



stricto
SENSU

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE DO PADRÃO DE
EXPRESSIONE TECIDUAL DOS GENES RELACIONADOS
ÀS SIRTUÍNAS EM *ZEBRAFISH***

TALITA CARNEIRO BRANDÃO PEREIRA

PORTO ALEGRE, 2010

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO TECIDUAL DOS GENES
RELACIONADOS ÀS SIRTUÍNAS EM *ZEBRAFISH***

TALITA CARNEIRO BRANDÃO PEREIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. MAURÍCIO REIS BOGO

PORTO ALEGRE, RS
2010

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

TALITA CARNEIRO BRANDÃO PEREIRA
ORIENTADOR: PROF. DR. MAURÍCIO REIS BOGO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO TECIDUAL DOS GENES
RELACIONADOS ÀS SIRTUÍNAS EM *ZEBRAFISH***

Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do grau de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do
Sul.

PORTO ALEGRE, RS
2010

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e à PUCRS pela bolsa de estudos que possibilitou a elaboração e realização do meu mestrado.

Ao Escritório de Transferência de Tecnologia (ETT) da PUCRS que coordenou com agilidade todo o processo que resultou no depósito de patente (no Brasil, Estados Unidos e Europa) presente nesta dissertação.

Aos professores André Souto, Carla Bonan e Renato Dias pela participação na Banca de Projeto de Pesquisa realizada no início do mestrado e pelas revisões e observações que enriqueceram o manuscrito presente nesta dissertação.

Aos professores componentes da Banca de Avaliação desta dissertação, Guido Lenz, Rafael Roesler e Monica Vianna. À Prof. Monica agradeço ainda a execução da relatoria deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUCRS que compartilharam experiências profissionais e pessoais, brindando momentos de aprendizado e também de descontração. À Mirian, agradeço também a ajuda técnica durante a formatação.

Em especial, agradeço a disponibilidade, experiência e dedicação dos amigos Eduardo Rico, Denis Rosemberg e Helena Schirmer, que me ensinaram e auxiliaram no dia-a-dia de bancada, revisando e discutindo resumos, artigos e esta dissertação.

Ao meu orientador, Maurício Reis Bogo, pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela atenção, pelo incentivo e principalmente pela confiança em mim depositada.

Ao Fernando pelo incentivo, compreensão e paciência que se transformaram sempre em motivação. Muito obrigada pelo apoio incondicional.

À minha irmã, Melina, que apesar da distância fez parte desta dissertação auxiliando no tratamento das imagens presentes nesta dissertação, mais de uma vez, seguindo os meus pedidos e as normas da revista. Obrigada Mel!

Aos meus pais, Cláudia e José Pereira, que sempre apoiaram minhas decisões e acreditaram no meu melhor, agradeço o carinho, o amor e preocupação, especialmente por suportar a distância (física) que separa nossa família - devido à opção de estudo das filhas do casal.

RESUMO

Descobertas inicialmente em *Saccharomyces cerevisiae* como reguladoras de silenciamento de informação (SIRs), as sirtuínas (SIRTs) estão amplamente distribuídas em todos os domínios de vida. Esta grande e diversa família de histonas desacetilases da classe III (HDACs) são dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) para exercer suas funções de desacetilação e/ou transferência de mono-ADP-ribosil. São consideradas uma família de enzimas bastante conservada não apenas entre eucariotos, nos quais são encontradas múltiplas sirtuínas, mas também em procariotos. O *zebrafish* (*Danio rerio*) é um teleósteo de água doce amplamente utilizado como animal modelo em diferentes áreas de pesquisa. Características como manutenção em pequenos espaços e com baixos custos, fácil administração de drogas solúveis em água e rápida aclimação a novos ambientes, tornaram o *zebrafish* modelo de estudo para várias doenças humanas; entre elas as relacionadas ao envelhecimento. Apesar do uso crescente do *zebrafish* como sistema modelo, e das sirtuínas serem importantes alvos de pesquisa nos últimos anos principalmente devido seu potencial terapêutico, pouco é conhecido sobre sirtuínas e *zebrafish*. Portanto, identificar genes relacionados às sirtuínas e caracterizar o padrão de expressão gênica de cada membro em diferentes tecidos do *zebrafish* foi o objetivo deste trabalho. Para tanto, amostras de diferentes tecidos foram retiradas de animais adultos de ambos sexos e diretamente congeladas em nitrogênio líquido. Após a extração de RNA total de cada amostra, reações de RT-PCR, já padronizadas, foram realizadas para análise do padrão de expressão dos genes relacionados às sirtuínas, identificados previamente através de buscas no NCBI-Blast. Nossa investigação identificou oito genes relacionados às sirtuínas, incluindo dois parálogos. Cada um dos oito genes identificados apresentou um padrão de expressão único, ilustrando ampla distribuição tecidual dos membros da família das sirtuínas. Com o objetivo de testar a modulação na expressão destes genes, realizamos um experimento de exposição ao resveratrol que alterou os níveis de expressão gênica de algumas das sirtuínas. Neste sentido, propomos que novas drogas potencialmente moduladoras de sirtuínas sejam testadas usando o sistema aqui descrito com o objetivo de, no futuro, desenvolver terapias mais seletivas para as doenças associadas ao envelhecimento.

Palavras-chave: sirtuínas, *zebrafish*, *Danio rerio*, expressão gênica.

ABSTRACT

First identified in *Saccharomyces cerevisiae* as silent information regulators (SIRs) sirtuins (SIRT) are widely distributed in all phyla of life. These large and diverse class III histone deacetylases (HDACs) comprise a family of NAD⁺-dependent protein deacetylases that catalyze mono-ADP-ribosyl transfer and/or deacetylation, and are considered a highly conserved family of proteins. Zebrafish (*Danio rerio*) is a freshwater fish widely used as model organism in many research areas. Characteristics such as low costs of breeding and maintenance, easy water-soluble drugs administration and rapid adaptation to new environments, among others, made the zebrafish a suitable model organism for studying many human diseases; including aging-associated disorders. Despite its promising use as a vertebrate model of aging, little is known about the presence of sirtuin-related genes in zebrafish, which has been considered an important research target for its therapeutics potential. Therefore, the purpose of this study was to identify all sirtuin-related genes and to map their expression patterns in nine different tissues of adult zebrafish. Total RNA was extracted from tissues samples of male and female zebrafish. RT-PCR reactions were performed under optimized conditions for expression pattern analysis of the sirtuins-related genes, previously identified using NCBI-Blast searches. Results showed the existence of eight sirtuins-related genes, including two paralogs. Each gene presented a unique expression pattern, illustrating their wide tissue distribution. In order to test a modulatory effect on gene expression of the sirtuin members, we exposed fish to resveratrol and the results demonstrated an alteration of the expression levels of some sirtuins. In this sense, we suggest that new drugs potentially able to modulate sirtuins expression could be tested using the system here described, aiming, in the future, to develop more selective therapies for age-associated disorders

Key-words: sirtuins, zebrafish, *Danio rerio*, gene expression.

ÍNDICE

CAPÍTULO I - Introdução e Objetivos.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. SIRTUÍNAS.....	2
1.1.1. A DESCOBERTA DAS SIRTUÍNAS.....	2
1.1.2. A FAMÍLIA DAS SIRTUÍNAS.....	3
1.1.3. MECANISMO CATALÍTICO.....	5
1.1.4. SIRTUÍNAS COMO ALVOS TERAPÊUTICOS.....	7
1.2. ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL.....	8
1.3. SIRTUÍNAS EM ZEBRAFISH.....	9
2. OBJETIVOS.....	10
CAPÍTULO II - Manustrito.....	11
CAPÍTULO III - Considerações Finais.....	33
ANEXOS.....	36
ANEXO I - Comprovante de Aprovação do Comitê de Ética.....	37
ANEXO II - Comprovante de Submissão do Manuscrito.....	38
ANEXO III - Comprovações de Depósito de Patente.....	35
REFERÊNCIAS.....	43

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

1.1. SIRTUÍNAS

1.1.1. A DESCOBERTA DAS SIRTUÍNAS

Em 1979, Klar e colaboradores publicaram a descoberta do gene *MAR1* (*mating-type regulator 1*) da levedura *Saccharomyces cerevisie* que influenciava o controle de silenciamento transcricional *locus* específico. Alguns anos depois, Jasper Rine descreveu outros quatro genes também relacionados a esse controle, e os nomeou como reguladores de silenciamento de informação (SIR1, 2, 3 e 4), substituindo a nomenclatura dada por Klar (RINE, 1987).

Nos anos seguintes, descobriu-se que a proteína SIR2 estava envolvida na recombinação de genes de RNA ribossomal, e também nos mecanismos usados para silenciamento dos genes próximos aos telômeros. Em 1995, genes homólogos à SIR2 foram identificados com envolvimento no processo de silenciamento transcricional, na progressão do ciclo celular e na manutenção da integridade do genoma, apesar de não serem genes essenciais (BRACHMANN *et al.*, 1995).

A partir da descoberta de parálogos de *SIR2* em *S. cerevisie*, pouco tempo se passou até a identificação de homólogos em outros organismos. Já foi determinada a existência de genes ortólogos em todos os domínios de vida - bactérias, arquea e eucariotos - além dos vírus (SAUVE *et al.*, 2006) caracterizando *SIR2* como membro de uma grande e antiga família de proteínas, agora chamada de sirtuínas (MICHAN *et al.*, 2007).

Em 1999, Frye relatou a descoberta das primeiras cinco sirtuínas humanas (SIRT1-5), e no ano seguinte identificou outras duas (SIRT 6 e 7) (FRYE, 1999; 2000). Durante suas pesquisas, identificou também que as sirtuínas de bactérias, leveduras e mamíferos seriam capazes de transferir grupos ADP-ribose do nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) (FRYE, 1999; BLANDER *et al.*, 2004), o que foi confirmado *in vitro* como uma função de ADP-ribose-transferase (BLANDER *et al.*, 2004). Em 2000, Imai *et al.* (IMAE *et al.*, 2000) observaram que as histonas H3 e H4 poderiam aceitar o ADP-ribose do NAD⁺ se estivessem acetiladas. Outros

experimentos, identificaram que o principal mecanismo catalítico das proteínas SIR2 era na verdade a desacetilação de histonas e não a transferência de ADP-ribosil (BLANDER *et al.*, 2004). A ação catalítica das SIR2 foi mais tarde co-caracterizada como desacetilase NAD⁺-dependente por Laudry *et al.* e Smith *et al.* (LAUDRY *et al.*; SMITH *et al.*, 2000; BLANDER *et al.*, 2004).

1.1.2. A FAMÍLIA DAS SIRTUÍNAS

As sirtuínas fazem parte de um grande grupo de enzimas, a família das desacetilases de histonas ou HDACs, cujo papel principal é reverter a acetilação regulatória das proteínas tipo histona, influenciando diretamente a estrutura dos nucleossomos e consequentemente a transcrição gênica (GREGORETTI *et al.*, 2004). Além das histonas, um crescente número de proteínas tem sido identificado como alvo das HDACs, entre eles estão proteínas estruturais e diversos fatores de transcrição (GALLINARI, 2007).

