
 1 5 10 15  
 Asp Lys Pro His Trp Leu Arg Tyr Cys His Cys Ala Lys Leu Thr Ala  
 20 25 30  
 Pro Ser Ala Pro Pro Thr Arg Pro Glu Ala Ala Pro Pro Pro Thr Ser  
 35 40 45  
 Gln Arg Ala Gly Ala Leu Pro Arg Ala Pro His Leu Arg Pro Arg Ala  
 50 55 60  
 Pro Pro Ala Ala Ala Ala Pro Arg Ser Glu Arg Arg Cys Val Arg Gly  
 65 70 75 80  
 Gly Ala Arg Arg Ser Gly Ala Ala Ala Glu Leu Glu Arg Gly Val Cys  
 85 90 95  
 Arg Glu Pro Ala Met Val Met Ser Ala Gly Arg Ala Ala Pro Ala Arg  
 100 105 110  
 Glu Glu Gly Leu Arg Arg Ala Ala Glu Gly Gly Cys Glu Ala Leu Gly  
 115 120 125  
 Ala Val Pro Gly Leu Tyr Pro Cys Arg Lys Leu Gly Phe Cys Ser Leu  
 130 135 140

US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

25

-continued

---

```

Asn His Gly Asn Cys Ser Arg Cys Ala Glu Leu Cys Thr Asp Cys Ile
145                               150                               155                               160

Ser His Lys Ala Leu Leu Ala Gly Ser Arg Ser Arg Ser Trp Gln Arg
                               165                               170                               175

Tyr Glu Arg Ala Phe Arg Val Cys Ala Lys Ala Asn Ala Val Cys Gly
180                               185                               190

Pro Arg Ser Leu Asn Met Phe Pro Ala Arg Arg Leu Pro Gly Gly Cys
195                               200                               205

Arg Ala Ile Arg Pro His His Leu Arg His His Ser Val Pro Ser Ala
210                               215                               220

Ser Pro Asn Leu Ala Phe Val Pro Ala Cys Leu Pro Pro His Pro Ala
225                               230                               235                               240

Glu Val Glu Glu Met Gln Arg Phe Ile Ser Asn Ser Lys Lys Leu Phe
245                               250                               255

Val Met Thr Gly Ala Gly Ile Ser Thr Glu Ser Gly Ile Pro Asp Tyr
260                               265                               270

Arg Ser Glu Gly Val Gly Leu Tyr Ala Arg Ser Asp Arg Arg Pro Ile
275                               280                               285

Gln His Ala Glu Phe Val Arg Ser Ala Thr Ala Arg Gln Arg Tyr Trp
290                               295                               300

Ala Arg Asn Phe Val Gly Trp Pro Gln Phe Ser Ser His Gln Pro Asn
305                               310                               315

Thr Ala His Leu Val Leu Arg His Trp Glu Lys Leu Gly Lys Leu His
325                               330                               335

Trp Leu Val Thr Gln Asn Val Asp Ala Leu His Thr Lys Ala Gly Ser
340                               345                               350

Gln Arg Met Thr Glu Leu His Gly Cys Thr His Arg Val Phe Cys Leu
355                               360                               365

Thr Cys Gly Asp Gln Thr Ser Arg Ser Glu Leu Gln Glu His Phe Glu
370                               375                               380

Ala Leu Asn Pro Gly Trp Lys Ala Glu Ala Leu Gly Val Ala Pro Asp
385                               390                               395                               400

Gly Asp Ala Phe Leu Thr Asp Glu Gln Val Arg Asn Phe Gln Val Pro
405                               410                               415

Ala Cys Arg Lys Cys Gly Gly Ile Leu Lys Pro Asp Val Thr Phe Phe
420                               425                               430

Gly Asp Thr Val Ser Arg Glu Lys Val Asp Phe Val His Gln Arg Leu
435                               440                               445

Ala Glu Ser Asp Ser Met Leu Val Ala Gly Ser Ser Met Gln Val Tyr
450                               455                               460

Ser Gly Tyr Arg Phe Ala Leu Ala Ala Arg Glu Lys Gln Leu Pro Ile
465                               470                               475                               480

Ala Val Leu Asn Ile Gly Pro Thr Arg Leu Asp His Phe Ala Ser Leu
485                               490                               495

Lys Leu Asn Ser Arg Cys Gly Glu Leu Leu Pro Leu Ile Val Ala His
500                               505                               510

```

&lt;210&gt; SEQ ID NO 20

&lt;211&gt; LENGTH: 423

&lt;212&gt; TYPE: PRT

&lt;213&gt; ORGANISM: Gallus gallus

US 2010/0184869 A1

26

Jul. 22, 2010

-continued

&lt;400&gt; SEQUENCE: 20

---

```

Met Gly Asp Val Pro Arg Ser Glu Ala Gly Pro Arg Pro Ala Val Pro
 1      5      10      15
Ala Ala Ala Phe Gly Cys Ser Ala Ala Leu Arg Gly Ser Leu Gln Pro
 20      25
Gly Ser Ala Ala Ala Phe Ser Glu Glu Pro Leu Arg Thr Ala Pro Gln
 35      40      45
Ala Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ala Ala Arg Arg Ala Lys Lys Gln Pro
 50      55      60
Arg Arg Gly Gly Gly Ala Pro Arg Cys Arg Gly Ala Glu Gly Gly Pro
 65      70      75      80
Gly Arg Ala Gly Asp Val Arg Arg Arg Thr Ala Gly Leu Ser Gly Ala
 85      90      95
Glu Glu Arg Pro Ala Leu Arg Leu Pro Ser Gly Gln Arg Ile Val Ala
 100     105     110
Val Leu Met Cys Leu Ala Gln Cys Ala Ala Arg Arg Leu Leu Ala Gln
 115     120     125
Val His Gly Ala Leu Lys Pro Ala Pro Lys Lys Pro Asn Trp Cys Trp
 130     135     140
Glu Met Ala Arg Pro Ser Ser Asn Met Ala Asp Phe Arg Glu Val Phe
 145     150     155     160
Ala Lys Ala Lys His Ile Ala Ile Ile Thr Gly Ala Gly Val Ser Ala
 165     170     175
Glu Ser Gly Val Pro Thr Phe Arg Gly Ala Gly Gly Phe Trp Arg Lys
 180     185     190
Trp Gln Ala Gln Glu Leu Ala Thr Pro Gly Ala Phe Ala Arg Asn Pro
 195     200     205
Ser Arg Val Trp Glu Phe Tyr His Tyr Arg Arg Glu Val Met Leu Ser
 210     215     220
Lys His Pro Asn Ala Ala His Ile Ala Ile Ala Glu Cys Glu Lys Arg
 225     230     235     240
Leu Arg Lys Gln Gly Arg Ser Val Val Val Ile Thr Gln Asn Ile Asp
 245     250     255
Glu Leu His Arg Lys Ala Gly Thr Lys His Leu Leu Glu Ile His Gly
 260     265     270
Ser Leu Phe Lys Thr Arg Cys Thr Asn Cys Gly Asn Val Thr Ala Asn
 275     280     285
Tyr Lys Ser Pro Ile Cys Pro Ala Leu Ala Gly Lys Gly Ala Pro Asp
 290     295     300
Pro Glu Ile Glu Asp Ala Ala Ile Pro Val Glu Glu Leu Pro Gln Cys
 305     310     315     320
Glu Glu Asp Gly Cys His Gly Leu Leu Arg Pro His Val Val Trp Phe
 325     330     335
Gly Glu Thr Leu Asp Pro Asp Val Leu Thr Glu Val Glu Lys Glu Leu
 340     345     350
Asp Leu Cys Asp Leu Cys Leu Val Val Gly Thr Ser Ser Val Val Tyr
 355     360     365
Pro Ala Ala Met Phe Ala Pro Gln Val Ser Ala Arg Gly Val Pro Val
 370     375     380
Ala Glu Phe Asn Met Glu Ala Thr Pro Ala Thr Asp Arg Phe Arg Phe
 385     390     395     400

```

US 2010/0184869 A1

27

Jul. 22, 2010

-continued

His Phe Glu Gly Pro Cys Gly Thr Thr Leu Pro Pro Ala Leu Ala Arg  
405 410 415

His Glu Ser Glu Ile Ile Ala  
420

<210> SEQ ID NO 21

<211> LENGTH: 357

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Gallus gallus

<400> SEQUENCE: 21

Met Ala Val Asn Tyr Ala Ala Gly Leu Ser Pro Tyr Ser Asp Lys Gly  
1 5 10 15

Lys Cys Gly Leu Pro Glu Ile Phe Asp Pro Pro Glu Glu Leu Glu Arg  
20 25 30

Lys Val Cys Glu Leu Ala Asp Leu Ile Arg Ser Ser Ser Asn Val Val  
35 40 45

Phe His Thr Gly Ala Gly Ile Ser Thr Ala Ser Gly Ile Pro Asp Phe  
50 55 60

Arg Gly Pro Asn Gly Val Trp Thr Met Glu Glu Lys Gly Leu Ser Pro  
65 70 75 80

Lys Phe Asp Thr Thr Phe Glu Asn Ala Arg Pro Ser Lys Thr His Met  
85 90 95

Ala Leu Leu Gly Leu Gln Arg Val Gly Ile Leu Lys Phe Leu Val Ser  
100 105 110

Gln Asn Val Asp Gly Leu His Val Arg Ser Gly Phe Pro Arg Asp Lys  
115 120 125

Leu Ala Glu Leu His Gly Asn Met Phe Val Glu Glu Cys Met Lys Cys  
130 135 140

Gly Lys Gln Tyr Val Arg Asp Ala Val Val Gly Ser Met Gly Leu Lys  
145 150 155 160

