

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PATRÍCIA FERREIRA BOASQUIVIS

**O EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE GUARANÁ (*PAULLINIA CUPANA*)
ATENUA FENÓTIPOS PATOLÓGICOS ASSOCIADOS AO MAL DE
ALZHEIMER E À DOENÇA DE HUNTINGTON NO ORGANISMO MODELO
*CAENORHABDITIS ELEGANS***

OURO PRETO
FEVEREIRO, 2015

PATRÍCIA FERREIRA BOASQUIVIS

**O EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE GUARANÁ (*PAULLINIA CUPANA*)
ATENUA FENÓTIPOS PATOLÓGICOS ASSOCIADOS AO MAL DE
ALZHEIMER E À DOENÇA DE HUNTINGTON NO ORGANISMO MODELO
*CAENORHABDITIS ELEGANS***

ORIENTADORA: Profa. Dra. Riva de Paula Oliveira

*Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia do Núcleo de
Pesquisas em Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Ouro
Preto, como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.*

B630e

Boasquivis, Patrícia Ferreira.

O extrato hidroalcoólico de guaraná (*paullinia cupana*) atenua fenótipos patológicos associados ao mal de alzheimer e a doença de huntington no organismo modelo *caenorhabditis elegans* [manuscrito] / Patrícia Ferreira Boasquivis. - 2015.

xiv, 105f.: il.: color; graf; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Riva de Paula Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Programa de Pós Graduação em Biotecnologia.

1. Doenças hereditárias. 2. Homeostase. 3. *Caenorhabditis elegans*. 4. Alzheimer, Doença de. I. Oliveira, Riva de Paula. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.894:606

Catálogo: www.sisbin.ufop.br

Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

“O Extrato Hidroalcoólico de Guaraná (EHG) atenua fenótipos patológicos em modelos transgênicos *Ceanorhabditis elegans* para o Mal de Alzheimer e a Doença de Huntington”

Aos seis dias do mês de março de 2015, às 08h00min, no Auditório do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Patrícia Ferreira Boasquivis**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

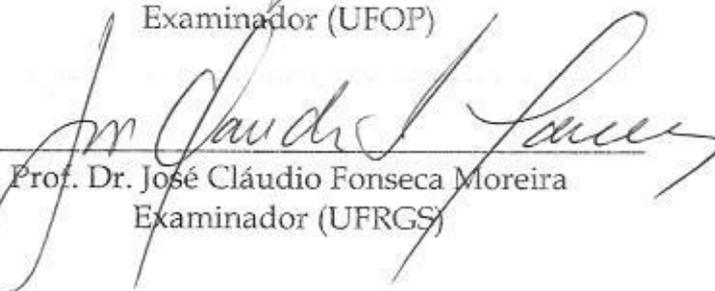
Membros da Banca Examinadora:



Prof. Dra. Riva de Paula Oliveira
Orientadora



Prof. Dr. Leandro Márcio Moreira
Examinador (UFOP)



Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira
Examinador (UFRGS)

DATA DA DEFESA: 06/03/2015

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

NUPEB - ICEB II - sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto

Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil

Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: biotec@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/biotec

Se enxerguei mais longe foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes.

- Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Riva de Paula Oliveira, pela oportunidade do retorno para o desenvolvimento do mestrado, e pela oportunidade de iniciar um projeto em uma nova área. Agradeço pela confiança e por tudo que me ensinou durante estes 6 anos de iniciação científica e mestrado! Muito obrigada!

Aos professores Maykon Passos Cristiano e Patrícia Moreira, que permitiram e apoiaram a finalização do projeto em seu laboratório. Obrigada pela compreensão!

Aos professores Silvana de Queiroz Silva, Luís Carlos Crocco Afonso, Maria Lúcia Pedrosa e Renata Guerra de Sá Cota, pelo auxílio e concessão do uso de seus laboratórios, equipamentos e reagentes.

À Professora Cecília Nunez pela parceria no desenvolvimento das análises de HPLC.

Ao Laboratório Multiusuários do NUPEB, bem como aos seus professores, funcionários e técnicos.

À CAPES pelo auxílio financeiro e à Universidade Federal de Ouro Preto pelo ensino público de qualidade.

À eterna equipe do Laboratório de Genética: Franciny, Igor, Washington, Larissa, Daniela, Isabella, Wagney, Renata e Alvaro, por toda a ajuda, todos os ensinamentos, e pela grande amizade, meu muito obrigado!

Aos alunos de iniciação científica Renata Cristina e Isabella Gomes, pelos auxílios no desenvolvimento dos experimentos.