As HDACs são classificadas em 3 grupos principais: classes I, II e III (DE RUIJTER *et al.*, 2003; MORRISON *et al.*; GALLINARI *et al.*; HILDMANN *et al.*, 2007). A primeira caracteriza-se por proteínas com 350-400 aminoácidos (HILDMAN *et al.*, 2007), de expressão ubíqua e localizada quase exclusivamente no núcleo celular (MORRISON *et al.*, 2007). A classe II é formada por HDACs de cerca de 1000 aminoácidos que movimentam-se entre o núcleo e o citoplasma em resposta à estímulos celulares (HILDMAN *et al.*; MORRISON *et al.*, 2007). As HDACs representantes da classe III são as sirtuínas; filogenética e funcionalmente diferentes das outras duas classes devido ao seu mecanismo de ação único; dependente de NAD⁺, enquanto as classes I e II são dependentes de zinco (MORRISON *et al.*, 2007).

As sirtuínas, são uma família de enzimas modificadoras de proteínas bastante conservada (MILNE *et al.*, 2008). A partir de um estudo filogenético (FRYE, 2000) foram divididas em cinco classes: I, II, III, IV e U. A última é exclusiva de sirtuínas bacterianas enquanto as classes I e IV são exclusivas de eucariotos. Autores sugerem novos estudos para a revisão dessa classificação, a fim de refletir as informações agora disponíveis, já que a divisão feita por Frye em 2000, não

apresenta correlações claras com as funções biológicas que as diferentes sirtuínas desempenham (SAUVE *et al.*, 2006).

As sirtuínas estão conservadas não apenas entre eucariotos, mas também em bactérias e arquea (BLANDER *et al.*, 2004). Os dois últimos, com algumas exceções, possuem uma única sirtuína, enquanto eucariotos apresentam múltiplas sirtuínas (SAUVE *et al.*, 2006). Estas, pelo menos em mamíferos, diferem em função e localização celular (Tabela 1) (YAMAMOTO *et al.*, 2007; HAIGIS e SINCLAIR, 2009). As sirtuínas 1, 6 e 7 encontram-se predominantemente no núcleo e estão relacionadas com estabilidade do genoma e proliferação celular (GAN *et al.*, 2008); SIRT2, presente no citoplasma, está envolvida no ciclo celular, e sua superexpressão prolonga a fase M (BLANDER *et al.*, 2004). As SIRT3, 4 e 5 estão localizadas nas mitocôndrias e provavelmente estejam associadas ao metabolismo energético e a respostas relacionadas ao estresse oxidativo (GAN *et al.*, 2008).

Tabela 1. Principais características das sirtuínas de mamíferos.

Classe	Sirtuína	Localização Intracelular	Atividade	Função Biológica
I	SIRT1	Núcleo / Citoplasma	Desacetilase	Metabolismo/Inflamação/ Neurodegeneração
	SIRT2	Citoplasma	Desacetilase	Ciclo celular
	SIRT3	Núcleo / Mitocôndria (matriz)	Desacetilase	Metabolismo: produção de ATP/ Termogenese
II	SIRT4	Mitocôndria (matriz)	ADP-ribosil transferase	Metabolismo: secreção de Insulina
III	SIRT5	Mitocôndria	Desacetilase	Ciclo da Uréia
	SIRT6	Núcleo (heterocromatina)	ADP-ribosil transferase	Reparo DNA
IV	SIRT7	Núcleo (nucléolo)	-	Transcrição DNAr

- Ainda não identificado.

Dentre os sete membros das sirtuínas de mamíferos a SIRT1, seguida da SIRT2, são as mais estudadas (GAN *et al.*, 2008). Entretanto, autores prevêm que as demais sirtuínas também possam se tornar importantes alvos de pesquisas, principalmente na identificação de novos substratos e moduladores (HAIGIS *et al.*, 2006).

Quanto às características estruturais, é conhecido que a família das sirtuínas possui um domínio catalítico conservado formado por 250-275 aminoácidos (SAUVE

et al., 2006; MILNE *et al.*, 2008), flanqueado por sequências de tamanho variado em sua porção N- e C-terminal (MICHAN *et al.*, 2007; MILNE *et al.*, 2008). Já foram determinadas estruturas cristalográficas de sirtuínas de bactérias, arquea, levedura e do homem (SAUVE *et al.*, 2006). Sua estrutura básica consiste de dois domínios, conectados por uma série de voltas ou alças (SANDERS *et al.*, 2007): o maior, com dobramento do tipo *Rossmann* - característico de proteínas que interagem com NAD^+ - e o menor, composto pelo módulo de ligação com zinco, e pelo módulo de hélice (DENU, 2005; HOLBERT *et al.*, 2005; SAUVE *et al.*, 2006). A posição relativa de um domínio ao outro varia ao longo das diferentes sirtuínas, e é nessa zona que se dá ligação com o NAD^+ e com o substrato (SAUVE *et al.*, 2006).

1.1.3. MECANISMO CATALÍTICO

Um importante indicativo do mecanismo molecular da atividade das sirtuínas veio da relação estequiométrica entre desacetilação e a hidrólise do NAD^+ . Para cada acetil-lisina que é desacetilada, uma molécula de NAD^+ é clivada, formando dois produtos: nicotinamida (Nam) e O-acetil-ADP-ribose (O-AADPR) (Figura 1A) (BLANDER *et al.*, 2004; SAUVE *et al.*, 2006). Duas características desta reação são interessantes: a formação de um composto como produto da reação, o O-AADPR, e a presença do NAD^+ como cofator.

Quanto à formação do O-AADPR, evidências sugerem que este tenha efeito biológico de molécula sinalizadora (SAUVE *et al.*, 2006), provavelmente ligada ao efeito silenciador das sirtuínas (BLANDER *et al.*, 2004). Como molécula sinalizadora, é imprescindível um mecanismo que a degrade quando não for mais necessário. A família das hidrolases nudix já foi identificada com essa capacidade (SAUVE *et al.*, 2006). Por outro lado, estudos estruturais mostraram que O-AADPR pode formar complexos com a sirtuína que o produziu, sugerindo um possível papel inibitório (CHANG *et al.*, 2002; SAUVE *et al.*, 2006).

O envolvimento do NAD^+ é cinética e termodinamicamente desnecessário para desacetilar uma proteína, por exemplo as reações catalizadas pelas HDACs de classe I e II. Uma possível justificativa é a formação de um novo composto (O-AADPR), biologicamente importante como segundo mensageiro ou regulador de desacetilação protéica (SAUVE *et al.*, 2006) via regulação das sirtuínas (BLANDER *et*

al., 2004); permitindo ainda uma ligação entre regulação transcricional por desacetilação e metabolismo energético celular (SAUVE *et al.*, 2006; GALLINARI *et al.*, 2007).

A atividade desacetilase não foi identificada em duas sirtuínas de mamíferos: SIRT4 e SIRT6 (MICHAN *et al.*; YAMAMOTO *et al.*, 2007). Estas possuem uma robusta atividade de ADP-ribosil transferase também dependente de NAD⁺ (Figura 1B) (HAIGIS *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2007), entretanto, acreditava-se que esse mecanismo catalítico era apenas uma reação secundária de baixa eficiência que algumas sirtuínas poderiam apresentar (MICHAN *et al.*, 2007).

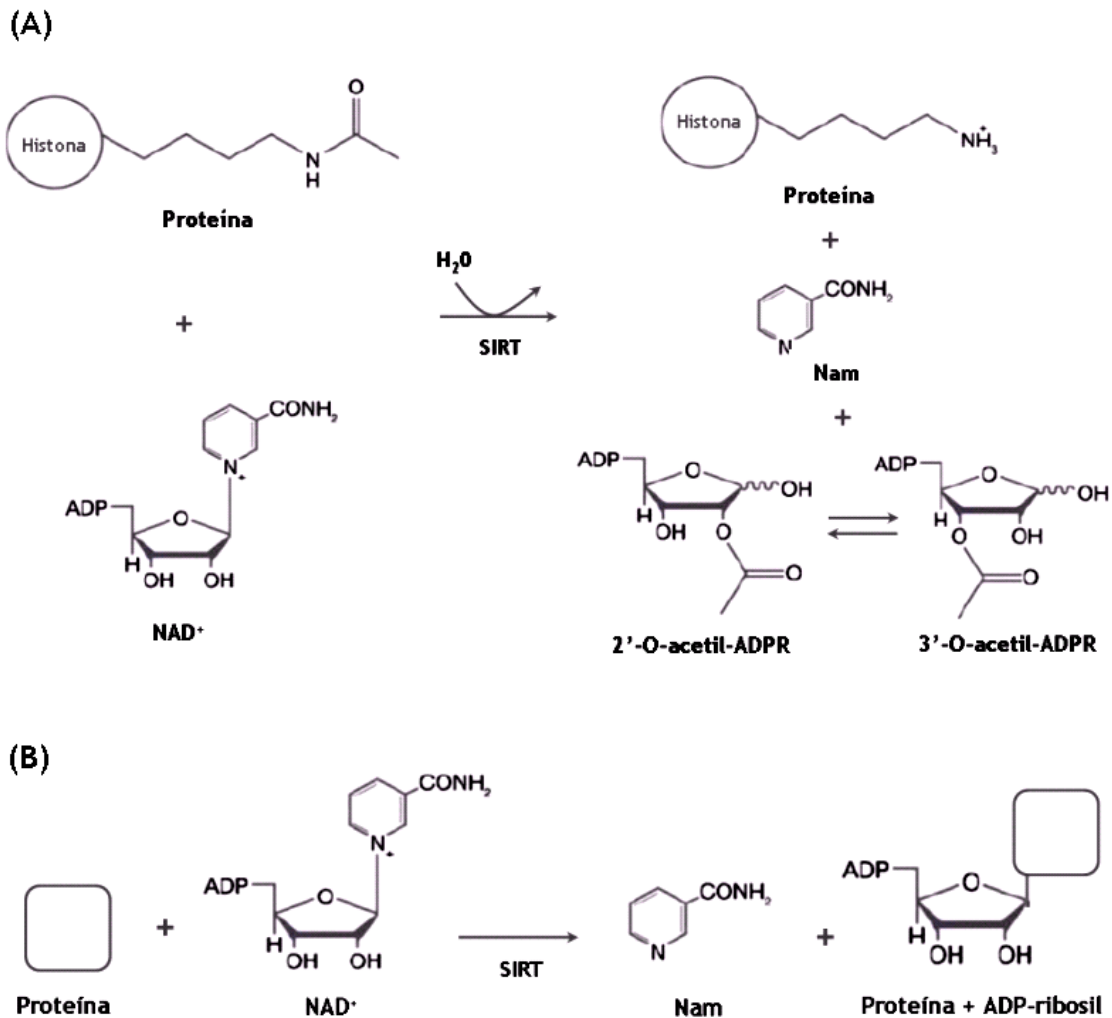


Figura 1. Química e enzimiologia básica da ação catalítica das sirtuínas: (A) desacetilase (B) ADP-ribosil-transferase. (Adaptado de SAUVE, 2006).

Ao contrário da desacetilação, a ação de ADP-ribosil-transferase dependente de NAD⁺ não é exclusiva das sirtuínas. Existem três grupos de enzimas com essa função, classificadas de acordo com seus alvos: as ADP-ribosil transferases modificadoras de proteínas, as modificadoras de ácidos nucléicos e as modificadoras de pequenas moléculas; sendo as sirtuínas parte do primeiro grupo (LIN, 2007).