Pro Thr Gly Arg Leu Cys Ser Val Thr Lys Ala Arg Gly Leu Arg Ala  
165 170 175

Cys Arg Gly Lys Leu Arg Asp Thr Ile Leu Asp Trp Glu Asp Ser Leu  
180 185 190

Pro Asp Arg Asp Leu Thr Leu Ala Asp Glu Ala Cys Arg Lys Ala Asp  
195 200 205

Leu Ser Val Thr Leu Gly Thr Ser Leu Gln Ile Lys Pro Ser Gly Asn  
210 215 220

Leu Pro Leu Ile Thr Lys Lys Arg Gly Gly Lys Leu Val Ile Val Asn  
225 230 235 240

Leu Gln Ala Thr Lys His Asp Arg Gln Ala Asp Leu Arg Ile His Ala  
245 250 255

Tyr Val Asp Asp Val Met Thr Lys Leu Leu Lys His Leu Gly Leu Glu  
260 265 270

Val Pro Glu Trp Thr Gly Pro Val Val Val Glu Ser Ala Asp Ser Ala  
275 280 285

Lys Pro Glu Gln Leu Tyr Thr Phe Lys Pro Glu Ala His Gly Leu Leu  
290 295 300

Lys Glu Glu Pro Phe Ser Gln His Asn Gly Thr Ala Gly Gln Cys Pro  
305 310 315 320

Asp Leu Gly Thr Thr Leu Val Glu His Arg Asp Ser Leu Lys Gln Glu



US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

29

-continued

---

Arg Leu Leu Met Glu Glu Leu Gly Leu Gln Ile Pro Gly Tyr Glu Arg  
 325 330 335

Ala Arg Asp Pro Ile Phe Ala Leu Ala Glu Pro Leu Arg Pro Glu Glu  
 340 345 350

Glu Gly Thr His Ser Arg Lys Pro Val Ala Pro Pro Gln Gly Thr Glu  
 355 360 365

Pro Ala Ala Ala Pro Arg Asp Glu Pro Pro Ala Arg Pro Gly Gly Trp  
 370 375 380

Leu Gly Arg Gly Cys Ala Lys Gly Thr Arg Arg Arg Lys Ser Asn  
 385 390 395

&lt;210&gt; SEQ ID NO 23

&lt;211&gt; LENGTH: 737

&lt;212&gt; TYPE: PRT

&lt;213&gt; ORGANISM: Mus musculus

&lt;400&gt; SEQUENCE: 23

Met Ala Asp Glu Val Ala Leu Ala Leu Gln Ala Ala Gly Ser Pro Ser  
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Met Glu Ala Ala Ser Gln Pro Ala Asp Glu Pro Leu  
 20 25 30

Arg Lys Arg Pro Arg Arg Asp Gly Pro Gly Leu Gly Arg Ser Pro Gly  
 35 40 45

Glu Pro Ser Ala Ala Val Ala Pro Ala Ala Ala Gly Cys Glu Ala Ala  
 50 55 60

Ser Ala Ala Ala Pro Ala Ala Leu Trp Arg Glu Ala Ala Gly Ala Ala  
 65 70 75 80

Ala Ser Ala Glu Arg Glu Ala Pro Ala Thr Ala Val Ala Gly Asp Gly  
 85 90 95

Asp Asn Gly Ser Gly Leu Arg Arg Glu Pro Arg Ala Ala Asp Asp Phe  
 100 105 110

Asp Asp Asp Glu Gly Glu Glu Glu Asp Glu Ala Ala Ala Ala Ala  
 115 120 125

Ala Ala Ala Ile Gly Tyr Arg Asp Asn Leu Leu Leu Thr Asp Gly Leu  
 130 135 140

Leu Thr Asn Gly Phe His Ser Cys Glu Ser Asp Asp Asp Asp Arg Thr  
 145 150 155 160

Ser His Ala Ser Ser Ser Asp Trp Thr Pro Arg Pro Arg Ile Gly Pro  
 165 170 175

Tyr Thr Phe Val Gln Gln His Leu Met Ile Gly Thr Asp Pro Arg Thr  
 180 185 190

Ile Leu Lys Asp Leu Leu Pro Glu Thr Ile Pro Pro Pro Glu Leu Asp  
 195 200 205

Asp Met Thr Leu Trp Gln Ile Val Ile Asn Ile Leu Ser Glu Pro Pro  
 210 215 220

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ile Asn Thr Ile Glu Asp Ala Val Lys  
 225 230 235 240

Leu Leu Gln Glu Cys Lys Lys Ile Ile Val Leu Thr Gly Ala Gly Val  
 245 250 255

Ser Val Ser Cys Gly Ile Pro Asp Phe Arg Ser Arg Asp Gly Ile Tyr  
 260 265 270

Ala Arg Leu Ala Val Asp Phe Pro Asp Leu Pro Asp Pro Gln Ala Met  
 275 280 285

US 2010/0184869 A1

30

Jul. 22, 2010

-continued

---

Phe Asp Ile Glu Tyr Phe Arg Lys Asp Pro Arg Pro Phe Phe Lys Phe  
 290 295 300  
 Ala Lys Glu Ile Tyr Pro Gly Gln Phe Gln Pro Ser Leu Cys His Lys  
 305 310 315 320  
 Phe Ile Ala Leu Ser Asp Lys Glu Gly Lys Leu Leu Arg Asn Tyr Thr  
 325 330 335  
 Gln Asn Ile Asp Thr Leu Glu Gln Val Ala Gly Ile Gln Arg Ile Leu  
 340 345 350  
 Gln Cys His Gly Ser Phe Ala Thr Ala Ser Cys Leu Ile Cys Lys Tyr  
 355 360 365  
 Lys Val Asp Cys Glu Ala Val Arg Gly Asp Ile Phe Asn Gln Val Val  
 370 375 380  
 Pro Arg Cys Pro Arg Cys Pro Ala Asp Glu Pro Leu Ala Ile Met Lys  
 385 390 395 400  
 Pro Glu Ile Val Phe Phe Gly Glu Asn Leu Pro Glu Gln Phe His Arg  
 405 410 415  
 Ala Met Lys Tyr Asp Lys Asp Glu Val Asp Leu Leu Ile Val Ile Gly  
 420 425 430  
 Ser Ser Leu Lys Val Arg Pro Val Ala Leu Ile Pro Ser Ser Ile Pro  
 435 440 445  
 His Glu Val Pro Gln Ile Leu Ile Asn Arg Glu Pro Leu Pro His Leu  
 450 455 460  
 His Phe Asp Val Glu Leu Leu Gly Asp Cys Asp Val Ile Ile Asn Glu  
 465 470 475 480  
 Leu Cys His Arg Leu Gly Gly Glu Tyr Ala Lys Leu Cys Cys Asn Pro  
 485 490 495  
 Val Lys Leu Ser Glu Ile Thr Glu Lys Pro Pro Arg Pro Gln Lys Glu  
 500 505 510  
 Leu Val His Leu Ser Glu Leu Pro Thr Pro Leu His Ile Ser Glu  
 515 520 525  
 Asp Ser Ser Ser Pro Glu Arg Thr Val Pro Gln Asp Ser Ser Val Ile  
 530 535 540  
 Ala Thr Leu Val Asp Gln Ala Thr Asn Asn Asn Val Asn Asp Leu Glu  
 545 550 555 560  
 Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Glu Lys Pro Gln Glu Val Gln Thr  
 565 570 575  
 Ser Arg Asn Val Glu Asn Ile Asn Val Glu Asn Pro Asp Phe Lys Ala  
 580 585 590  
 Val Gly Ser Ser Thr Ala Asp Lys Asn Glu Arg Thr Ser Val Ala Glu  
 595 600 605  
 Thr Val Arg Lys Cys Trp Pro Asn Arg Leu Ala Lys Glu Gln Ile Ser  
 610 615 620  
 Lys Arg Leu Glu Gly Asn Gln Tyr Leu Phe Val Pro Pro Asn Arg Tyr  
 625 630 635 640  
 Ile Phe His Gly Ala Glu Val Tyr Ser Asp Ser Glu Asp Asp Val Leu  
 645 650 655  
 Ser Ser Ser Ser Cys Gly Ser Asn Ser Asp Ser Gly Thr Cys Gln Ser  
 660 665 670  
 Pro Ser Leu Glu Glu Pro Leu Glu Asp Glu Ser Glu Ile Glu Glu Phe  
 675 680 685





US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

32

-continued

---

Gly Gly Met Asp Phe Asp Ser Lys Lys Ala Tyr Arg Asp Val Ala Trp  
 305 310 315 320

Leu Gly Asp Cys Asp Gln Gly Cys Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Gly  
 325 330 335

Trp Lys Lys Glu Leu Glu Asp Leu Val Arg Arg Glu His Ala Asn Ile  
 340 345 350

Asp Ala Gln Ser Gly Ser Gln Ala Pro Asn Pro Ser Thr Thr Ile Ser  
 355 360 365

Pro Gly Lys Ser Pro Pro Pro Ala Lys Glu Ala Ala Arg Thr Lys Glu  
 370 375 380

Lys Glu Glu Gln Gln  
 385

<210> SEQ ID NO 25  
 <211> LENGTH: 257  
 <212> TYPE: PRT  
 <213> ORGANISM: Mus musculus