Ao Lucas, pela compreensão e pelo apoio durante o mestrado.

À minha família e amigos, pelo apoio e incentivo.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Abreviaturas	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO	1
1.1 Doenças Neurodegenerativas.....	2
1.2 Mal de Alzheimer	7
1.3 Doença de Huntington	10
1.4 Modelos <i>C. elegans</i> para o estudo de Doenças Neurodegenerativas	12
1.4.1 Modelos <i>C. elegans</i> para o Mal de Alzheimer.....	16
1.4.2 Modelos <i>C. elegans</i> para a Doença de Huntington	20
1.4.3 Uso de modelos <i>C. elegans</i> na pesquisa de potenciais drogas terapêuticas para o Mal de Alzheimer e a Doença de Huntington	23
1.5 Guaraná.....	27
OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos Específicos	32
MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 O Extrato Hidroalcoólico de Guaraná (EHG).....	34
3.1.1 Obtenção do extrato de Guaraná em Pó.....	34
3.1.2 Preparo do Extrato Hidroalcoólico de Guaraná (EHG).....	34
3.1.3 Obtenção do Guaraná utilizado nos experimentos	34
3.2 Caracterização do Extrato Hidroalcoólico de Guaraná	35
3.2.1 Caracterização fitoquímica por HPLC	35
3.2.2 Caracterização da atividade antioxidante do EHG in vitro pelo método de neutralização do radical DPPH	35
3.3 Cepas de <i>Caenorhabditis elegans</i>	37
3.4 Crescimento, Manutenção e Sincronização cronológica dos animais	37
3.5 Avaliação do desenvolvimento dos animais pela medida do comprimento corporal.....	39
3.6 Análise de organelas relacionadas ao lisossomo (LRO) coradas pelo corante Vermelho Nilo.....	39
3.7 Ensaios de paralisia induzida pelo peptídeo β -amiloide humano.....	40

3.8	Quantificação da agregação poliglutâmica	40
3.9	Ensaio de sobrevivência neuronal	41
3.10	Ensaio de crescimento bacteriano	41
3.11	Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) intracelular	42
3.12	Quantificação da atividade do proteassoma	42
3.13	Ensaio de resistência ao estresse térmico	44
3.14	Análise de genes repórteres	44
3.15	Análise da expressão gênica	45
3.16	Análise Estatística	49
	RESULTADOS	50
4.1	Caracterização do Extrato Hidroalcoólico de Guaraná (EHG)	51
4.1.1	Caracterização fitoquímica por HPLC	51
4.1.2	O EHG possui atividade antioxidante <i>in vitro</i>	51
4.2	O EHG não interfere no desenvolvimento dos animais	54
4.3	O EHG diminui o acúmulo do corante Vermelho Nilo nos animais	54
4.4	O EHG atenua a paralisia induzida pela toxicidade do peptídeo β -amilóide humano em modelos <i>C. elegans</i> para o Mal de Alzheimer	57
4.5	O EHG diminui a agregação de proteínas poliglutâmicas em modelo <i>C. elegans</i> para a Doença de Huntington	59
4.6	O EHG atenua a degeneração neuronal em um modelo <i>C. elegans</i> para a Doença de Huntington	60
4.7	O EHG não age através de efeitos bacteriostáticos ou bactericidas	62
4.8	O EHG altera o estado REDOX do organismo	65
4.8.1	O EHG diminui os níveis ERO em condições normais e de estresse oxidativo induzido	65
4.8.2	O EHG diminui os níveis de ERO em animais que expressam o peptídeo β -amilóide	67
4.8.3	O EHG diminui a expressão de GST-4 sob condições de estresse	67
4.8.4	O EHG aumenta a expressão da proteína SOD-3 em condições normais	69
4.9	O EHG interfere na homeostase proteica	72
4.9.1	O EHG aumenta a resistência do organismo ao estresse térmico	72
4.9.2	O EHG não altera a transcrição do peptídeo β -amilóide	74
4.9.3	O EHG aumenta a expressão da chaperonina HSP-16 sob condições normais e de estresse térmico	74
4.9.4	O EHG aumenta a atividade do Proteassoma	76
	DISCUSSÃO	79
	CONCLUSÕES	90
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