1.1.4. SIRTUÍNAS COMO ALVOS TERAPÊUTICOS

Quando a SIR2 foi descoberta, há 28 anos atrás, dificilmente se poderia ter antecipado quanto interesse essa família de proteínas geraria (MICHAN *et al.*, 2007). Originalmente, as sirtuínas demonstraram envolvimento apenas em silenciamento gênico. Porém, hoje se reconhece que estão envolvidas em diversas funções celulares muito além do silenciamento transcricional (PORCU *et al.*, 2005). Elas afetam uma ampla série de processos fisiológicos (HAIGIS *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 *et al.*, 2006) e controle de proliferação celular (YAMAMOTO *et al.*, 2007). Atualmente, as sirtuínas são alvos importantes de pesquisas relacionadas à restrição calórica (HAIGIS *et al.*, 2006), câncer, (SAUNDERS *et al.*, 2007), doenças neurodegenerativas (GAN *et al.*, 2008), diferenciação muscular, inflamação e obesidade (PORCU *et al.*, 2005).

A partir de evidências experimentais sugerindo que as sirtuínas participam de diversos processos celulares como citados previamente, pesquisadores tentam agora modular essas enzimas farmacologicamente (PORCU *et al.*, 2005). Pequenas moléculas já foram identificadas como inibidores ou ativadores destas enzimas (SAUVE *et al.*, 2006), e o desenvolvimento desses reguladores positivos e negativos pode ajudar no esclarecimento da ação das sirtuínas em diferentes doenças ou inclusive desenvolver o atual promissor papel terapêutico destas enzimas.

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; WESTPHAL *et al.*; YAMAMOTO *et al.*, 2007; GAN *et al.*; MILNE *et al.*;

OUTEIRO *et al.*, 2008) como a diabetes, o câncer, as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (MICHAN *et al.*, 2007).

1.2. 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 *et al.*, 2008).

Este pequeno teleósteo de água doce é naturalmente originário do nordeste da Índia, Bangladesh e Nepal (SPENCE *et al.*, 2008) e limitava-se a um popular peixe tropical de aquário (CROLLIUS *et al.*, 2005). Cerca de 30 anos atrás, George Streisinger retirou pela primeira vez o *zebrafish* das lojas e o levou para o laboratório (GUO, 2004). Desde então, o *zebrafish* se tornou um modelo experimental amplamente usado nas mais diversas áreas. Na biologia do desenvolvimento, pela transparência de seus ovos que permite o acompanhamento de todo seu rápido ciclo de desenvolvimento (GUO, 2004); e na genética pela alta fecundidade, curto tempo de geração (DOOLEY *et al.*, 2000), conservação anatômica e genômica em relações a humanos (70-80% similaridade) (DOOLEY *et al.*, 2000) e pela disponibilidade de inúmeros mutantes e transgênicos (GUO, 2004). Seu uso em estudos bioquímicos e toxicológicos também é significativo (DOOLEY *et al.*, 2000; HILL *et al.*, 2005), e, há aproximadamente dez anos, vem sendo usado como modelo de várias doenças humanas (DOOLEY *et al.*, 2000; KELLER *et al.*, 2004; HILL *et al.*, 2005).

Características como condições ótimas já determinadas (HILL, 2005), manutenção em pequenos espaços e com baixos custos, fácil administração de drogas solúveis em água (KELLER *et al.*, 2004), habilidade de manipulação da 'expectativa de vida' por redução de temperatura e restrição calórica (GERHARD, 2003), e rápida aclimação a novos ambientes (SPENCE *et al.*, 2008) auxiliaram o crescimento do *zebrafish* como modelo de estudo para várias doenças humanas;

especialmente doenças cardiovasculares, hematopoiéticas (DOOLEY *et al.*, 2000; GERHARD *et al.*, 2002) e neurodegenerativas, além de doenças relacionadas à órgãos como rins, ossos, olhos, fígado e aparelho gastrointestinal (SHIN *et al.*, 2002). 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 *et al.*, 2004).

Todas essas características fizeram do *zebrafish* um modelo experimental consolidado, sendo hoje uma das principais vantagens de seu uso como sistema modelo justamente todo o conhecimento disponível sobre sua biologia, além de ferramentas e técnicas disponíveis para a espécie (SPENCE *et al.*, 2008; ZON *et al.*, 2005). No início dos anos 90, menos de 100 artigos científicos relacionados com *zebrafish* eram publicados anualmente e em 2005 este número já alcançava cerca de 3.500 (HILL *et al.*, 2005).

1.3. SIRTUÍNAS EM ZEBRAFISH

Apesar do uso crescente do *zebrafish* como modelo vertebrado, e mais recentemente como modelo de doenças humanas relacionadas ao envelhecimento, informação sobre sirtuínas e *zebrafish* é escassa. Hoje, dois artigos abrangem o tema: o primeiro descreve SIRT1 como um modulador crítico da expressão gênica endotelial durante o crescimento vascular pós-natal, não apenas em *zebrafish* como também em ratos (POTENTE *et al.*, 2007) e o segundo propõe a larva do *zebrafish* como modelo vertebrado ideal para realizar *screenings* em busca de pequenas moléculas moduladoras de proteínas como as sirtuínas (Jones *et al.*, 2008).

Assim, considerando que 1) o *zebrafish* é um modelo experimental consolidado e 2) que as sirtuínas são importantes alvos de pesquisa em diferentes áreas nos últimos anos principalmente devido à possibilidade de se tornarem alvos terapêuticos, identificar os diferentes membros da família das sirtuínas presentes no *zebrafish* é uma necessidade e uma questão de tempo. Saber quais membros estão presentes nos diferentes tecidos de *zebrafish* é o primeiro passo para estudos

de desenvolvimento de drogas para terapias de doenças humanas, através de sua validação como sistema modelo de doenças relacionadas ao envelhecimento.

2. OBJETIVOS

Identificar os genes relacionados às sirtuínas presentes no genoma de *zebrafish* (*Danio rerio*) e caracterizar o padrão de expressão gênica de cada membro em nove diferentes tecidos.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os genes relacionados às sirtuínas presentes no genoma do *zebrafish* (*Danio rerio*);
- Caracterizar o padrão de expressão gênica de cada membro identificado nos seguintes órgãos: baço, brânquia, coração, fígado, gônada feminina, gônada masculina, músculo esquelético e rim.

CAPÍTULO II
MANUSCRITO SUBMETIDO

Zebrafish as a Model Organism to Screen New Drugs Potentially Able to Modulate Sirtuin Expression

Talita Carneiro Brandão Pereira¹, Eduardo Pacheco Rico², Denis Broock Rosemberg²,
Helena Schirmer⁴, Renato Dutra Dias³, André Arigony Souto⁴, Carla Denise Bonan³,
Maurício Reis Bogo¹.

¹ Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, PUCRS

² Departamento de Bioquímica, UFRGS

³ Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, PUCRS

⁴ Laboratório de Química de Produtos Naturais, PUCRS

*Manuscrito submetido para publicação
na revista OMICS: The Journal of
Integrative Biology (2010).*

Zebrafish as a Model Organism to Screen New Drugs Potentially Able to Modulate Sirtuin Expression

Authors and Affiliations

Talita Carneiro Brandão Pereira¹, Eduardo Pacheco Rico², Denis Broock Rosemberg², Helena Schirmer³, Renato Dutra Dias⁴, André Arigony Souto³, Carla Denise Bonan^{4,5*}, Maurício Reis Bogo^{1,5*}.

¹ 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.

² 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.

³ 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.

⁴ 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.

⁵ Instituto Nacional Translacional em Medicina (INCT-TM), 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding authors: cbonan@pucrs.br and mbogo@pucrs.br

Tel: +55-51-3320-3500 - Ext. 4726

Fax: +55-51-3320-3568

Abstract

Sirtuins comprise a unique class of NAD⁺-dependent deacetylases that are key regulators of many physiological processes. They appear to be a potential target set of enzymes for age-associated diseases therapies, and have attracted interest in many research areas that chemical and cellular investigations have sought to understand them, and to discover potential ligands. For molecular screenings a cost-effective, easily manipulated and consolidated model organism is needed, and the zebrafish fits these requirements perfectly. Here we report the identification of sirtuin-related genes and their expression patterns in nine tissues of adult zebrafish. The investigation identified eight sirtuin-related genes, and their phylogenetic analysis resulted in seven well-resolved terminal clades, corresponding to each sirtuin (SIRT1,2,4-7) and two SIRT3 paralogs. Each gene showed a unique expression profile, illustrating a wide tissue distribution of sirtuins in zebrafish. SIRT1, SIRT3, SIRT5, and SIRT6 genes were expressed in all tissues, and SIRT1 exhibited the highest level of expression in all organs. A modulation experiment was performed using resveratrol, and results confirmed to the predicted scenario: altered sirtuin expression levels. Drugs based on sirtuin modulators may be tested using this system, and hereafter could lead us to more selective and powerful therapies for age-related disorders.

Key words: sirtuins, zebrafish, RT-PCR, gene expression

1. Introduction

First identified in *Saccharomyces cerevisiae* as silent information regulators (SIRs) (Gan et al., 2008), sirtuins (SIRTs) are widely distributed in all phyla of life including viruses (Sauve et al., 2006). These large and diverse class III histone deacetylases (HDACs) are a family of NAD⁺-dependent protein deacetylases that catalyze mono-ADP-ribosyl transfer and/or deacetylation (Gan et al., 2008; Sauve et al., 2006; Yang et al., 2006; Jiang et al., 2008). Eukaryotes typically contain multiple sirtuins with a highly conserved core domain (approximately 275 amino acids) (Milne et al., 2008), flanked by an N- and/or C-terminal sequence of variable length (Michan et al., 2007). It is known, at least for the seven members of the mammalian sirtuins, that they differ in subcellular localization, and this probably contributes to their specific functions (Gan et al., 2008).

Twenty-eight years ago, when SIR2 was first discovered, it could hardly have been anticipated how much interest would be taken in this family of proteins (Michan et al., 2007). Interest in the discovery of longevity genes prompted a search for orthologs of the yeast Sir2 (Taylor et al., 2008), and it has been recognized that they are more than a silent factor. Sirtuins affect a broad range of cellular functions (Haigis et al., 2006), including life span regulation, control of cell proliferation and apoptosis, metabolic activity regulation and DNA repair (Sauve et al., 2006; Yamamoto et al., 2007). New studies continue to uncover sirtuin roles in different biological processes, such as cellular resistance to stress (Jiang et al., 2008). Sirtuins are targets in research related to cancer (Saunders et al., 2007), neurodegenerative disorders (Gan et al., 2008), muscle differentiation, inflammation, obesity (Porcu et al., 2005) and other aging-associated diseases (Milne et al., 2008).