<400> SEQUENCE: 25

Met Val Gly Ala Gly Ile Ser Thr Pro Ser Gly Ile Pro Asp Phe Arg  
 1 5 10 15

Ser Pro Gly Ser Gly Leu Tyr Ser Asn Leu Gln Gln Tyr Asp Ile Pro  
 20 25 30

Tyr Pro Glu Ala Ile Phe Glu Leu Gly Phe Phe Phe His Asn Pro Lys  
 35 40 45

Pro Phe Phe Met Leu Ala Lys Glu Leu Tyr Pro Gly His Tyr Arg Pro  
 50 55 60

Asn Val Thr His Tyr Phe Leu Arg Leu Leu His Asp Lys Glu Leu Leu  
 65 70 75 80

Leu Arg Leu Tyr Thr Gln Asn Ile Asp Gly Leu Glu Arg Ala Ser Gly  
 85 90 95

Ile Pro Ala Ser Lys Leu Val Glu Ala His Gly Thr Phe Val Thr Ala  
 100 105 110

Thr Cys Thr Val Cys Arg Arg Ser Phe Pro Gly Glu Asp Ile Trp Ala  
 115 120 125

Asp Val Met Ala Asp Arg Val Pro Arg Cys Pro Val Cys Thr Gly Val  
 130 135 140

Val Lys Pro Asp Ile Val Phe Phe Gly Glu Gln Leu Pro Ala Arg Phe  
 145 150 155 160

Leu Leu His Met Ala Asp Phe Ala Leu Ala Asp Leu Leu Leu Ile Leu  
 165 170 175

Gly Thr Ser Leu Glu Val Glu Pro Phe Ala Ser Leu Ser Glu Ala Val  
 180 185 190

Gln Lys Ser Val Pro Arg Leu Leu Ile Asn Arg Asp Leu Val Gly Pro  
 195 200 205

Phe Val Leu Ser Pro Arg Arg Lys Asp Val Val Gln Leu Gly Asp Val  
 210 215 220

Val His Gly Val Glu Arg Leu Val Asp Leu Leu Gly Trp Thr Gln Glu  
 225 230 235 240

Leu Leu Asp Leu Met Gln Arg Glu Arg Gly Lys Leu Asp Gly Gln Asp  
 245 250 255

Arg

US 2010/0184869 A1

33

Jul. 22, 2010

-continued

---

```

<210> SEQ ID NO 26
<211> LENGTH: 333
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Mus musculus

<400> SEQUENCE: 26
Met Ser Gly Leu Thr Phe Arg Pro Thr Lys Gly Arg Trp Ile Thr His
1      5      10      15
Leu Ser Arg Pro Arg Ser Cys Gly Pro Ser Gly Leu Phe Val Pro Pro
20     25     30
Ser Pro Pro Leu Asp Pro Glu Lys Ile Lys Glu Leu Gln Arg Phe Ile
35     40     45
Ser Leu Ser Lys Lys Leu Leu Val Met Thr Gly Ala Gly Ile Ser Thr
50     55     60
Glu Ser Ser Ile Pro Asp Tyr Arg Ser Glu Lys Val Gly Leu Tyr Ala
65     70     75     80
Arg Thr Asp Arg Arg Pro Ile Gln His Ile Asp Phe Val Arg Ser Ala
85     90     95
Pro Val Arg Gln Arg Tyr Trp Ala Arg Asn Phe Val Gly Trp Pro Gln
100    105    110
Phe Ser Ser His Gln Pro Asn Pro Ala His Trp Ala Leu Ser Asn Trp
115    120    125
Glu Arg Leu Gly Lys Leu His Trp Leu Val Thr Gln Asn Val Asp Ala
130    135    140
Leu His Ser Lys Ala Gly Ser Gln Arg Leu Thr Glu Leu His Gly Cys
145    150    155    160
Met His Arg Val Leu Cys Leu Asn Cys Gly Glu Gln Thr Ala Arg Arg
165    170    175
Val Leu Gln Glu Arg Phe Gln Ala Leu Asn Pro Ser Trp Ser Ala Glu
180    185    190
Ala Gln Gly Val Ala Pro Asp Gly Asp Val Phe Leu Thr Glu Glu Gln
195    200    205
Val Arg Ser Phe Gln Val Pro Cys Cys Asp Arg Cys Gly Gly Pro Leu
210    215    220
Lys Pro Asp Val Val Phe Phe Gly Asp Thr Val Asn Pro Asp Lys Val
225    230    235    240
Asp Phe Val His Arg Arg Val Lys Glu Ala Asp Ser Leu Leu Val Val
245    250    255
Gly Ser Ser Leu Gln Val Tyr Ser Gly Tyr Arg Phe Ile Leu Thr Ala
260    265    270
Arg Glu Gln Lys Leu Pro Ile Ala Ile Leu Asn Ile Gly Pro Thr Arg
275    280    285
Ser Asp Asp Leu Ala Cys Leu Lys Leu Asp Ser Arg Cys Gly Glu Leu
290    295    300
Leu Pro Leu Ile Asp Pro Arg Arg Gln His Ser Asp Val Gln Arg Leu
305    310    315    320
Glu Met Asn Phe Pro Leu Ser Ser Ala Ala Gln Asp Pro
325    330

```

```

<210> SEQ ID NO 27
<211> LENGTH: 310
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Mus musculus

```

US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

34

-continued

&lt;400&gt; SEQUENCE: 27

```

Met Arg Pro Leu Leu Ile Ala Pro Gly Arg Phe Ile Ser Gln Leu Cys
1           5           10           15
Cys Arg Arg Lys Pro Pro Ala Ser Pro Gln Ser Lys Ile Cys Leu Thr
20           25           30
Met Ala Arg Pro Ser Ser Asn Met Ala Asp Phe Arg Lys Cys Phe Ala
35           40           45
Asn Ala Lys His Ile Ala Ile Ile Ser Gly Ala Gly Val Ser Ala Glu
50           55           60
Ser Gly Val Pro Thr Phe Arg Gly Ala Gly Tyr Trp Arg Lys Trp
65           70           75           80
Gln Ala Gln Asp Leu Ala Thr Pro Gln Ala Phe Ala Arg Asn Pro Ser
85           90           95
Gln Val Trp Glu Phe Tyr His Tyr Arg Arg Glu Val Met Arg Ser Lys
100          105          110
Glu Pro Asn Pro Gly His Leu Ala Ile Ala Gln Cys Glu Ala Arg Leu
115          120          125
Arg Asp Gln Gly Arg Arg Val Val Val Ile Thr Gln Asn Ile Asp Glu
130          135          140
Leu His Arg Lys Ala Gly Thr Lys Asn Leu Leu Glu Ile His Gly Thr
145          150          155          160
Leu Phe Lys Thr Arg Cys Thr Ser Cys Gly Thr Val Ala Glu Asn Tyr
165          170          175
Arg Ser Pro Ile Cys Pro Ala Leu Ala Gly Lys Gly Ala Pro Glu Pro
180          185          190
Glu Thr Gln Asp Ala Arg Ile Pro Val Asp Lys Leu Pro Arg Cys Glu
195          200          205
Glu Ala Gly Cys Gly Gly Leu Leu Arg Pro His Val Val Trp Phe Gly
210          215          220
Glu Asn Leu Asp Pro Ala Ile Leu Glu Glu Val Asp Arg Glu Leu Ala
225          230          235          240
Leu Cys Asp Leu Cys Leu Val Val Gly Thr Ser Ser Val Val Tyr Pro
245          250          255
Ala Ala Met Phe Ala Pro Gln Val Ala Ser Arg Gly Val Pro Val Ala
260          265          270
Glu Phe Asn Met Glu Thr Thr Pro Ala Thr Asp Arg Phe Arg Phe His
275          280          285
Phe Pro Gly Pro Cys Gly Lys Thr Leu Pro Glu Ala Leu Ala Pro His
290          295          300
Glu Thr Glu Arg Thr Ser
305          310

```

&lt;210&gt; SEQ ID NO 28

&lt;211&gt; LENGTH: 334

&lt;212&gt; TYPE: PRT

&lt;213&gt; ORGANISM: Mus musculus

&lt;400&gt; SEQUENCE: 28

```

Met Ser Val Asn Tyr Ala Ala Gly Leu Ser Pro Tyr Ala Asp Lys Gly
1           5           10           15
Lys Cys Gly Leu Pro Glu Ile Phe Asp Pro Pro Glu Glu Leu Glu Arg
20           25           30