Lista de Figuras

Figura 1	Mecanismos envolvidos na homeostase proteica	8
Figura 2	Teoria da Cascata Amilóide	11
Figura 3	Potenciais alvos terapêuticos na busca de tratamentos para a Doença de Huntington	13
Figura 4	Ciclo de vida do <i>Caenorhabditis elegans</i> a 22°C	14
Figura 5	Padrão de expressão do peptídeo β A nos principais modelos transgênicos <i>C. elegans</i> utilizados para o estudo do Mal de Alzheimer	17
Figura 6	Modelos <i>C. elegans</i> para doenças poliglutamínicas	22
Figura 7	Comparação da inibição do radical DPPH pelo EHG nas concentrações de 5, 10 e 50 mg/mL e pelo padrão Trolox.	53
Figura 8	Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre o desenvolvimento dos animais	55
Figura 9	Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre os níveis de organelas relacionadas ao lisossomo coradas pelo corante vermelho Nilo em animais tipo selvagem (N2)	56
Figura 10	Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre o fenótipo de paralisia induzido pela toxicidade do peptídeo β - amiloide humano	58
Figura 11	Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre o a formação de agregados poliglutamínicos na cepa <i>unc-54p::Q40::YFP</i>	61
Figura 12	Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre a degeneração do neurônio ASH na cepa HA759	63
Figura 13	Efeito do EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre o crescimento da bactéria <i>Escherichia coli</i> OP50, utilizada como alimento dos vermes	64
Figura 14	Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre os níveis de espécies reativas de	

	oxigênio (ERO) de animais tipo selvagem submetidos às condições normais e de estresse oxidativo	66
Figura 15	Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) em animais da cepa CL2006	68
Figura 16	Efeito do EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre a expressão da enzima antioxidante GST-4 em condições normais e de estresse oxidativo	70
Figura 17	Efeito do EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre a expressão da enzima antioxidante SOD-3 em condições normais e de estresse oxidativo	71
Figura 18	Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre a resistência ao estresse térmico	73
Figura 19	Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre os níveis do mRNA do peptídeo β -amilóide nos modelos CL4176	75
Figura 20	Efeito do EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre a expressão da chaperonina HSP-16.2 em condições normais e de estresse térmico	77
Figura 21	Efeito do EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre a atividade do proteassoma	78
Figura 22	Possível mecanismo de ação antioxidante e neuroprotetor do EHG nos modelos <i>C. elegans</i> para o Mal de Alzheimer e a Doença de Huntington	89

Lista de Tabelas

Tabela 1	Características técnicas do método cromatográfico aplicado para quantificação de Cafeína, Teobromina, Catequina e Epicatequina no EHG	36
Tabela 2	Cepas <i>C. elegans</i> utilizadas neste trabalho	38
Tabela 3	Concentração de compostos fitoquímicos no Extrato Hidroalcoólico de Guaraná (EHG) determinada por HPLC	52

Lista de Abreviaturas

AIP-1	<i>Arsenite inducible protein</i>
APP	Proteína Precursora do Amilóide
ATP	Trifosfato de adenosina
BCA	Ácido Bicinconínico
bZIP	Zíper de leucina
β A	Peptídeo β -amilóide
CAT	Catalase
cDNA	DNA complementar
CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i>
DAF-2	Receptor Tirosina Quinase. “ <i>Abnormal DAuer Formation</i> ”
DAF-16	Fator de transcrição. “ <i>Abnormal DAuer Formation</i> ”
DH	Doença de Huntington
DNA	Àcido Desoxiribonucleico
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
E1	Enzima ativadora de Ubiquitina
E2	Enzima conjugadora de Ubiquitina
E3	Ubiquitina Ligase
EHG	Extrato Hidroalcoólico de Guaraná
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FudR	5-fluoro-2'-deoxiuridina
FoxO	Fator de Transcrição. <i>Forkhead Box O</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
GST	Glutathiona S-Transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
HSF	<i>Heat Shock Factor</i>
IIS	Via de sinalização da insulina
LRO	Organelas relacionadas ao lisossomo
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
MA	Mal de Alzheimer

MAO	Monoamina Oxidase
mRNA	RNA mensageiro
Nrf2	<i>Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PoliQ	Poliglutamina
PSEN 1	Presenilina 1
PSEN 2	Presenilina 2
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
Q150	Fragmento da Proteína Huntingtina com 150 repetições glutamínicas
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em transcriptase reversa
SKN-1	Fator de Transcrição <i>SKINhead</i>
SOD	Superóxido Dismutase
SMG-1	<i>Suppressor with Morphological effect on Genitalia</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
t-BOOH	tert-butilhidroperóxido
3'-UTR	<i>Untranslated Region 3'</i>
YFP	Proteína amarela fluorescente