Humans possess seven sirtuins (SIRT1-7), and among these, SIRT1 is the best-studied, and is one of the three nuclear sirtuins (Gan et al., 2008; Lavu et al., 2008). SIRT1 has been associated with metabolism, neuroprotection, inflammation (Yamamoto et al., 2007), cancer, and aging (Kim et al., 2008). SIRT2, located in the cytoplasm, is involved in the cell cycle (Blander et al., 2004), adipocyte differentiation, the oxidative-stress response (Lavu et al., 2008) and neurodegeneration (Kim et al., 2008). SIRT3, 4 and 5 appear in the mitochondria and are associated probably with energetic metabolism, and responses to oxidative stress (Gan et al., 2008). SIRT6, found in heterochromatic regions of the nucleus, has been linked to genomic stability and premature aging (Taylor et al., 2008). SIRT7 is found predominantly in the nucleoli and has been associated with lifespan, inflammation (Lavu et al., 2008) and stress resistance (Kim et al., 2008). Recently, considerable progress has also been made with the less studied members. These are anticipated to become important research targets, especially for the identification of new substrates and modulators (Haigis et al., 2007), particularly because the role of each sirtuin in specific tissues is not clear at this time (Lavu et al., 2008).

This scenario reflects possible pathways that may interact with the sirtuins. Their implication in many human disorders has precipitated intensive interest in potential ligands that could modulate their activity (Taylor et al., 2008), thereby acting as therapeutics. Small molecules have already been identified as inhibitors and activators of sirtuins (Sauve et al., 2006) and these may help in clarifying the biological and pathological roles of sirtuins in a broad range of human diseases, which therefore represent an attractive portfolio of therapeutic targets (Lavu et al., 2008).

Aging and aging-related ailments have been studied in many model organisms such as worms, flies and rodents (Blander et al., 2002). Recently, the zebrafish (*Danio rerio*) also has provided insights into several human diseases especially because it develops several

phenotypes similar to those of aging mammals (Keller et al., 2004). Diseases that affect bones, kidneys, eyes, the liver and the gastrointestinal tract (Shin et al., 2002), and those systems directly affected by the aging processes (such as in cancer, neurodegenerative disorders, hematopoietic and cardiovascular diseases) (Blander et al., 2002; Dooley et al., 2000; Kishi et al., 2004), are examples of ailments being tested in this model organism. Despite having a longer life span than mice, characteristics including the lower costs for breeding and maintenance, the easy administration of water-soluble drugs and chemicals, the variety of available mutant strains mimicking human diseases (Blander et al., 2002; Keller et al., 2004; Gehard et al., 2003), and easy and fast adaptation to new environments are some advantages to the use of zebrafish as an animal model to explore the biology of aging, as well as identification of longevity assurance genes (Keller et al., 2004). The zebrafish has an experimentally expedient organism similar to that of invertebrate models (such as *C. elegans* and *D. melanogaster*), with the anatomic and physiological ‘complexities’ of a vertebrate (Keller et al., 2004).

Although the zebrafish has been widely used as a vertebrate model and, most recently, as a promising vertebrate model of aging, little is known about *Danio rerio* and sirtuins. At present, only two studies concerning zebrafish and sirtuins have been published. One described SIRT1 as a critical modulator of endothelial gene expression governing postnatal vascular growth, not only in zebrafish but also in mice (Potente et al., 2007), and the most recent report proposed zebrafish larvae as a high throughput vertebrate model for performing small molecule screens, especially for sirtuin family members (Jones et al., 2008).

Considering that the zebrafish is a consolidated experimental model, and sirtuins have been an important research target in the last few decades, combined studies for the development of therapies for aging-related disorders lie in the near future. Under these circumstances, the

purpose of this study was to identify all sirtuin-related genes and to map their expression patterns in nine different tissues of adult zebrafish, in order to establish a starting point for drug development through zebrafish validation as an aging and drug screening model.

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). They were acclimated for 2 weeks in a 50L thermostated aquarium, with the water temperature maintained at $26 \pm 2^\circ\text{C}$ under a 12h light–dark controlled photoperiod, and fed with commercial fish pellets twice a day. Animal use and manipulation were carried out according to the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals, and the protocol was approved by our institutional ethics committee (Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA/PUCRS) under license number 08/00050.

2.2. Identification of sirtuin members and phylogenetic analysis

Sirtuin members were identified in zebrafish using NCBI-BLAST searches of GenBank, with *Homo sapiens* (Q96EB6, Q8IXJ6, Q9NTG7, Q9Y6E7, Q9NXA8, Q8N6T7, Q9NRC8), *Mus musculus* (NP_062786, NP_071877, CAJ18608, Q8R216, NP_849179, NP_853617, AAP83960), and *Gallus gallus* (BAD38898, BAD38897, XP_420920, XP_415273, XP_418925, NP_001034409, NP_001026277) protein sequences as queries. The obtained *Danio rerio* sequences were compared with the zebrafish protein database at ZFIN (access numbers in Table 1) in order to confirm data annotation. An alignment was performed using ClustalX and a phylogenetic tree was constructed with MEGA 4.0.2 according to the Neighbor-Joining method, using proportional distance (p-distance).

2.3. Primer design

Primers for each one of the zebrafish sirtuins were constructed using the Oligos 9.6 program. The primers for β -actin, used for normalization as a constitutive gene, were designed as described previously (Chen et al., 2004).

2.4. Semi-quantitative reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

Zebrafish spleen, gills, brain, heart, liver, female gonad, male gonad, skeletal muscle and kidney were dissected and immediately frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated from each organ using the TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's instructions, adapted as follows: tissues were homogenized in 500 μ L of TRIzol[®] Reagent and 100 μ L chloroform was added and then vortexed and centrifuged at 10,600 \times g for 15 minutes at 5°C. The transparent aqueous phase was transferred to 250 μ L of isopropyl alcohol for RNA precipitation through centrifugation (10,600 \times g for 10 minutes at 5°C). RNA pellets were washed with 500 μ L of 75% cold ethanol and centrifuged at 6,800 \times g for 5 minutes at 5°C. The supernatant was discarded and RNA resuspended in 15 μ L of RNase-free water plus 0.4 μ L of RNase OUT Ribonuclease Inhibitor Recombinant (Invitrogen). RNA was quantified by spectrophotometry, calculating the ratio between absorbance values at 260 and 280nm, and all samples were adjusted to 160ng/ μ L.

cDNA species were synthesized with SuperScript[™] First-Strand (Synthesis System for RT-PCR) from Invitrogen, following the manufacturer's instructions. Each RNA sample (2 μ g/mL) was mixed with 1 μ L of 50 μ M Oligo(dT) and 1 μ L of Annealing Buffer up to a final volume of 8 μ L. Samples were incubated at 65°C for 5 minutes in a thermal cycler, following a 1 minute step on ice, when 10 μ L of 2X First-Strand Reaction Mix and 2 μ L of SuperScript[™] III/RNaseOUT[™] Enzyme Mix were added. Products were next incubated for

50 minutes at 50°C and then 85°C for 5 minutes. The cDNA products were used as a template for each PCR amplification. PCR parameters were first optimized and reactions were performed to allow product detection within the linear phase of mRNA transcript amplification for each primer pair (Table 1). The amplified products were visualized on a 1.0% agarose gel with GelRed[®] under ultraviolet light. Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) was used as a molecular marker. The relative abundance of mRNA for each sirtuin versus β -actin was determined by optical densitometry using ImageJ1.37 freeware. Each experiment was repeated at least three times, using RNA isolated from independent extractions.

2.5. Resveratrol exposure

Considering that resveratrol is a potent modulator of sirtuins, the animals were exposed to a resveratrol solution (5 mg/L or 50 mg/L dissolved in 100 μ L ethanol and 2L of water) for 15, 30 or 60 minutes, in parallel with a control group exposed to water only. Animal use and manipulation, and RT-PCR experiments were performed as previously described using zebrafish brain, one of the tissues previously analyzed (n=5).

2.6. Statistical analysis

Data processing and statistical analysis were performed using Microsoft Excel and the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 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.E. and statistically compared by one-way analysis of variance (One-way ANOVA), followed by the post-hoc Tukey test, considering $P \leq 0.05$ as significant.

3. Results and Discussion

3.1. Identification of sirtuin members and their gene expression profile

Sirtuin protein sequences of *Homo sapiens*, *Mus musculus* and *Gallus gallus* were retrieved from GenBank and used as queries for the identification of zebrafish sirtuin genes. These searches resulted in eight sirtuin-related genes in the zebrafish genome: SIRT1-7 and another SIRT3 paralog, here called SIRT3.2 (Table 1). All 29 sequences were aligned (seven sequences per organism, and eight sequences for *Danio rerio*) and a sirtuin signature region, the conserved amino acid sequence GAGxSx (Michan et al., 2007), was found in all of them. A phylogenetic tree was then constructed, using proportional distance (p-distance) through the Neighbor-Joining method. The resulting tree presents seven well-resolved terminal clades supported by high bootstrap values, corresponding to each one of the sirtuin members (Fig. 1).

Gene expression patterns of each identified sirtuin member were determined in nine different zebrafish tissues (spleen, gills, brain, heart, liver, female gonad, male gonad, skeletal muscle and kidney). After dissection, the mRNAs were isolated and semi-quantitative RT-PCR reactions were performed. The results are expressed as sirtuin: β -actin mRNA ratios (means \pm S.E.) and are presented in Table 2, with a representative electrophoresis gel in Figure 2. The results illustrate a wide tissue distribution of sirtuin family members in zebrafish, with a unique expression profile for each SIRT gene in this animal, as reported previously for mammalian sirtuins (Michishita et al., 2005).

SIRT1, SIRT3, SIRT5, and SIRT6 related genes were expressed in all tissues analyzed, whereas no expression was detected for SIRT2 in spleen and kidney; for SIRT3.2 in spleen, gills, heart, skeletal muscle, and kidney; for SIRT4 in spleen; and for SIRT7 in gills and skeletal muscle (Fig. 2). SIRT1 presented the highest expression among sirtuin-related genes in all tissues analyzed, and was most highly expressed in male gonads. The lowest expression of Sirtuins 3, 4 and 5, which are mitochondrial in mammals (Michishita et al., 2005), was

observed in muscle and the highest expression in kidney. The highest expression of SIRT6 and SIRT7 was found in liver.

The results of the semi-quantitative RT-PCR demonstrated significant differences between sirtuin expression patterns in each one of the studied tissues (Table 2). Given the fact that they have been linked to different cellular processes, the different patterns suggest that sirtuin family members could play distinct physiological roles in zebrafish tissues. It has been reported that SIRT1 protein expression is regulated, at least in part, at a transcription level (Zschoernig et al., 2008). Most recently, results confirmed that SIRT1-bound genes are depressed in aging brain and that its overexpression can suppress age-related changes (Oberdoerffer et al., 2008). Another sirtuin member, SIRT6, has also been associated with gene expression control, where it directly inhibits expression of a subset of NF- κ B (a transcription factor family) target genes, especially those associated with aging (Kawahara et al., 2009). This corroborates evidence for the enormous potential as therapeutic targets for anti-aging treatments, not only of SIRT1, but possibly of all sirtuin members.

3.2. Zebrafish as a model organism for modulator screening

During the past decade the zebrafish moved from pet shops to laboratory aquariums (Guo et al., 2004; Zon et al., 2005), and its use as a model organism increases every day. Concerning aging-related disease and aging itself, zebrafish could help to elucidate the pathways involved, and contribute to the discovery of potential drugs applicable to those diseases.