```



US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

36

-continued

50	55	60
Arg Ser Arg Arg Arg Glu Gly Leu Lys Arg Arg Gln Glu Glu Val Cys 65 70 75 80		
Asp Asp Pro Glu Glu Leu Arg Arg Lys Val Arg Glu Leu Ala Arg Ala 85 90 95		
Val Arg Ser Ala Arg His Leu Val Val Tyr Thr Gly Ala Gly Ile Ser 100 105 110		
Thr Ala Ala Ser Ile Pro Asp Tyr Arg Gly Pro Asn Gly Val Trp Thr 115 120 125		
Leu Leu Gln Lys Gly Arg Pro Val Ser Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ala 130 135 140		
Glu Pro Thr Leu Thr His Met Ser Ile Thr Arg Leu His Glu Gln Lys 145 150 155 160		
Leu Val Gln His Val Val Ser Gln Asn Cys Asp Gly Leu His Leu Arg 165 170 175		
Ser Gly Leu Pro Arg Thr Ala Ile Ser Glu Leu His Gly Asn Met Tyr 180 185 190		
Ile Glu Val Cys Thr Ser Cys Ile Pro Asn Arg Glu Tyr Val Arg Val 195 200 205		
Phe Asp Val Thr Glu Arg Thr Ala Leu His Arg His Leu Thr Gly Arg 210 215 220		
Thr Cys His Lys Cys Gly Thr Gln Leu Arg Asp Thr Ile Val His Phe 225 230 235 240		
Gly Glu Arg Gly Thr Leu Gly Gln Pro Leu Asn Trp Glu Ala Ala Thr 245 250 255		
Glu Ala Ala Ser Lys Ala Asp Thr Ile Leu Cys Leu Gly Ser Ser Leu 260 265 270		
Lys Val Leu Lys Lys Tyr Pro Arg Leu Trp Cys Met Thr Lys Pro Pro 275 280 285		
Ser Arg Arg Pro Lys Leu Tyr Ile Val Asn Leu Gln Trp Thr Pro Lys 290 295 300		
Asp Asp Trp Ala Ala Leu Lys Leu His Gly Lys Cys Asp Asp Val Ile 305 310 315 320		
Gln Leu Leu Met Asn Glu Leu Gly Leu Glu Ile Pro Val Tyr Ser Arg 325 330 335		
Trp Gln Asp Pro Ile Phe Ser Leu Ala Thr Pro Leu Arg Ala Gly Glu 340 345 350		
Glu Gly Ser His Ser Arg Lys Ser Leu Cys Arg Ser Arg Glu Glu Ala 355 360 365		
Pro Pro Gly Asp Gln Ser Asp Pro Leu Ala Ser Ala Pro Pro Ile Leu 370 375 380		
Gly Gly Trp Phe Gly Arg Gly Cys Ala Lys Arg Ala Lys Arg Lys Lys 385 390 395 400		
Val Ala		

<210> SEQ ID NO 30  
 <211> LENGTH: 1852  
 <212> TYPE: DNA  
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 30

accgcgcgaga ccgcgtccgc cccgcgagca cagagcctcg cctttgccga tcgcgcgcc 60

US 2010/0184869 A1

37

Jul. 22, 2010

- continued

---

```

gtccacaccc gccgccagct caccatggat gatgatatcg ccgcgctcgt cgtcgacaac 120
ggctccggca tgtgcaaggc cggcttcgcg ggcgacgatg ccccccggc cgtcttcccc 180
tccatcgtgg gccgccccag gcaccagggc gtgatgggtg gcatgggtca gaaggattcc 240
tatgtgggcg acgaggccca gagcaagaga ggcaccccca ccctgaagta ccccatcgag 300
cacggcatcg tcaccaactg ggacgacatg gagaaaatct ggccaccacac cttctacaat 360
gagctgcgtg tggctccccg ggagcacccc gtgctgctga ccgaggcccc cctgaacccc 420
aaggccaacc gcgagaagat gaccagatc atgtttgaga ccttcaacac cccagccatg 480
tacgttgcta tccaggctgt gctatccctg tacgcctctg gccgtaccac tggcactcgt 540
atggactccg gtgacggggg caccacact gtgccatct acgaggggta tgccctcccc 600
catgccatcc tgcgtctgga cctggctggc cgggacctga ctgactacct catgaagatc 660
ctcaccgagc gccgctacag cttcaccacc acggccgagc gggaaatcgt gcgtgacatt 720
aaggagaagc tgtgctacgt cgcctggac ttcgagcaag agatggccac ggctgcttcc 780
agctcctccc tggagaagag ctacgagctg cctgacggcc aggtcatcac cattggcaat 840
gagcgggtcc gctgccctga ggcactcttc cagccttctc tcctgggcat ggagtcctgt 900
ggcatccacg aaactaccct caactccatc atgaagtgtg acgtggacat ccgcaaagac 960
ctgtacgcca acacagtgtc gtctggcggc accaccatgt accctggcat tgccgacagg 1020
atgcagaagc agatcactgc cctggcacc agcacaatga agatcaagat cattgctcct 1080
cctgagcgca agtactccgt gtggatcggc ggctccatcc tggcctcgtc gtccaccctc 1140
cagcagatgt ggatcagcaa gcaggagtat gacgagtcgg gccctccat cgtccaccgc 1200
aaatgcttct aggcggacta tgacttagtt gcgttacacc ctttcttgac aaaaacctaac 1260
ttgcgcagaa aacaagatga gattggcatg gctttatttg tttttttgt tttgttttg 1320
ttttttttt ttttttgct tgactcagga tttaaaaact ggaacgggtg aggtgacagc 1380
agtcggttgg agcagagcat ccccaagtt cacaatgtgg ccgaggactt tgattgcaca 1440
ttgttgtttt tttaatagtc attccaaata tgagatgcgt tgttacagga agtcccttgc 1500
catcctaaaa gccaccccc ttctctctaa ggagaatggc ccagtctctc cccaagtcca 1560
cacaggggag gtgatagcat tgctttcgtg taaattatgt aatgcaaaa ttttttaac 1620
ttgccttaa tactttttta ttttgttta ttttgaatga tgagccttcg tgccccccct 1680
tccccctttt ttgtccccca acttgagatg tatgaaggct tttggtctcc ctgggagtg 1740
gtggaggcag ccagggccta cctgtacact gacttgagac cagttgaata aaagtgcaca 1800
ccttaaaaat gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1852

```

```

<210> SEQ ID NO 31
<211> LENGTH: 25
<212> TYPE: DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: Synthetic
        primer

```

```

<400> SEQUENCE: 31

```

```

cagctctgct acaattcacc gcgtc 25

```

```

<210> SEQ ID NO 32

```

---

-continued

---

<211> LENGTH: 26  
<212> TYPE: DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer  
  
<400> SEQUENCE: 32  
  
aatctctgta gagtccagcg cgtgtg 26  
  
<210> SEQ ID NO 33  
<211> LENGTH: 29  
<212> TYPE: DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer  
  
<400> SEQUENCE: 33  
  
tctctgaaga aattcctaag tgcgattcc 29  
  
<210> SEQ ID NO 34  
<211> LENGTH: 28  
<212> TYPE: DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer  
  
<400> SEQUENCE: 34  
  
ttatctgaat caaaatccat tccgcctc 28  
  
<210> SEQ ID NO 35  
<211> LENGTH: 28  
<212> TYPE: DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer  
  
<400> SEQUENCE: 35  
  
cattaaatgt ggtggaacaa gaggcctg 28  
  
<210> SEQ ID NO 36  
<211> LENGTH: 28  
<212> TYPE: DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer  
  
<400> SEQUENCE: 36  
  
agttcctctc ctttgtaatc cctccgac 28  
  
<210> SEQ ID NO 37  
<211> LENGTH: 24  
<212> TYPE: DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer  
  
<400> SEQUENCE: 37  
  
cggcaggctg atgaagcttg gtcg 24

US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

39

-continued

---

<210> SEQ ID NO 38  
<211> LENGTH: 25  
<212> TYPE: DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer  
  
<400> SEQUENCE: 38  
  
tagcttgctt ggcttcctct gcagg 25

<210> SEQ ID NO 39  
<211> LENGTH: 28  
<212> TYPE: DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer  
  
<400> SEQUENCE: 39  
  
tgtggtgaac tgactcctcg tgctgagc 28

<210> SEQ ID NO 40  
<211> LENGTH: 28  
<212> TYPE: DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer  
  
<400> SEQUENCE: 40  
  
cggaagtttt ctttcaactag cagcgagg 28

<210> SEQ ID NO 41  
<211> LENGTH: 27  
<212> TYPE: DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer  
  
<400> SEQUENCE: 41  
  
ccacgtagt ctgttataaa cccgctg 27

<210> SEQ ID NO 42  
<211> LENGTH: 28  
<212> TYPE: DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer  
  
<400> SEQUENCE: 42  
  
agtgatattt gaagcgttgg gtagcagg 28

<210> SEQ ID NO 43  
<211> LENGTH: 25  
<212> TYPE: DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer  
  
<400> SEQUENCE: 43



US 2010/0184869 A1

Jul. 22, 2010

40

-continued

---

```

ggactgggag gactctctgc ccgac                25

<210> SEQ ID NO 44
<211> LENGTH: 20
<212> TYPE: DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: Synthetic
        primer

<400> SEQUENCE: 44
gcccgcccca ctccggaacg                20

<210> SEQ ID NO 45
<211> LENGTH: 26
<212> TYPE: DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: Synthetic
        primer

<400> SEQUENCE: 45
gcattttgga gaaegtggca ctttgg                26

<210> SEQ ID NO 46
<211> LENGTH: 26
<212> TYPE: DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: Synthetic
        primer

<400> SEQUENCE: 46
gttagccat gctgaagatg gggttc                26

```

---

1. A method for determining modulating agents of sirtuins comprising the following steps:

- a. contacting tissue cell(s) comprising at least of gene of the sirtuin family and the  $\beta$ -actin gene, with a modulating gene;
  - b. determining the relative abundance of mRNA of the sirtuin-family gene;
  - c. determining the relative abundance of the mRNA of the  $\beta$ -actin gene; and
  - d. determining the mRNA SIRTImRNA  $\beta$ -actin ratio.
2. The method for determination, pursuant to claim 1, in which cells are selected from the group consisting of cells of fish, birds, mammals and combinations thereof.
3. The method for determination, pursuant to claim 2, in which the fish cells are cells from *Danio rerio*.
4. The method for determination, pursuant to claim 2, in which the fish cells are cells from *Gallus gallus*.
5. The method for determination, pursuant to claim 2, in which the mammal cells are from *Mus musculus* and/or *Homo Sapiens* cells.
6. The method for determination, pursuant to claim 2, in which the tissue is selected from the group consisting of brain, kidney, sexual organs (male and female), spleen, gills, liver, muscle, heart and combinations thereof.
7. The method for determination, pursuant to claim 1, in which the sirtuin possesses at least 50% of homology with at least one sequence selected from the group consisting of