RESUMO

O Guaranazeiro (*Paullinia cupana*) é uma planta nativa das regiões amazônicas rica em fitoquímicos, como polifenóis e metilxantinas. O extrato de guaraná, obtido das sementes do Guaranazeiro, é largamente consumido no Brasil na forma de bebidas, como refrigerantes e energéticos, e como suplemento alimentar. Estudos anteriores demonstraram que o extrato de guaraná possui propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-obesogênicas, antimutagênicas e anticarcinogênicas. Quanto ao Sistema Nervoso Central (SNC), foram relatadas propriedades estimulantes, bem como efeitos protetores em modelo *in vitro* para a Doença de Parkinson e capacidade de inibir a agregação do peptídeo β -amilóide (β A), proteína associada ao Mal de Alzheimer. Entretanto, estudos sobre as propriedades biológicas do guaraná e seus efeitos sobre o SNC em modelos *in vivo* são limitados e não foram bem explorados. Neste estudo, o nematóide *Caenorhabditis elegans* foi utilizado para testar as atividades antioxidantes e os efeitos protetores do Extrato Hidroalcoólico de Guaraná (EHG) em modelos transgênicos para o Mal de Alzheimer e a Doença de Huntington. Os resultados demonstram que o EHG produzido possui propriedades antioxidantes *in vitro*, evidenciadas por sua capacidade de neutralizar o radical DPPH em 54,37%, 49,36% e 48,30% para as concentrações de 5, 10 e 50 mg/mL, respectivamente. Ainda, o EHG também demonstrou capacidade antioxidante *in vivo*, uma vez que reduziu os níveis de ERO em animais tipo selvagem sob condições normais e de estresse oxidativo. O EHG nas concentrações encolhidas para os ensaios *in vivo* (10 mg/mL e 50 mg/mL) não foi tóxico para os vermes, uma vez que não interferiu no seu desenvolvimento, avaliado pela medida do tamanho corporal. Ao contrário, o tratamento com EHG diminuiu o acúmulo de pigmentos associados ao envelhecimento observados através do corante vermelho Nilo. O tratamento com o EHG foi capaz de atenuar o fenótipo de paralisia induzido pela toxicidade do peptídeo β A em dois modelos *C. elegans* para o Mal de Alzheimer. Quanto aos modelos *C. elegans* para a Doença de Huntington, o EHG foi capaz de reduzir a agregação de proteínas poliglutamínicas (PoliQ40) expressas no tecido muscular dos vermes, bem como reduzir a neurotoxicidade da proteína Huntingtina (Q150). Para testar se os efeitos benéficos do EHG estavam associados a uma diminuição da patogenicidade da bactéria *Escherichia coli* utilizada como alimento para os vermes, os efeitos do EHG sobre o crescimento bacteriano foram testados, sendo que nenhum efeito bactericida ou bacteriostático foi observado. Os resultados obtidos sugerem que o EHG age através de efeitos antioxidantes, uma vez que foi capaz de reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) em animais expressando o peptídeo β A, além de ativar a expressão da enzima superóxido dismutase (SOD-3), uma enzima antioxidante. O EHG não foi capaz de diminuir a expressão do mRNA para β A, porém foi capaz de ativar a expressão da chaperonina HSP-16, aumentar a atividade do proteassoma e proteger o modelo contra o estresse térmico, um conhecido indutor de dano proteico, sugerindo uma atividade sobre a homeostase proteica. Os resultados obtidos até o momento demonstram que o EHG possui propriedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo*, modula a homeostase proteica e que seu consumo pode ser benéfico no tratamento de doenças neurodegenerativas como o Mal de Alzheimer e a Doença de Huntington.