Indeed, age-related transcriptional changes are not limited to sirtuin-regulation (Oberdoerffer et al., 2008); accumulating evidence has shown a promising therapeutic role for sirtuins in diseases of aging (Milne et al., 2008; Westphal et al., 2007), and hereafter, they may alleviate

age-associated changes. Under this panorama, our results allow a complete scenario for further sirtuin investigation.

A number of small molecules have been identified as sirtuin modulators (Sauve et al., 2006; Zon et al., 2005), creating a therapeutic perspective for sirtuins, as suggested previously (Jiang et al., 2008; Milne et al., 2008; Taylor et al., 2008; Porcu et al., 2005; Kim et al., 2008; Westphal et al., 2007; Outeiro et al., 2008). Known and potential activators and inhibitors could be easily tested in specific zebrafish tissues in order to provide new approaches to the treatment of late age-related diseases, looking not only for modulating molecules, but also for their dose- and time-responses, as recently published, where SIRT1-bound gene activation by resveratrol was reported to be the most potent activator of Sir2 enzymes *in vivo* and *in vitro* (Chen et al., 2009).

To test our system, we exposed zebrafish to resveratrol, and analyzed the gene expression of all sirtuins in the brain. The animals were exposed to two doses of resveratrol (5 and 50 mg/L) over three different periods (15, 30 and 60 minutes) based on previous lab experience (unpublished data). The results, presented in Figure 3 as the relative values, demonstrated that resveratrol was able to alter the expression pattern of these genes. When zebrafish were exposed to a solution of 5 mg/L of resveratrol, expression of SIRT2, SIRT3, SIRT3.2, SIR4, and SIRT5 was altered in at least one of the analyzed periods compared with the control group. Using 50 mg/L, we found that SIRT3 and 4 were the only family members that showed significant gene expression at 15 and 30 minutes, and only SIRT5 was detected after 60 minutes of treatment, all compared with the control group. SIRT 6 and 7 did not present any significant differences in responses to either dose or time of exposure.

Recently, Beher and colleagues (Beher et al., 2009) reported that resveratrol is not a direct activator of sirtuin 1 enzyme activity, and our study showed that apparently there is no significant modulation in SIRT1 gene expression with resveratrol either. However, the Beher study focused on SIRT1, so no approach involving other sirtuin family members was investigated. Therefore, considering that resveratrol alters the gene expression profile of other sirtuins in zebrafish brain, as we demonstrate here, resveratrol may alter the enzyme activity of other members of this group of NAD⁺-dependent deacetylases as well, or at least modify their activity indirectly, as suggested for SIRT1 (Beher et al., 2009).

Added to the fact that modulators for sirtuins stand out as promising research molecules, the zebrafish, being a useful and a cost-effective alternative, permits a whole-organism analysis, possibly providing a favorable model to accelerate the process of drug development and validation, with respect to target identification, disease modeling and toxicology (Zon et al., 2005). Pharmacological interventions have already proved successful at regulating sirtuin activity. New drugs may possibly lead us into more selective and powerful therapies for human disorders (Porcu et al., 2005).

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and by the FINEP research grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” # 01.06.0842-00; T.C.B.P. and E.P.R were recipients of fellowships from CNPq. D.B.R and H.S. were recipients of fellowships from CAPES. The authors would like to thank lab colleagues for technical assistance, Sandra Isabel de Oliveira Ferreira for reviewing this manuscript and Melina Carneiro Brandão Pereira for art files help.

References

- Beher D, Wu J, Cumine S, Kim K, Lu S, Atangan L, et al. Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity. *Chem Biol Drug Des.*74:619-24. 2009.
- Blander G, Guarente L. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annual Review of Biochemistry.*73:417-35. 2004.
- Chen C, Yu W, Fu Y, Wang X, Li J, Wang W. Resveratrol protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis through the SIRT1-FoxO1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.*378:389-93. 2009.
- Chen W, John J, Lin C, Lin H, Wu S, Chang C. Expression of metallothionein gene during embryonic and early larval development in zebrafish. *Aquat Toxicol.*69:215-27. 2004.
- Dooley K, Zon L. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev.*10:252-6. 2000.
- Gan L, Mucke L. Paths of convergence: Sirtuins in aging and neurodegeneration. *Neuron.*58:10-4. 2008.
- Gerhard G, Cheng K. A call to fins! Zebrafish as a gerontological model. *Aging Cell.*1:104-11. 2002.
- Gerhard G. Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research. *Exp Gerontol.*38:1333-41. 2003.
- Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav.*3:63-74. 2004.
- Haigis MC, Guarente LP. Mammalian sirtuins - emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes & Development.*20:2913-21. 2006
- Jiang W. Sirtuins: novel targets for metabolic disease in drug development. *Biochem Biophys Res Commun.*373:341-4. 2008.
- Jones K, Alimov A, Rilo H, Jandacek R, Woollett L, Penberthy W. A high throughput live transparent animal bioassay to identify non-toxic small molecules or genes that regulate vertebrate fat metabolism for obesity drug development. *Nutr Metab (Lond).*5:23. 2008.
- Kawahara T, Michishita E, Adler A, Damian M, Berber E, Lin M, et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell.*136:62-74. 2009.
- Keller E, Murtha J. The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*138:335-41. 2004.
- Kim E, Um S. SIRT1: roles in aging and cancer. *BMB Rep.*41:751-6. 2008.

- Kishi S. Functional aging and gradual senescence in zebrafish. *Ann N Y Acad Sci.*1019:521-6. 2004.
- Lavu S, Boss O, Elliott P, Lambert P. Sirtuins--novel therapeutic targets to treat age-associated diseases. *Nat Rev Drug Discov.*7:841-53. 2008.
- Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochemical Journal.*404:1-13. 2007.
- Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Molecular Biology of the Cell.*16:4623-35. 2005.
- Milne JC, Denu JM. The Sirtuin family: therapeutic targets to treat diseases of aging. *Current Opinion in Chemical Biology.*12:11-7. 2008.
- Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, Mostoslavsky R, Vann J, Park S, et al. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell.*135:907-18. 2008.
- Outeiro TF, Marques O, Kazantsev A. Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease.*1782:363-9. 2008.
- Porcu M, Chiarugi A. The emerging therapeutic potential of sirtuin-interacting drugs: from cell death to lifespan extension. *Trends in Pharmacological Sciences.*26:94-103. 2005.
- Potente M, Ghaeni L, Baldessari D, Mostoslavsky R, Rossig L, Dequiedt F, et al. SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes & Development.*21:2644-58. 2007.
- Saunders LR, Verdin E. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene.*26:5489-504. 2007.
- Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, Boeke JD. The biochemistry of sirtuins. *Annual Review of Biochemistry.*75:435-65. 2006.
- Shin J, Fishman M. From Zebrafish to human: modular medical models. *Annu Rev Genomics Hum Genet.*3:311-40. 2002.
- Taylor D, Maxwell M, Luthi-Carter R, Kazantsev A. Biological and potential therapeutic roles of sirtuin deacetylases. *Cell Mol Life Sci.*65:4000-18. 2008.
- Westphal CH, Dipp MA, Guarente L. A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging? *Trends in Biochemical Sciences.*32:555-60. 2007.
- Yamamoto H, Schoonjans K, Auwerx J. Sirtuin functions in health and disease. *Molecular Endocrinology.*21:1745-55. 2007.
- Yang TL, Sauve AA. NAD metabolism and sirtuins: Metabolic regulation of protein deacetylation in stress and toxicity. *Aaps Journal.*8:E632-E43. 2006.

Zon L, Peterson R. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov.*4:35-44. 2005.

Zschoernig B, Mahlknecht U. SIRTUIN 1: regulating the regulator. *Biochem Biophys Res Commun.*376:251-5. 2008.

Table 1. Sequence summary: Accession number, primer sequences and PCR amplification conditions.

Sirtuin	GenBank ID	ZFIN Gene ID (ZDB – Gene)	PCR Conditions		
			Primers (5' - 3')	T _m (°C)	Cycles
SIRT 1	XM_001334404	050309-96	F - CAGCTCTGCTACAATTCATCGCGTC R - AATCTCTGTAGAGTCCAGCGCGTGTG	62	30
SIRT 2	BC067165	030131-1028	F - TCTCTGAAGAAATTCCTAAGTGCGATTCC R - TTATCTGAATCAAATCCATTCCGCCTC	61	30
SIRT 3	NM_001080174	070112-1762	F - CATTAAATGTGGTGGAAACAAGAGGCCTG R - AGTTCCTCTCCTTTGTAATCCCTCCGAC	61	30
SIRT 3.2	NM_001044708	-	F - CGGCAGGCTGATGAAGCTTGGTCG R - TAGCTTGCTTGGCTTCCTCTGCAGG	63	30
SIRT 4	BC083418	041010-65	F - TGTGGTGAAGTACTCCTCGTGCTGAGC R - CGGAAGTTTTCTTTCACTAGCAGCGAGG	63	30
SIRT 5	BC075987	040718-349	F - CCACGGTAGTCTGTTTAAAACCCGCTG R - AGTGATATTTGAAGCGTTGGGTAGCAGG	61	30
SIRT 6	NM_001002071	031007-2	F - GGACTGGGAGGACTCTCTGCCCCGAC R - GCCCGGCCCACTCCGGAACG	68	30
SIRT 7	AAI55852*	-	F - GCATTTTGGAGAACGTGGCACTTTGG R - GTTAGCCATGCTGAAGATGGGGTCC	61	45

T_m: Melting temperature.

* Partial sequence.