XP\_001334440 (SEQ ID NO: 1), AAH67165 (SEQ ID NO: 2), XP\_684225 (SEQ ID NO: 3), XP\_690925 (SEQ ID NO: 4), AAH83418 (SEQ ID NO: 5), AAH75987 (SEQ ID NO: 6), NP\_001002071 (SEQ ID NO: 7), XP\_698800 (SEQ ID NO: 8), Q96EB6 (SEQ ID NO: 9), Q8IXJ6 (SEQ ID NO: 10), Q9NTG7 (SEQ ID NO: 11), Q9Y6E7 (SEQ ID NO: 12), Q9NXA8 (SEQ ID NO: 13), Q8N6T7 (SEQ ID NO: 14), Q9NRC8 (SEQ ID NO: 15), BAD38898 (SEQ ID NO: 16), BA[[S]]D38897 (SEQ ID NO: 17), XP\_420920 (SEQ ID NO: 18), XP\_415273 (SEQ ID NO: 19), XP\_418925 (SEQ ID NO: 20), NP\_001034409 (SEQ ID NO: 21), NP\_001026277 (SEQ ID NO: 22), NP\_062786 (SEQ ID NO: 23), NP\_071877 (SEQ ID NO: 24), CAJ18608 (SEQ ID NO: 25), Q8R216 (SEQ ID NO: 26), NP\_849179 (SEQ ID NO: 27), NP\_853617 (SEQ ID NO: 28), AAP83960 (SEQ ID NO: 29) and combinations thereof.

8. The method for determination, pursuant to claim 1, in which the  $\beta$ -actin possess at least 50% of homology with the NM\_001101 (SEQ ID NO: 30) sequence.

9. The method for determination, pursuant to claim 1, in which the relative abundance of mRNA of sirtuins and/or  $\beta$ -actin is determined by PCR.

10. A kit for determining modulating agents of sirtuins comprising:

- a. means for determining the relative abundance of mRNA of the sirtuin-family gene; and

b. means for determining the relative abundance of mRNA of the  $\beta$ -actin gene.

11. The kit for determining, in accordance with claim 10, in which the means for determining the relative abundance of mRNA of sirtuins and/or  $\beta$ -actin is comprised of primers capable of aligning themselves with a sequence of nucleotides possessing at least 50% of homology with at least one sequence selected from the group consisting of XP\_001334440 (SEQ ID NO: 1), AAH67165 (SEQ ID NO: 2), XP\_684225 (SEQ ID NO: 3), XP\_690925 (SEQ ID NO: 4), AAH83418 (SEQ ID NO: 5), AAH75987 (SEQ ID NO: 6), NP\_001002071 (SEQ ID NO: 7), XP\_698800 (SEQ ID NO: 8), Q96EB6 (SEQ ID NO: 9), Q8IXJ6 (SEQ ID NO: 10), Q9NTG7 (SEQ ID NO: 11), Q9Y6E7 (SEQ ID NO: 12), Q9NXA8 (SEQ ID NO: 13), Q8N6T7 (SEQ ID NO: 14), Q9NRC8 (SEQ ID NO: 15), BAD38898 (SEQ ID NO: 16), BA[[S]]D38897 (SEQ ID NO: 17), XP\_420920 (SEQ ID NO: 18), XP\_415273 (SEQ ID NO: 19) XP\_418925 (SEQ ID NO: 20), NP\_001034409 (SEQ ID NO: 21), NP\_001026277 (SEQ ID NO: 22), NP\_062786 (SEQ ID NO: 23), NP\_071877 (SEQ ID NO: 24), CAJ18608 (SEQ ID NO: 25), Q8R216 (SEQ ID NO: 26), NP\_849179 (SEQ ID NO: 27), NP\_853617 (SEQ ID NO: 28), AAP83960 (SEQ ID NO: 29), NM-001101 (SEQ ID NO: 30) and combinations thereof.

12. A process for modulating sirtuin expression comprising contacting a modulating agent of sirtuin expression with a cell comprised of at least one sirtuin-family gene.

13. The modulation process, pursuant to claim 12, in which the cells are selected from the group consisting of cells of fish, birds, mammals and combinations thereof.

14. The modulation process, pursuant to claim 13, in which the fish cells are *Danio rerio* cells.

15. The modulation process, pursuant to claim 13, in which the bird cells are *Gallus gallus* cells.

16. The modulation process, pursuant to claim 13, in which the mammal cells are *Mus musculus* and/or *Homo Sapiens* cells.

17. The modulation process, pursuant to claim 13, in which the tissue is selected from the group consisting of brain, kidney, sexual organs (male and female), spleen, gills, liver, muscle, heart and combinations thereof.

18. The modulation process, pursuant to claim 12, in which the sirtuin possesses at least 50% of homology with at least one sequence selected from the group consisting of XP\_001334440 (SEQ ID NO: 1), AAH67165 (SEQ ID NO: 2), XP\_684225 (SEQ ID NO: 3), XP\_690925 (SEQ ID NO: 4), AAH83418 (SEQ ID NO: 5), AAH75987 (SEQ ID NO: 6), NP\_001002071 (SEQ ID NO: 7), XP\_698800 (SEQ ID NO: 8), Q96EB6 (SEQ ID NO: 9), Q8IXJ6 (SEQ ID NO: 10), Q9NTG7 (SEQ ID NO: 11), Q9Y6E7 (SEQ ID NO: 12), Q9NXA8 (SEQ ID NO: 13), Q8N6T7 (SEQ ID NO: 14), Q9NRC8 (SEQ ID NO: 15), BAD38898 (SEQ ID NO: 16), BA[[S]]D38897 (SEQ ID NO: 17), XP\_420920 (SEQ ID NO: 18), XP\_415273 (SEQ ID NO: 19) XP\_418925 (SEQ ID NO: 20), NP\_001034409 (SEQ ID NO: 21), NP\_001026277 (SEQ ID NO: 22), NP\_062786 (SEQ ID NO: 23), NP\_071877 (SEQ ID NO: 24), CAJ18608 (SEQ ID NO: 25), Q8R216 (SEQ ID NO: 26), NP\_849179 (SEQ ID NO: 27), NP\_853617 (SEQ ID NO: 28), AAP83960 (SEQ ID NO: 29) and combinations thereof.

19. A pharmaceutical composition comprising:

- a. a modulating agent of sirtuin expression; and
- b. an acceptable pharmaceutical vehicle,

in which the mRNA SIRTImRNA  $\beta$ -actin ratio of the cell without the presence of the modulating agent is different from the mRNA SIRTImRNA  $\beta$ -actin ratio of the cell without the presence of the modulating agent.

20. The pharmaceutical composition, pursuant to claim 19, in which the modulating agent is resveratrol.

21. A modulating agent of sirtuin expression utilized in the manufacturing of medication which is useful for the treatment of neurodegenerative diseases.

\* \* \* \* \*

## ANEXO II

Comprovante de submissão de artigo científico a revista *Molecular Biology Reports* e reposta aos revisores.

From: em.mole.0.1f6e4d.c2ec6e87@editorialmanager.com on behalf of  
Molecular Biology Reports - Editorial Office  
Sent: Wed 12/1/2010 22:23  
To: Andre Arigony Souto  
Subject: Decision on your manuscript #MOLE-2519

Dear Dr Andre Arigony Souto:

We have received the reports from experts in the field on your manuscript, "Modulatory effect of resveratrol on SIRT1, SIRT3, SIRT4, PGC1<alpha> and NAMPT gene expression profiles in wild-type adult zebrafish liver", which you submitted to Molecular Biology Reports.

While the reviewers are critical of your work, we are willing to reconsider your manuscript for publication pending the incorporation of revisions that address the comments of the referees. When preparing your revised manuscript, please carefully consider the reviewer comments which are attached below. You should make changes in the manuscript that mitigate any concerns, and also submit a list that indicates how you responded to each of the comments and how you modified the paper. Your list of responses and modifications should be uploaded as a file in addition to your revised manuscript. We understand that is not always realistic to address all points in the context of a report, but we encourage you to attempt a good faith effort at addressing the substance of their points.

In order to submit your revised manuscript electronically, please access the following web site:

<http://mole.edmgr.com/>

Please click "Author Login" to submit your revision.

We look forward to receiving your revised manuscript.

Sincerely yours,

André van Wijnen  
Molecular Biology Reports

February 2011

*Molecular Biology Reports*

## Answers and Comments to Reviewers

Manuscript

### MANUSCRIPT INFORMATION

**ID:** MOLE-2519

**Title:** Modulatory effect of resveratrol on *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT4*, *PGC1 $\alpha$* , and *NAMPT* gene expression profiles in wild-type adult zebrafish liver

**Authors:** Helena Schirmer, Talita Carneiro Brandão Pereira, Eduardo Pacheco Rico, Denis Broock Rosemberg, Carla Denise Bonan, Maurício Reis Bogo, and André Arigony Souto

### ANSWERS AND COMMENTS TO REVIEWERS

The authors would like to thank the reviewers for their interest in this paper, which was reflected in the constructive comments and suggestions provided by the reviewers. In an attempt to be as specific as possible in response to their observations, we quoted each comment (*italicized*) and followed it up with the answer (regular font). In addition, we also highlighted the revisions in the manuscript (**bold**).