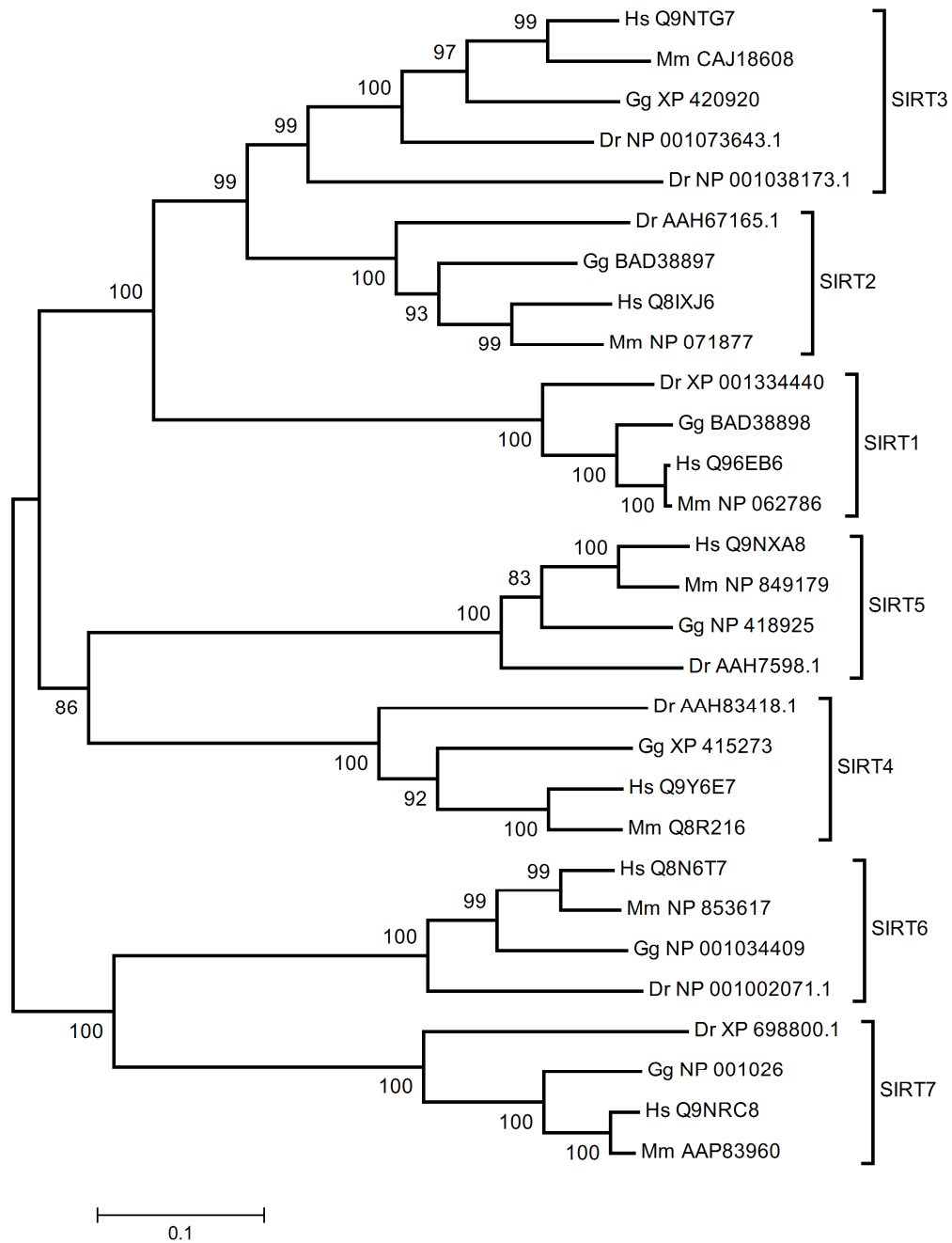


Fig. 1. Phylogenetic analysis of sirtuin family members. The deduced amino acid sequences were aligned with the ClustalX program and the phylogenetic tree was constructed using proportional distance (p-distance) through the Neighbor-Joining method, with the MEGA4.0.2 program. The phylogenetic tree grouped consistently *Danio rerio* (Dr), *Gallus gallus* (Gg), *Mus musculus* (Mm) and *Homo sapiens* (Hs) SIRT1-SIRT7 orthologous sequences.

Table 2. Gene expression pattern: Relative mRNA expression of sirtuin-related genes in zebrafish tissues.

Tissues	Optical densitometry (O.D.) for SIRT: β -actin mRNA ratio (mean \pm S.E.)							
	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 ^g	0.56 \pm 0.04 ^{d,g}
Gills	1.01 \pm 0.01	0.34 \pm 0.00 ^{a,d,e}	0.57 \pm 0.16	*	0.36 \pm 0.10 ^f	0.24 \pm 0.01 ^{e,f}	0.38 \pm 0.01 ^g	*
Brain	0.98 \pm 0.05	0.65 \pm 0.08 ^b	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 ^{g,h}	0.79 \pm 0.10 ^g
Heart	1.05 \pm 0.04	0.77 \pm 0.05 ^{b,h}	0.46 \pm 0.05	*	0.61 \pm 0.07 ^h	0.45 \pm 0.09	0.53 \pm 0.06 ^{g,h}	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 ^f	0.56 \pm 0.12	0.98 \pm 0.17 ^{a,b,c,d,e,f,h}	1.19 \pm 0.04 ^{a,c,f,i}
Female Gonad	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 ^b	0.59 \pm 0.17 ^{g,h}	0.79 \pm 0.05 ^g
Male Gonad	1.97 \pm 0.49 ^{h,i}	0.68 \pm 0.09 ^b	0.64 \pm 0.17	0.51 \pm 0.08	0.52 \pm 0.12 ^h	0.56 \pm 0.01	0.65 \pm 0.03 ^{g,h}	0.92 \pm 0.11 ^{f,i}
Skeletal Muscle	0.87 \pm 0.01 ^g	0.37 \pm 0.01 ^c	0.38 \pm 0.05	*	0.19 \pm 0.01 ^{e,d,f}	0.29 \pm 0.02 ^f	0.19 \pm 0.00 ^{a,c,d,e,f}	*
Kidney	0.89 \pm 0.04 ^g	*	0.64 \pm 0.06	*	0.69 \pm 0.03 ^{b,g,m}	0.62 \pm 0.09 ^{b,h}	0.41 \pm 0.02 ^g	0.45 \pm 0.09 ^{d,g}

* No expression was detected.

The results were analyzed by ANOVA followed by Tukey HSD test as post-hoc, considering $P \leq 0.05$ as significant. The relative amount of mRNA was significantly different from ^aspleen, ^bgills, ^cbrain, ^dheart, ^eliver, ^ffemale gonad, ^gmale gonad, ^hskeletal muscle, ⁱkidney.

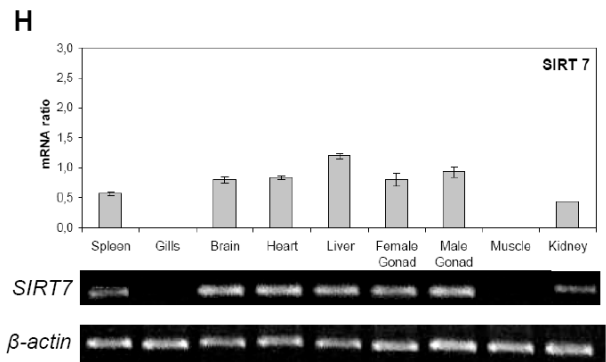
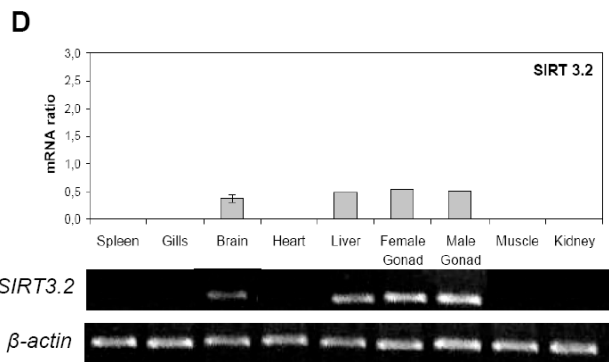
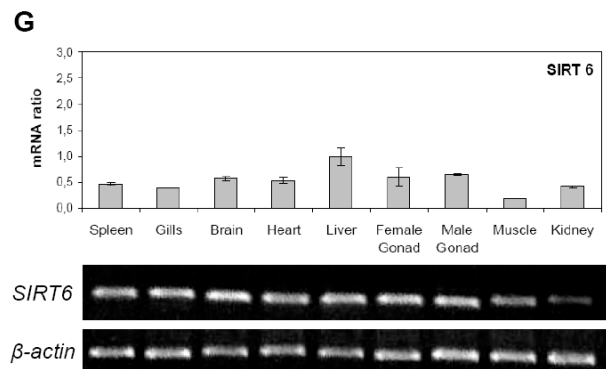
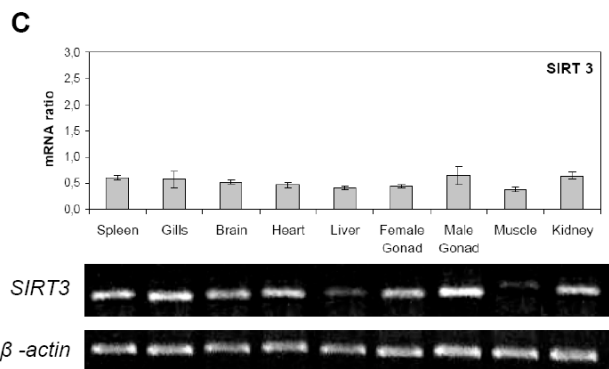
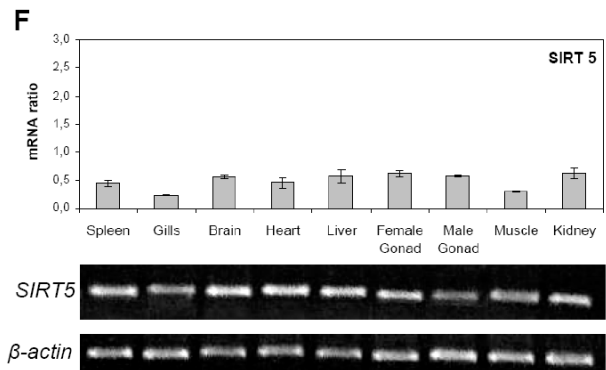
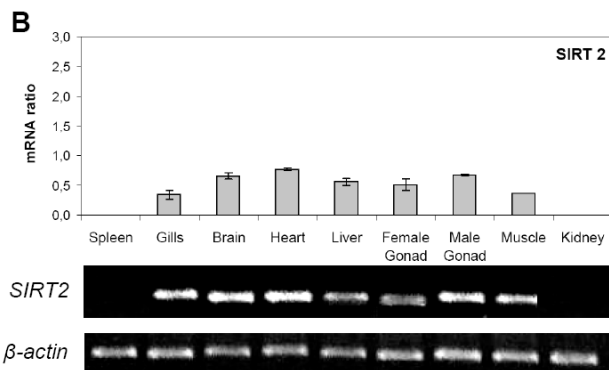
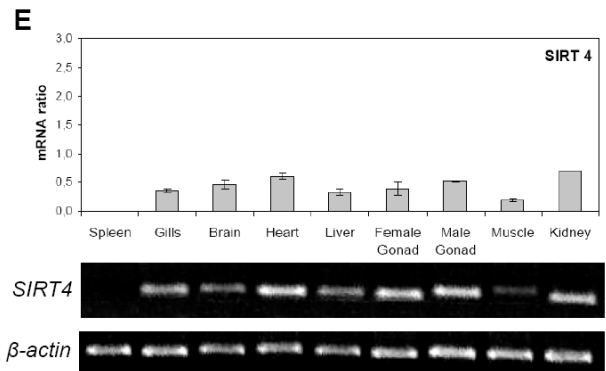
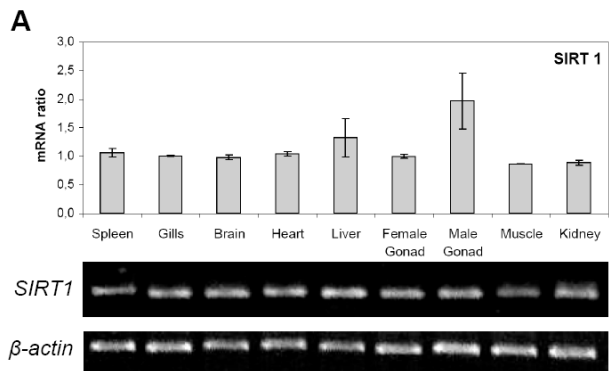


Fig. 2. Expression patterns of sirtuin family members in zebrafish. (A) SIRT1, (B) SIRT2, (C) SIRT3, (D) SIRT3.2, (E) SIRT4, (F) SIRT5, (G) SIRT6, (H) SIRT7. The results are expressed as sirtuin: β -actin mRNA ratio (mean \pm S.E. of four independent replicate experiments).

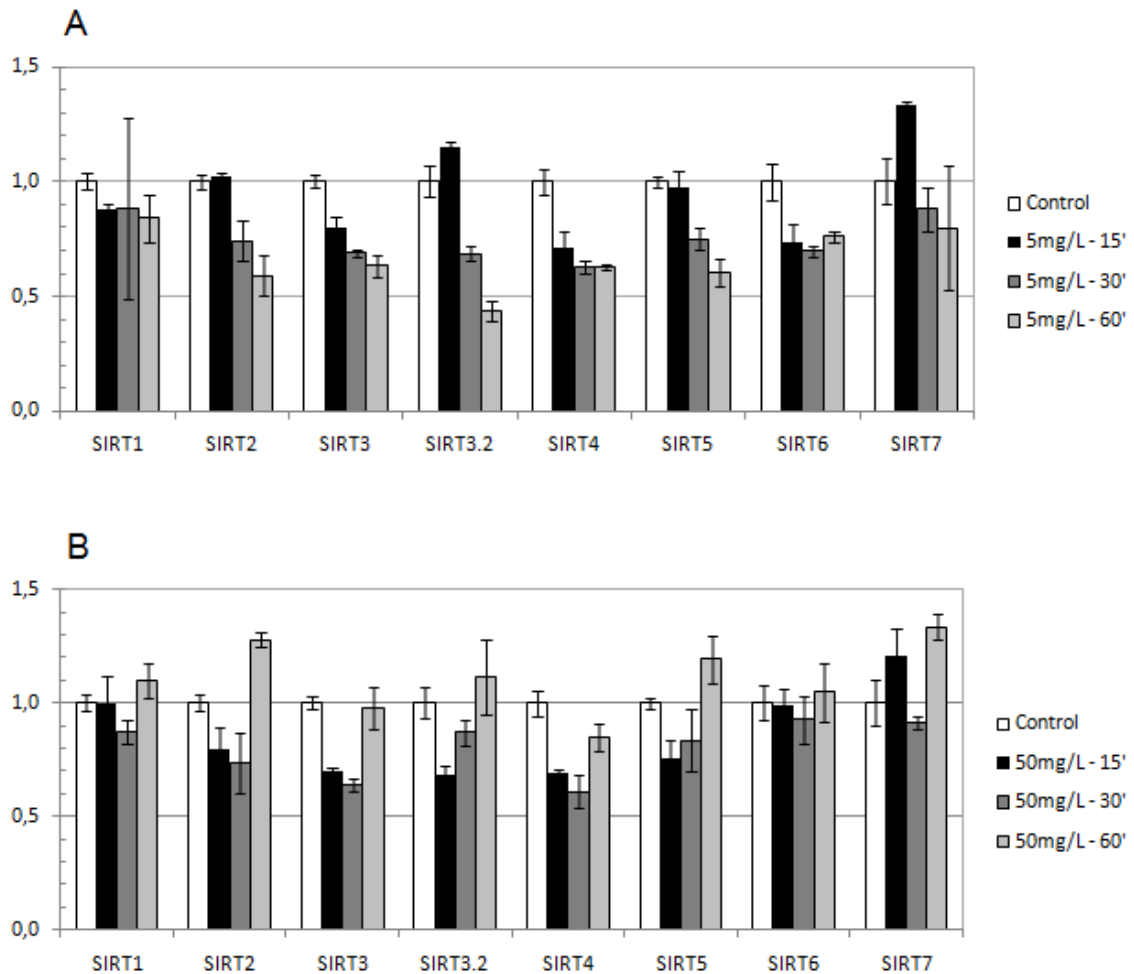


Fig. 3. Expression patterns of sirtuin family members in zebrafish after resveratrol exposure. (A) 5 mg/L and (B) 50 mg/L of resveratrol solution. The results are expressed as relative values of sirtuin: β -actin mRNA ratio (mean \pm S.E. of three independent replicate experiments).

CAPÍTULO III
CONSIDERAÇÕES FINAIS

CAPÍTULO III - CONSIDERAÇÕES FINAIS

As sirtuínas emergem como uma classe única de enzimas envolvidas em uma série de processos celulares, muitos diretamente relacionados ao envelhecimento. Este por sua vez, é acompanhado de um declínio nas funções celulares saudáveis em diferentes órgãos, levando a um aumento na incidência e mortalidade por doenças como diabetes *mellitus* tipo II, câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (HAIGIS *et al.*, 2009).

A partir da descoberta desta família de enzimas em leveduras, as sirtuínas atraíram muito interesse dos pesquisadores, que há dez anos identificaram o primeiro membro da família em mamíferos, SIRT1. Alvo de inúmeros estudos que permitiram grandes avanços no entendimento da enzimologia, regulação e atuação (HAIGIS *et al.*, 2009) das sirtuínas; esta molécula se estabelece como uma molécula chave da longevidade e processos relacionados (YAMAMOTO *et al.*, 2007).

Atualmente, a SIRT1 continua como principal membro da família das sirtuínas, enquanto pouco se conhece sobre as funções biológicas e bioquímicas dos demais membros. Pesquisadores ressaltam a necessidade de estudos sobre as demais sirtuínas, tais como, distribuição em múltiplos compartimentos celulares, localização aparentemente dinâmica e dependente do tecido e condições fisiológicas, além de atuarem em processos celulares diferentes ao da sirtuína 1.

Neste sentido, conhecer mais detalhadamente as sirtuínas é questão de tempo. Diferentes autores prevêem que as demais sirtuínas se tornarão importantes alvos de estudo, principalmente na identificação e desenvolvimento de novos substratos e moduladores (HAIGIS *et al.*, 2006), particularmente porque o papel de cada um destes membros em tecidos específicos ainda não está claro (LAVU *et al.*, 2008).

Apesar das mudanças transcricionais relacionadas ao envelhecimento não estarem limitadas apenas à regulação das sirtuínas, acumulam-se as evidências do promissor papel terapêutico das sirtuínas em enfermidades relacionadas ao processo de envelhecimento. A identificação de todas as oito sirtuínas presentes no genoma do *zebrafish*, e o padrão de expressão de cada um destes membros em nove diferentes órgãos apresentados nesta dissertação dão subsídios para auxiliar a caracterização destas enzimas.

A utilização do *zebrafish* como organismo-modelo para testes de potenciais ativadores e inibidores de sirtuínas podem ser realizados, auxiliando esclarecer mais detalhadamente a biologia deste grupo, como também a descoberta e desenvolvimento de novos e promissores fármacos relacionados às complicações do envelhecimento. De fato, a busca por estas moléculas também vem acompanhada da caracterização de doses e tempos de resposta necessários para sua correta administração, o que pode ser facilmente testado neste modelo animal, o qual apresenta uma alternativa efetiva em recursos, espaço e esforços exigidos.

As intervenções farmacológicas baseadas na regulação das sirtuínas já provaram ser efetivas, e conseqüentemente direcionam estudos para a possibilidade de desenvolver drogas com relevância terapêutica e ação mais potente e seletiva. Sob este panorama, e devido ao potencial que o sistema descrito nesta dissertação apresenta na detecção de drogas moduladoras de sirtuínas, foi realizado o depósito de patente (ANEXO III) que assegura o potencial inovador deste sistema em âmbito nacional - através do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) - e internacional, nos Estados Unidos e Europa (*U.S. Patent and Trademark Office* e *European Patent Office* respectivamente).

REFERÊNCIAS

BLANDER, G.; GUARENTE, L. The Sir2 family of protein deacetylases. Annu Rev Biochem, v.73, p.417-35. 2004.

BRACHMANN, C., SHERMAN, J.; *et al.* The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. Genes Dev, v.9, n.23, Dec, p.2888-902. 1995.

CHANG, J.; Kim, H.; *et al.* Structural basis for the NAD-dependent deacetylase mechanism of Sir2. J Biol Chem, v.277, n.37, Sep, p.34489-98. 2002.

CROLLIUS, H.; WEISSENBACH, J. Fish genomics and biology. Genome Res, v.15, n.12, Dec, p.1675-82. 2005.

DE RUIJTER, A.; VAN GENNIP, A.; *et al.* Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. Biochem J, v.370, n.Pt 3, Mar, p.737-49. 2003.

DENU, J. The Sir 2 family of protein deacetylases. Curr Opin Chem Biol, v.9, n.5, Oct, p.431-40. 2005.

DOOLEY, K.; ZON, L. Zebrafish: a model system for the study of human disease. Curr Opin Genet Dev, v.10, n.3, Jun, p.252-6. 2000.

FRYE, R. 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, v.260, n.1, Jun, p.273-9. 1999.

_____. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. Biochem Biophys Res Commun, v.273, n.2, Jul, p.793-8. 2000.

GALLINARI, P.; DI MARCO, S.; *et al.* HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. Cell Res, v.17, n.3, Mar, p.195-211. 2007.

GAN, L.; MUCKE, L. Paths of convergence: sirtuins in aging and neurodegeneration. Neuron, v.58, n.1, Apr, p.10-4. 2008.

GERHARD, G. Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research. Exp Gerontol, v.38, n.11-12, 2003 Nov-Dec, p.1333-41. 2003.

GERHARD, G.; CHENG, K. A call to fins! Zebrafish as a gerontological model. Aging Cell, v.1, n.2, Dec, p.104-11. 2002.

GREGORETTI, I.; LEE, Y.; *et al.* Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. J Mol Biol, v.338, n.1, Apr, p.17-31. 2004.

GUO, S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? Genes Brain Behav, v.3, n.2, Apr, p.63-74. 2004.

HAIGIS, M.; MOSTOSLAVSKY, R.; *et al.* SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. Cell, v.126, n.5, Sep, p.941-54. 2006.

HAIGIS, M.; SINCLAIR, D. Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. Annu Rev Pathol Mech Dis, v.5, Nov, p.253-95. 2009.

HILL, A.; TERAOKA, H.; *et al.* Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. Toxicol Sci, v.86, n.1, Jul, p.6-19. 2005.

HILDMANN, C.; RIESTER, D.; *et al.* Histone deacetylases--an important class of cellular regulators with a variety of functions. Appl Microbiol Biotechnol, v.75, n.3, Jun, p.487-97. 2007.

HOLBERT, M.; MARMORSTEIN, R. Structure and activity of enzymes that remove histone modifications. Curr Opin Struct Biol, v.15, n.6, Dec, p.673-80. 2005.

IMAI, S.; ARMSTRONG, C.; *et al.* Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. Nature, v.403, n.6771, Feb, p.795-800. 2000.

JONES, K.; ALIMOV A.; *et al.* A high throughput live transparent animal bioassay to identify non-toxic small molecules or genes that regulate vertebrate fat metabolism for obesity drug development. Nutr Metab, v.27, n.5, Aug, p.23. 2008.

KLAR, A.; SEYMOUR, F.; *et al.* *MAR1-A* regulator of the *HMa* and *HMa* locus in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 93, 37-50. 1979.