Review 1#

*1. The observation on gene expression was based on direct treatment of zebrafish with resveratrol. It is not clear if this is a effect of resveratrol or its metabolites.*

Thank you for this comment. We agree with the reviewer, and although it is unclear whether the effect observed was due to resveratrol metabolites, the treatment involving direct addition of resveratrol to the water promoted changes in *SIRT3*, *SIRT4*, and *NAMPT* gene expression. To ensure that resveratrol reached the tissues after exposure, we determined the concentration of the compound in the liver after both exposure times and at both concentrations. We detected resveratrol at both the time points tested (30 and 60 min) and at both the concentrations, i.e., 5 and 50 mg/L, and did not detect metabolites in the tissues. Resveratrol was found to be absent after 1 h of fish exposure, suggesting that the compound was absorbed by the animals (data not shown). Concerns about the effect of resveratrol or its metabolites were raised in other experimental models; however, the compound exerting the observed response is still unidentified.

**Materials and methods section (lines 9–11): 2.2 To ensure that the compound reached the liver during the exposure time and the concentration of the compound added directly to the water, we determined the concentration of resveratrol by HPLC.**

*2. The concentrations of resveratrol used in the study are high. It's not clear if these effects are specific. The authors should use a control compound to understand if general stress or toxicity could cause changes in gene expression in zebrafish.*

Before determining the concentration of the compound, we did a preliminary study with 3 different doses of resveratrol: 0.5 mg/L (very low concentration), 5 mg/L (low concentration), and 20 mg/L (high concentration). The animals were exposed to each concentration for 3 different time intervals: 1 h, 24 h, and 7 consecutive days. No significant changes were observed in the *SIRT1* mRNA levels at any of the concentrations and time points tested (data not shown). We, therefore, decided to perform the experiments with low (5 mg/L) and high (50 mg/L) concentrations to verify the effect of resveratrol on gene expression. During the treatment, we did not observe

any changes in the swimming activity of the animals, and none of the fishes died, suggesting that the treatments probably had no toxic effect. We did not test another compound to investigate whether the expected toxic effect has a direct correlation with the resveratrol, since different drugs can have distinct effects at the same concentration.

*3. To prove the specific effects of resveratrol on these genes, the authors may want to treat cells with resveratrol followed by gene expression analysis this can take away the complexities of in vivo metabolism that may occur in zebrafish.*

We agree with the reviewer. Cultured cells can be used to determine the direct effect of the compound on gene expression. However, some studies have tested the compound *in vitro* and *in vivo* [1-5], and showed that the effects could differ between the 2 systems [6]. The zebrafish is an important *in vivo* model used for optimization in the chemical screenings conducted to identify compounds that can modulate specific biological processes, by determining the bioactivity, toxicity, and off-target side effects [7]. Consequently, since resveratrol has been used in studies to understand the mechanisms and actions in different protein targets, research studies with experimental *in vivo* models are necessary to complement and emphasize the action of the compound in tissues. Metabolism of the compound and the *in vivo* dose was recently discussed at the Resveratrol Conference ([www.resveratrol2010.com](http://www.resveratrol2010.com)), and it appears to be ill defined at present. Therefore, studies on the *in vivo* effect of resveratrol treatment on different sirtuins are very few, and no evidence is available about the modulation of *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT4*, and *NAMPT* in the liver of the wild-type zebrafish.

Reviewer #2:

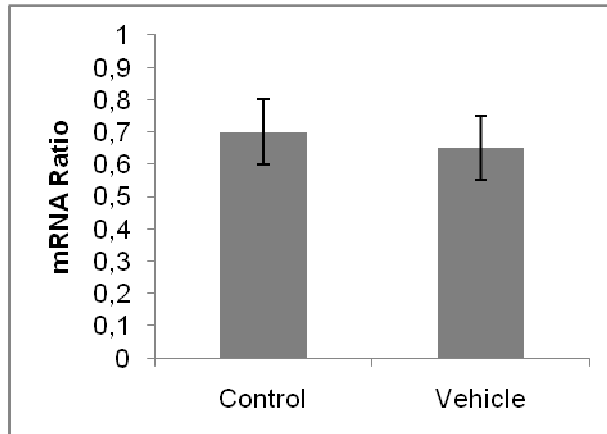
*1. The manuscript is excessively long and there is an excessive number of references. The Discussion needs to be edited to half the length. The english in the manuscript is good overall, but there are a few typos scattered throughout the manuscript.*

Thank you for your comment. We corrected the typographical errors in the manuscript and edited the Discussion section.

## 2. Methods Section

2.2: *The control used in this study is inappropriate. A water-only control was used when a solvent control (ethanol at the same % as in the exposures) is essential for proper experimental design.*

We agree that the vehicle could affect gene expression after resveratrol exposure. A preliminary experiment was performed to verify this hypothesis. Animals were divided into low-resveratrol (5 mg/L), high-resveratrol (50 mg/L), vehicle, and control (distilled water) groups, and all the groups were treated for 30 and 60 min. No significant differences were observed between the vehicle and control groups at both exposure times; this is shown in the graph below.



**2.2 Resveratrol exposure section (lines 4-6): A preliminary study was performed to verify whether the vehicle could change gene expression. We did not detect significant changes when the results of the vehicle and control groups were compared (data not shown).**

3. *Methods Section 2.2 and 2.4: All end-points were measured after 30 or 60 minutes exposure to resveratrol, but the authors claim they have time course justification.*



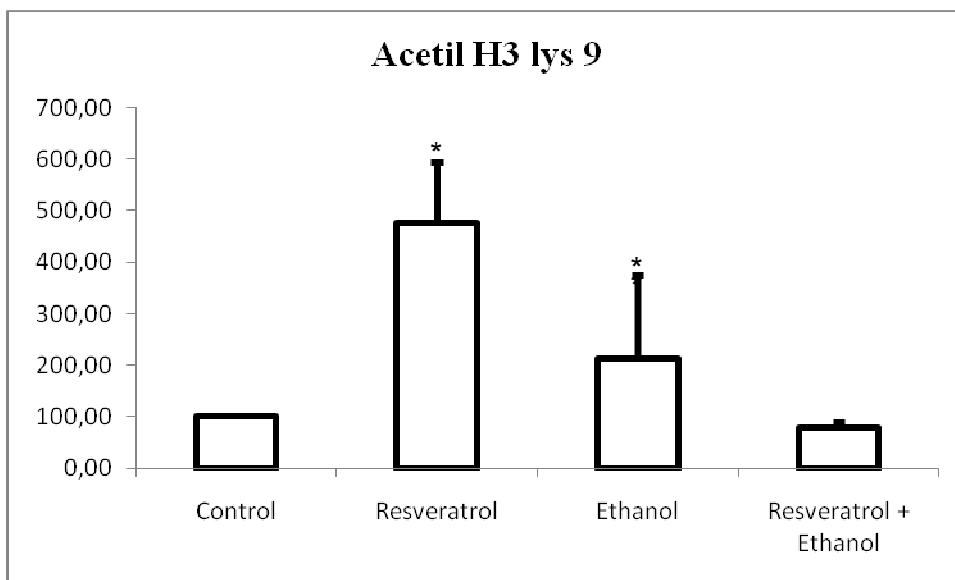
*However, it is not clear what end-points were measured for this time course - presumably mRNA expression only.*

Sirtuin 1 levels were determined after 30 and 60 min at both concentrations of resveratrol. As we did not observe any time- or dose-dependent modulation for SIRT1, we exposed the model to 5 mg/L of resveratrol for 30 min to determine the mRNA levels of SIRT3 and SIRT4. We expected to avoid a possible toxic effect by using a lower concentration. NAMPT can differ from the sirtuins with respect to behavior; therefore, we detected mRNA levels at 30 min after exposure to both concentrations of resveratrol. Three different time points were decided upon after our preliminary study: 1 h, 24 h, and 7 days. Although in *in vitro* studies, *SIRT1* mRNA levels were time- and dosage-dependent, it was not the case in the present *in vivo* model. In the present model, we observed that acute exposure is preferable, because we can detect resveratrol metabolites and the loss of the effects of the compound after prolonged exposure. Acute exposure was established by testing other compounds and detecting changes in gene expression and enzyme activity [6, 8, 9].

*Although this very brief exposure may have been sufficient to cause changes in mRNA expression, this reviewer questions whether this had any relation to functional enzyme changes. Specifically, how do the authors justify using the same time of exposure for measuring NAD<sup>+</sup>/NADH effects. Effects on this latter end-point involve functional changes that would result from changes in protein expression. This reviewer seriously questions whether 60 minutes of exposure is enough to transcribe, translate and then cause functional changes.*

As mentioned above, this exposure time was established by our research group with other compounds, and an alteration in the activity of some enzymes such as acetylcholinesterase was observed during this period [6]. We agree with the reviewer's comment that 60 min can be a very short duration to detect modulation at all levels (transcription, translation, and post-translation level modifications), but other studies have shown that although the protein level in the mouse retina increased after 1 h of *in vivo* treatment, it decreased after a few hours [10]. In another experiment, we detected an increase in the level of acetylated H3 proteins after resveratrol and ethanol exposure

for 60 min compared to the level in the control group (figure below). We, therefore, can suggest that modulation of NAMPT could change the NAD/NADH ratio by alteration in protein or enzyme activity.