KELLER, E.; MURTHA, J. The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. Comp Biochem Physiol C 138, 335-341. 2004.

LANDRY, J.; SLAMA, J.; *et al.* Role of NAD⁽⁺⁾ in the deacetylase activity of the SIR2-like proteins. Biochem Biophys Res Commun, v.278, n.3, Nov, p.685-90. 2000.

LAVU, S.; BOSS, O.; *et al.* Sirtuins - novel therapeutic targets to treat age-associated diseases. Nat Rev Drug Discov v.7, Oct, p.841-853. 2008.

LIN, H. Nicotinamide adenine dinucleotide: beyond a redox coenzyme. Org Biomol Chem, v.5, n.16, Aug, p.2541-54. 2007.

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

MILNE, J.; DENU, J. The Sirtuin family: therapeutic targets to treat diseases of aging. Curr Opin Chem Biol, v.12, n.1, Feb, p.11-7. 2008.

MORRISON, B.; MAJDZADEH, N.; *et al.* Histone deacetylases: focus on the nervous system. Cell Mol Life Sci, v.64, n.17, Sep, p.2258-69. 2007.

OUTEIRO, T.; MARQUES, O.; *et al.* Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease. Biochim Biophys Acta, v.1782, n.6, Jun, p.363-9. 2008.

PORCU, M.; CHIARUGI, A. The emerging therapeutic potential of sirtuin-interacting drugs: from cell death to lifespan extension. Trends Pharmacol Sci, v.26, n.2, Feb, p.94-103. 2005.

POTENTE, M.; DIMMELER, S. Emerging roles of SIRT1 in vascular endothelial homeostasis. Cell Cycle, v.7, n.14, Jul, p.2117-22. 2008.

RINE, J.; HERSKOWITZ, I. Four genes responsible for a position effect on expression from *HML* and *HMR* in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, v.116, n.1, May, p.9-22. 1987.

SAUNDERS, L.; VERDIN, E. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. Oncogene, v.26, n.37, Aug, p.5489-504. 2007.

SAUVE, A.; WOLBERGER, C.; *et al.* The biochemistry of sirtuins. Annu Rev Biochem, v.75, p.435-65. 2006.

SHIN, J.; FIHMAN, C. From zebrafish to human: modular medical models. Annu Rev Genomics Hum Genet, v.3, p.311-340. 2002.

SMITH, J.; BRACHMANN, C.; *et al.* A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. Proc Natl Acad Sci USA, v.97, n.12, Jun, p.6658-63. 2000.

SPENCE, G.; LAWRENCE, C.; *et al.* The behaviour and ecology of the zebrafish (*Danio rerio*). Biological Reviews, v.83, n.1, p.13-34. 2008.

WESTPHAL, C.; DIPP, M.; *et al.* A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging? Trends Biochem Sci, v.32, n.12, Dec, p.555-60. 2007.

YAMAMOTO, H., SCHOONJANS, K.; *et al.* Sirtuin functions in health and disease. Mol Endocrinol, v.21, n.8, Aug, p.1745-55. 2007.

ZON, L.; PETERSON, R. *In vivo* drug discovery in the zebrafish. Nat Rev Drug Discov, v.4, n.1, Jan, p.35-44. 2005.

ANEXOS

ANEXO I - COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (CEUA)



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 092/08 - CEUA

Porto Alegre, 20 de novembro de 2008.

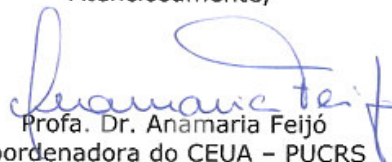
Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 08/00050, intitulado: **"Identificação molecular e análise do padrão de expressão tecidual dos genes relacionados às Sirtuínas em Zebrafish"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios do andamento do projeto devem ser entregues a este Comitê.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Anamaria Feijó
Coordenadora do CEUA - PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Maurício Reis Bogo
Faculdade de Biociências
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar sala 314- CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO II - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO

OMICS
A Journal of Integrative Biology

Edit Account | Instructions & Forms | Log Out | [Get Help Now](#)

SCHOLARONE™
Manuscripts



[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Mauricio Bogo

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *OMICS: A Journal of Integrative Biology*.

Manuscript ID:	OMI-2010-0062
Title:	Zebrafish as a Model Organism to Screen New Drugs Potentially Able to Modulate Sirtuin Expression
Authors:	Pereira, Talita Rico, Eduardo Rosemberg, Denis Schirmer, Helena Dias, Renato Souto, André Bonan, Carla Bogo, Mauricio
Date Submitted:	19-May-2010

 Print  Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.3.0(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.
[Terms and Conditions of Use](#) · [ScholarOne Privacy Policy](#) · [Get Help Now](#)

ANEXO III - COMPROVANTES DE DEPÓSITO DE PATENTE

Method and kit for determining sirtuin modulating agents, sirtuin modulating procedure, sirtuin modulating compounds and compositions including the same

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

Depósito de patente realizado a nível nacional e internacional (EUA e Europa).

Depósito de patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial-INPI (Brasil)

The screenshot shows a web browser window displaying the INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial) website. The page title is "Consulta à Base de Patentes - Detalhes da Patente". The URL in the address bar is <http://pesquisa.inpi.gov.br/MarcaPatente/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=782628&PesquisaPorTi>. The page content includes the INPI logo, navigation links, and a section titled "Depósito de pedido nacional de Patente".

» Consultar por: Base Patentes | Finalizar Sessão

Depósito de pedido nacional de Patente

(21) Nº do Pedido: **PI0806044-4 A2**

(22) Data do Depósito: 17/10/2008


(71) Nome do Depositante: União Brasileira de Educação e Assistência - Mantenedora da PUCRS (BR/RS)

(74) Nome do Procurador: Atem e Remer Asses.Consult. Prop. Int. LTDA

PUBLICAÇÕES

Nº RPI	Data RPI	Despacho	Complemento do Despacho
2016	25/08/2009	2.1	

Dados atualizados até 15/12/2009 - Nº da Revista: 2032

voltar 

Depósito de patente U.S. Patent and Trademark Office (EUA)

Doc Code: Oath

Document Description: Oath or declaration filed

PTO/SB/01 (04-09)

Approved for use through 06/30/2010. OMB 0651-0032
U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it contains a valid OMB control number.

<p align="center">DECLARATION FOR UTILITY OR DESIGN PATENT APPLICATION (37 CFR 1.63)</p> <p><input type="checkbox"/> Declaration Submitted With Initial Filing OR <input checked="" type="checkbox"/> Declaration Submitted After Initial Filing (surcharge (37 CFR 1.16(f)) required)</p>		Attorney Docket Number	048206.006
		First Named Inventor	SOUTO
<i>COMPLETE IF KNOWN</i>			
		Application Number	12/578,876
		Filing Date	10/14/2009
		Art Unit	1634
		Examiner Name	

I hereby declare that: (1) Each inventor's residence, mailing address, and citizenship are as stated below next to their name; and (2) I believe the inventor(s) named below to be the original and first inventor(s) of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought on the invention titled:

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

(Title of the Invention)

the application of which

is attached hereto

OR

was filed on (MM/DD/YYYY) 10/14/2009 as United States Application Number or PCT International Application Number 12/578,876 and was amended on (MM/DD/YYYY) _____ (if applicable).

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above identified application, including the claims, as amended by any amendment specifically referred to above.

I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in 37 CFR 1.56, including for continuation-in-part applications, material information which became available between the filing date of the prior application and the national or PCT international filing date of the continuation-in-part application.

Authorization To Permit Access To Application by Participating Offices

If checked, the undersigned hereby grants the USPTO authority to provide the European Patent Office (EPO), the Japan Patent Office (JPO), the Korean Intellectual Property Office (KIPO), the World Intellectual Property Office (WIPO), and any other intellectual property offices in which a foreign application claiming priority to the above-identified patent application is filed access to the above-identified patent application. See 37 CFR 1.14(c) and (h). This box should not be checked if the applicant does not wish the EPO, JPO, KIPO, WIPO, or other intellectual property office in which a foreign application claiming priority to the above-identified patent application is filed to have access to the above-identified patent application.

In accordance with 37 CFR 1.14(h)(3), access will be provided to a copy of the above-identified patent application with respect to: 1) the above-identified patent application-as-filed; 2) any foreign application to which the above-identified patent application claims priority under 35 U.S.C. 119(a)-(d) if a copy of the foreign application that satisfies the certified copy requirement of 37 CFR 1.55 has been filed in the above-identified patent application; and 3) any U.S. application-as-filed from which benefit is sought in the above-identified patent application.

In accordance with 37 CFR 1.14(c), access may be provided to information concerning the date of filing the Authorization to Permit Access to Application by Participating Offices.

Depósito de patente *European Patent Office* (Alemanha)



European Patent Office
80298 MUNICH
GERMANY
Tel. +49 (0)89 2399 - 0
Fax +49 (0)89 2399 - 4465



Reis Bogo, Mauricio
Rua Reis Louzada 245/701
90630-130 Bairro-Petropolis
BRESIL

For any questions about
this communication:
Tel. +31 (0)70 340 45 00

Date
07.12.09

Reference	Application No./Patent No. 09173271.9 - 2402
Applicant/Proprietor União Brasileira De Educação E Assistência - Mantenedora Da Pucrs	

Designation as inventor - communication under Rule 19(3) EPC

You have been designated as inventor in the above-mentioned European patent application. Below you will find the data contained in the designation of inventor and further data mentioned in Rule 143(1) EPC:

DATE OF FILING : 16.10.09
PRIORITY : BR/17.10.08/ BRA 08060444
TITLE : Method and kit for determining sirtuin modulating agents, sirtuin modulating procedure, sirtuin modulating compounds and compositions including the same
DESIGNATED 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

INVENTOR (PUBLISHED = 1, NOT PUBLISHED = 0):

1/Reis Bogo, Mauricio/Rua Reis Louzada 245/701/90630-130 Bairro-Petropolis/BR
1/Arigony Souto, Andre/Eca de Queiros 901/402 Bairro Petropolis/90670-020 Porto Alegre RS/BR
1/Bonan, Carla Denise/Rua Carlos Silveira Martins Pacheco 55 Apto. 803-D Bairro Cristo Redentor/91350-300 Porto Alegre RS/BR
1/Carneiro Brandao Pereira, Talita/Eca de Queiros 901/402 Bairro Petropolis/90670-020 Porto Alegre RS/BR
1/Schirmer, Helena/Rua Pio XI 97/93700-000 Campo Born RS/BR
1/Pacheco Rico, Eduardo/c/o Uniao Brasileira de educacao e assistencia Mantenedora da Pucrs av. Ipiranga 6681 Predio 96C Sala 119 Partenon/90619-900 Porto Alegre RS/BR
1/Broock Rosenberg, Denis/c/o Uniao Brasileira de Educacao e assistencia Mantenedora da Pucrs av. Ipiranga 6681 Predio 96C Sala 119 Partenon/90619-900 Porto Alegre RS/BR

DECLARATION UNDER ARTICLE 81 EPC:

The applicant(s) has (have) acquired the right to the European patent as employer(s).



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar - CEP 90619-900
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3513 - Fax: (51) 3320-3515
E-mail: prppg@pucrs.br
Site: www.pucrs.br