*4. Methods Section 2.3: Current minimum guidelines for publication of PCR data (MIQE: Bustin et al Clinical Chemistry 2009, 55(4): 611-622) stipulates that semi-quantitative methods should no longer be published. Furthermore, extensive validation of primer performance and linearity is now routine. All of the data presented in this manuscript is obtained using semi-quantitative methods without any apparent validation, making the validity of the findings questionable. Furthermore, this fact is not acknowledged in the manuscript.*

Thank you for your comment. Although sqRT-PCR is less sensitive than quantitative real-time PCR, it is a useful technique to assess the transcription profile of these genes after resveratrol exposure. The endpoint PCR assay allows the detection of mRNA of specific PCR targets if the respective genes are expressed. Furthermore, it is important to ensure the linearity of the band intensities analyzed. Thus, we have pre-optimized the PCR experiments by performing a curve with distinct concentrations of MgCl<sub>2</sub>, cDNA template, and PCR cycles (25–40 cycles). The optimal PCR conditions chosen were within the linear phase of increase in the band intensities detected by optical

densitometry (using Image J for Windows program; data not shown). Moreover, the 4 independent experiments performed were electrophoresed in a single gel, which presented distinct band intensities within the tissue. Since PCR cycle numbers were presented in Table 1, we chose to highlight previous optimization in the text. Please see the new version attached below:

**Semi-quantitative PCR section: PCR parameters concerning MgCl<sub>2</sub>, cDNA template concentration, and PCR cycles (25–40 cycles) were optimized (data not shown). Reactions were performed under optimal conditions that allowed product detection within the linear phase of band densitometry analyzed for each primer pair (Table 1).**

*6. Methods Section 2.3 and Fig 1: One of the findings that the authors repeatedly stress in the Discussion is that sirt1 expression was not altered by resveratrol, contrary to many previous studies. However, because the expression was evaluated using a semi-quantitative method which is prone to false negatives, the authors cannot say with confidence that sirt1 expression was not changed.*

Thank you for your comment. As mentioned above, although the sqRT-PCR is less sensitive than quantitative real-time PCR, it is a useful technique to assess the transcription profile of those genes after resveratrol exposure. With the methodology employed in our study (sqRT-PCR), and by using the linear band detections by optical densitometry, *SIRT1* mRNA was apparently not affected. Similarly, another study treating healthy mice with resveratrol reported no change in *SIRT1* mRNA when compared to the levels in the control group, despite using quantitative RT-PCR and having detected changes in the ethanol- and resveratrol-treated groups [11]. Most studies that detected SIRT1 changes used a stressed or impaired model. We attribute the lack of change observed in our study to the fact that we used healthy wild-type adult zebrafish.

*7. Discussion: The authors repeatedly refer to their figures throughout the manuscript. This indicates that part of the problem of excessive length in this Section arises from repetitively restating the Results.*

Thank you for your comment. We shortened the Discussion section following the reviewer's suggestion.

Reviewer #3

*The authors exposed zebrafish to two concentrations of resveratrol dissolved in water and determined expression levels of some liver enzymes. In part the study was performed due to reports of SIRT1 activation by resveratrol, even though this has clearly been established as an artifact. The changes that are shown in the paper are relatively small, and similar work has already been performed in mammals. The physiological relevance of the small effects is not known. The tissue concentration of resveratrol is not reported. Perhaps long term exposure and more thorough evaluation of consequences would be of greater interest. The current study reads more like a review of the literature and teaches us very little that is new.*

We thank you for your comment. It is important to emphasize that our study was performed using an *in vivo* experimental model, and several research studies showing the mechanism of resveratrol in the regulation of sirtuins have employed *in vitro* models. Another important point is that we used a healthy experimental model and did not use a stressed or otherwise impaired model as most of the previous research studies did. We used zebrafish (*Danio rerio*) as a model, a vertebrate emerging as a promising organism for experimental studies in different biochemical and genetic areas. According to the best of our knowledge, this is the first study demonstrating the modulation of *SIRT3*, *SIRT4*, and *NAMPT* in the liver of wild-type adult zebrafish. Therefore, this vertebrate can be an interesting tool for the development of sirtuin targets. As we directly mixed resveratrol with water to ensure that the effect observed was modulated by the compound, we determined the concentrations at 30 and 60 min of exposure at both concentrations of resveratrol, as shown in the following table:

Resveratrol concentration	Times of exposure	
	30'	60'
5 mg/L	0.15 ppm	0.09 ppm
50 mg/L	0.20 ppm	0.22 ppm

An HPLC system composed of a Perkin-Elmer 785A UV - VIS detector with provision for stopped-flow scanning (190–360 nm), a PE Series 200 pump, a PE 900 Series Interface, and a vacuum degasser PE Series 200 was used. A 250-mm long octadecyl column was used with a 5- $\mu$ m particle diameter and 4.6-mm i.d. (Brownlee, Norwalk, U.S.A.). Tissues were individually homogenized with ethanol (1 mL) for 30 min and spun at 15,000 g for 15 min. The supernatant was evaporated and separated by nitrogen gas drag, and the residue was suspended in 0.2 mL before CLAE chromatographic analysis [12]. Since a preliminary study had not observed any time- or dose-dependent changes in *SIRT1* gene expression, we chose to work with low and high dose of resveratrol and verify the modulation of gene expression. We did not detect any differences in gene expression after 7 days of treatment with resveratrol, compared to acute exposure. Our group had previously established treatments with other compounds with an exposure time of 60 min; we, therefore, chose to determine gene expression after acute exposure. It is important to point out that with prolonged exposure time, it becomes difficult to determine whether the modulation effect is due to resveratrol or its metabolites.

Reviewer #4:

*Zebrafish were only exposed for 30 to 60m with resveratrol at 21 or 210 $\mu$ M before being washed out. This is a very short time period. There is no evidence to support that the resveratrol did much that is of physiological significance. Given the many known benefits of resveratrol (and that is where the primary emphasis in resveratrol research lies today, ie the favorable therapeutic window concentration range) it is most important to first determine a concentration for which some kind of physiological effect*

*is observed. Only then, does it become interesting to consider how resveratrol may be exerting these activities through altering sirtuins/pgc1alpha etc... There is also this most recent surge of publications describing hormetic effects of resveratrol (one effect at low concentrations with the opposite at high concentrations). It is not necessary to do a complete dose response curve for this study the researchers of this zebrafish publication are doing, however, some kind of physiological response is needed.*

As mentioned above, the doses and time points of treatment with resveratrol were defined after a preliminary study, wherein we did not detect any time- or dose-dependent changes in *SIRT1* mRNA. This led us to use 2 doses, i.e., a low concentration and a high concentration. Since we did not observe a time-dependent gene expression in our experimental model, and the acute exposure time was established with other compounds by our research group, we decided to verify gene expression after acute exposure. We observed a physiological response in the detection of the cofactors NAD and NADH, as described in the Results section (3.3). In addition, a question arises whether we can detect metabolites or observe toxic effects after prolonged exposure. Besides determining gene expression, we analyzed whether resveratrol could modulate total histone deacetylase (HDAC) after 60 min of exposure, and we saw that the compound increased the activity of cytoplasmic fraction but not of the nuclear fraction (data not shown) in 5 mg/L of the compound. However, the methodology used was contested by other authors [13-15], so we did not show those results.

*The changes in expression levels of NAMPT, PGCI alpha, SIRT3, and SIRT4 are all so small as to be statistically insignificant. One wonders whether these measures were performed within the linear range of detection based on the presented agarose gel data.*

Thank you for your comment. The PCR assay allows the detection of the mRNA for specific PCR targets if the respective genes are expressed. Furthermore, it is important to ensure the linearity of the band intensities analyzed. Thus, we have pre-optimized the PCR experiments by performing a curve with distinct concentrations of MgCl<sub>2</sub>, cDNA template, and PCR cycles (25–40 cycles). The optimal PCR conditions chosen were within the phase of linear increase in the band intensities detected by optical densitometry (using Image J for Windows program; data not shown). Moreover, the 4

independent experiments performed were electrophoresed in a single gel, which presented distinct band intensities within the tissue. Since PCR cycle numbers were presented in Table 1, we chose to highlight previous optimization in the text.

*The Biochain NAD<sup>+</sup>/NADH kit claims not to measure NADP or NADPH. This is perhaps important to know as well, although I am not 100%. Also I do not know what the extraction buffer is as it may be proprietary. In any case the kit claims to measure NAD<sup>+</sup>, NADH, and NAD/NADH (of course), but certainly not total NAD (ie NADP and NADPH is not measured). So how this impacts thoughts on changes in NAMPT activity, I am not 100% sure. Changes in NAMPT levels are correlated with the appearance of NAD and NADH, but without consideration of the concentrations of NADP and NADPH. These can change in concentration as well. Nonetheless, the effects of resveratrol on NAD<sup>+</sup> and NADH concentrations do appear to be resveratrol-concentration dependent and thus pretty interesting. The one piece of data as the research is currently presented that is of interest would have to be the measures of NAD and NADH.*

It is important to emphasize that deacetylase sirtuin activity is mediated by NAD<sup>+</sup> and the NAD/NADH ratio. The reaction generates nicotinamide, which is used as a substrate for NAD<sup>+</sup> biosynthesis mediated by NAMPT in mammals. We, therefore, sought to determine the concentrations of both cofactors and their ratio. The kit used in our experiment analyzed the doses of NAD<sup>+</sup> and NADH and not of NADP and NADPH [16].

*The problem with this paper is that the initial resveratrol exposure conditions are so minute and the transcript changes are either insignificant or improperly measured.*

We thank you for your comment. We know that the endpoint PCR assay is a less sensitive technique for RNA quantification than quantitative real-time PCR. However, the semi-quantitative technique allows detection of mRNA for specific targets if the respective genes are expressed, and considering the difference in the sensitivity of the 2

methods, it is important to ensure the linearity of the band intensities analyzed. Thus, we have pre-optimized the PCR experiments by performing a curve with distinct concentrations of MgCl<sub>2</sub>, cDNA template, and PCR cycles (25–40 cycles), and the optimal PCR conditions chosen were within the phase of linear increase of band intensities detected by optical densitometry. Moreover, the experiments performed were electrophoresed in a single gel, which presented distinct band intensities in the tissue. These results demonstrate the existence of a different expression profile of related genes in zebrafish. Another study using quantitative real-time PCR also failed to detect changes in *SIRT1* mRNA after resveratrol exposure [11]; this was in agreement with our findings.

*The subject is extremely interesting, but a more thorough examination of resveratrol concentration and exposure conditions is warranted before a conclusion can be made. One good approach would be to try administration of resveratrol in the manner performed previously after thorough consideration of treatment conditions in the delay of aging of the fish N. furzeri - resveratrol at a dose of 120 micrograms per gram of food. Here is an excerpt from the 2006 Current Biology publication: Resveratrol Treatment: Sample preparation for 120 mg/food: 1.2 mg/ml resveratrol stock was prepared in 5% ethanol and stored at 4°C in the dark. Frozen Chironomus larvae were thawed, left to drip dry, and aliquoted into portions of one feeding for 10 adult ?sh (1 g). 100 ml of the 1.2 mg/ml stock was added to each Chironomus aliquot, which was left at 4°C for 1-2 hr to soak. 5% gelatine was added to the Chi- ronomus/resveratrol aliquot, mixed, frozen, and stored at 220°C un- til use. For feeding, the frozen gelatine/Chironomus cube was thawed in water and fed to the ?sh. All uneaten food was removed. Fish received 2 feeding per day. Control-fed ?shes received the same kind of food lacking resveratrol in the stock solution. The food consumption was approximately of 50 mg (food)/g (?sh weight)/day.*

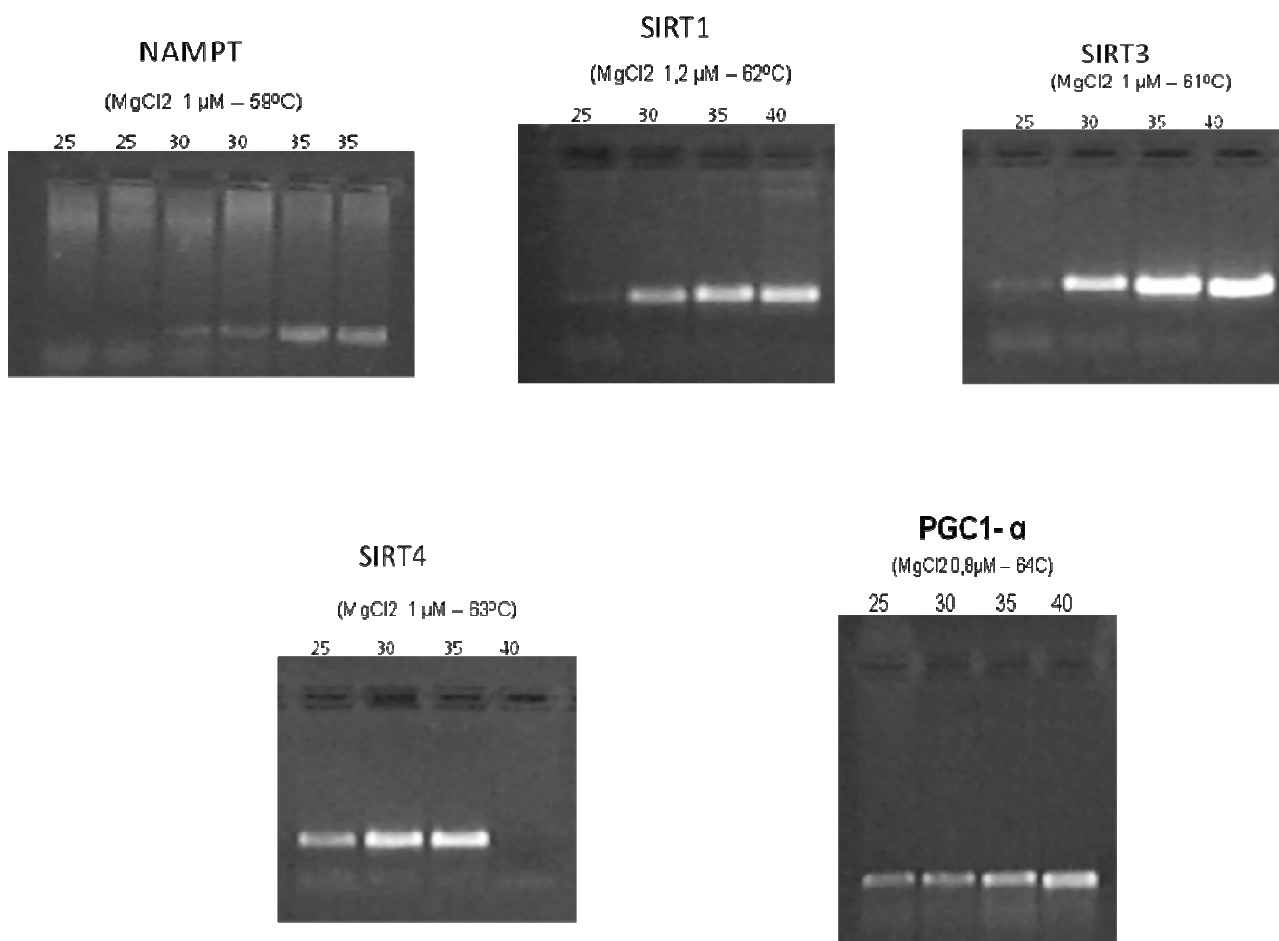
We thank you for your comment. Although feed treatment with resveratrol could be an interesting strategy to assess its effects through ingestion, it could reflect differently in animals, because they may not consume the same amount of food; consequently, the concentration of resveratrol in the animals could be different. In addition, zebrafish may especially be suitable for modeling the effects of substances, because of the simplicity of compound delivery. The substance mixed into their environment is an effective way



for the animals to absorb the compound, allowing it to move through the bloodstream and eventually reach the systemic tissues. This was observed with resveratrol after the compound was detected in the liver and muscles post exposure (data not shown).

*The authors of this study have begun to ask wonderful research questions with a good initial approach. However, the conditions of the experiment have failed to result in physiologically significant observations if any observations at all. The semi-quantitative RT-PCR is not convincing. A standard curve showing that we are able to measure changes in transcripts dependent on the presence of increasing template should be shown at least for the reviewers.*

The standard cycle curves after adjustment for the  $MgCl_2$  concentrations and melting temperatures are illustrated below.



## References

1. Howitz, K.T., et al., *Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan*. *Nature*, 2003. **425**(6954): p. 191-6.
2. Planavila, A., et al., *Sirt1 acts in association with PPAR to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation and inflammation*. *Cardiovasc Res*, 10.1093/cvr/cvq376, 2010.
3. Jang, M., et al., *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes*. *Science*, 1997. **275**(5297): p. 218-20.
4. Osmond, G.W., et al., *Enhancing Melanoma Treatment with Resveratrol*. *J Surg Res*, 10.1016/j.jss.2010.07.033 , 2010.
5. Chen, C.J., et al., *Resveratrol protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis through the SIRT1-FoxO1 pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **378**(3): p. 389-93.
6. Rico, E.P., et al., *Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain*. *Toxicol Lett*, 2007. **174**(1-3): p. 25-30.
7. Bowman, T.V. and L.I. Zon, *Swimming into the future of drug discovery: in vivo chemical screens in zebrafish*. *ACS Chem Biol*, 2010. **5**(2): p. 159-61.
8. Rico, E.P., et al., *Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain*. *Neurotoxicol Teratol*, 2006. **28**(4): p. 489-96.
9. Rosemberg, D.B., et al., *Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain*. *Neuroscience*, 2010. **171**(3): p. 683-92.
10. Nakazawa, T., et al., *ERK1 plays a critical protective role against N-methyl-D-aspartate-induced retinal injury*. *J Neurosci Res*, 2008. **86**(1): p. 136-44.
11. Franco, J.G., et al., *Resveratrol (RSV) reduces lipid peroxidation and increases sirtuin1 (SIRT1) expression in adult animals programmed by neonatal protein restriction*. *J Endocrinol*, 2010. **207**(3): p. 319-28.
12. Souto, A.A., et al., *Determination of trans - resveratrol concentrations in Brazilian Red Wines by HPLC*. *J Food Compos and Anal*, 2001. **14**: p. 441-5.
13. Kaeberlein, M., et al., *Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(17): p. 17038-45.
14. Pacholec, M., et al., *SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(11): p. 8340-51.
15. Beher, D., et al., *Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity*. *Chem Biol Drug Des*, 2009. **74**(6): p. 619-24.
16. Vilcheze, C., et al., *Altered NADH/NAD<sup>+</sup> ratio mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in mycobacteria*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(2): p. 708-20.

**ANEXO III**

Comprovante de submissão de artigo científico a revista *Zebrafish*

---

## Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Zebrafish*.

Manuscript ID:	ZEB-2011-0695
Title:	Modulation of SIRT1, SIRT3, SIRT4, PGC1a and PPAR $\gamma$ in Wild-type Adult Zebrafish Subject to Calorie Restriction
Authors:	Schirmer, Helena Pereira, Talita Rico, Eduardo Rosemberg, Denis Bonan, Carla Bogo, Mauricio Souto, Andre
Date Submitted:	02-Mar-2011

 Print  Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.5.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2010. All Rights Reserved.  
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)