ABSTRACT

Paullinia cupana, or guaranázeiro, is a native plant from the Amazon region rich in phytochemicals such as polyphenols and methylxanthines. The guaraná extract, obtained from guaranázeiro's seeds, is widely consumed as beverages, such as soft and energy drinks, and as food supplement. Previous investigations have described properties such as antioxidant, antimicrobial, anti-obesogenic, antimutagenic and anticarcinogenic for guaraná. Regarding the central nervous system (CNS), stimulant properties have been described, as well as protective effects in an *in vitro* model for Parkinson's Disease and a capability to inhibit amyloid- β (A β) peptide aggregation *in vitro*. However, studies about the biological properties of guaraná are limited and the effects of guaraná over the CNS are not well explored. In this study, we used *Caenorhabditis elegans* as a model to test both the antioxidant and the protective properties of guaraná hydro-alcoholic extract (GHE) in wild-type and transgenic animals for Alzheimer (AD) and Huntington (HD) diseases. Our results demonstrate that GHE has *in vitro* antioxidant activity, shown by its capacity in neutralize the DPPH radical by 54,37%, 49,36% e 48,30% for the concentrations of 5, 10 e 50 mg/mL, respectively. Also, GHE demonstrated an *in vivo* antioxidant property, since it reduced ROS levels in wild type animals under standart and stress conditions. GHE treatment is not toxic since it did not interfere with the animals' development assessed by the body length. GHE treatment also reduced the level of fluorescent pigments associated to aging indicated by the red Nile staining. GHE attenuated the pathological phenotypes of paralysis induced by A β in two *C. elegans* AD models. Concerning *C. elegans* models for Huntington Disease, GHE reduced the aggregation of polyglutamine proteins (PoliQ40) in the muscle of the animals, as well as reduced Huntingtin protein's neurotoxicity. Our findings suggest that GHE's beneficial effects might be due its antioxidant properties, since it was able to reduce reactive oxygen species' (ROS) production in animals expressing A β and activate the expression of superoxide dismutase (SOD-3), an antioxidant enzyme. GHE treatment did not reduced the expression of A β mRNA; however it activated the expression of the heat shock protein HSP-16, a chaperonine, increased the proteasome activity and boosted animals' thermal stress resistance, which suggests that GHE can interfere with protein homeostasis. Our results so far show guaraná has antioxidant properties *in vitro* and *in vivo*, modulates protein homeostasis and suggests that GHE consumption might be advantageous in the treatment of Alzheimer and Huntington diseases.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Neurodegenerativas

Doenças neurodegenerativas são condições crônicas caracterizadas pela morte progressiva de neurônios, que resulta em uma disfunção do sistema nervoso central. Estima-se que existam mais de 600 desordens neurodegenerativas, um amplo grupo que possui manifestações clínicas e patológicas variadas e um difícil diagnóstico, muitas vezes realizado apenas *post-mortem* (BROWN, LOCKWOOD e SONAWANE, 2005; PRZEDBORSKI, VILA e JACKSON-LEWIS, 2003). São exemplos de doenças neurodegenerativas o Mal de Alzheimer (MA), a Doença de Parkinson (DP), a Doença de Huntington (DH) e a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) (PRZEDBORSKI, VILA e JACKSON-LEWIS, 2003).

Ainda que bastante heterogêneas, as doenças neurodegenerativas possuem algumas características em comum, como, por exemplo, a associação com o envelhecimento. Acredita-se que o fator de risco mais consistente para o Mal de Alzheimer e a Doença de Parkinson seja o avançar da idade (PRZEDBORSKI, VILA e JACKSON-LEWIS, 2003). Dessa forma, é cabível antecipar que a melhoria das condições de vida e o aumento da expectativa de vida, especialmente em países em desenvolvimento, possa levar a um aumento na prevalência dessas doenças. Ferri et al (2005), estimaram a existência de cerca de 24 milhões de pessoas acometidas por demências, entre elas, o Alzheimer, e afirmaram que, mantendo-se as condições de desenvolvimento humano aliadas à falta de tratamento e cura para essas doenças, essa prevalência poderia dobrar a cada 20 anos, atingindo 81 milhões de pessoas em 2040.

O envelhecimento é um processo influenciado majoritariamente por fatores ambientais, mas que também possui fatores genéticos envolvidos em sua variabilidade. Teoricamente, este processo deriva-se do acúmulo gradual de falhas e danos nas células, influenciado tanto pelo estresse oxidativo e metabólico aos quais as células são expostas, de maneira cumulativa, quanto pelo declínio dos mecanismos celulares de defesa contra estes estresses (MATTSON, CHAN, e DUAN, 2002; KIRKWOOD, 2003). De acordo com Mattson, Chan e Duan (2002), todas as macromoléculas celulares (proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos) sofrem alguma modificação oxidativa durante o envelhecimento do cérebro. Entretanto, invariavelmente, essas modificações encontram-se exacerbadas em indivíduos portadores de doenças

neurodegenerativas, permitindo relacionar o estresse oxidativo, comum ao envelhecimento, à patogênese destas doenças.

1.1.1 Doenças Neurodegenerativas e Estresse Oxidativo

As Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) são moléculas altamente reativas que participam em processos biológicos, tais como respiração celular, neurotransmissão e processos inflamatórios (UTTARA, 2009). Em condições de homeostase fisiológica, as concentrações de ERO ou ERN são determinadas pela taxa de produção das espécies reativas e pela taxa de eliminação destas moléculas por ação de sistemas antioxidantes. Um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes pode levar ao acúmulo de espécies reativas, causando estados de estresse oxidativo (KELSEY, WILKINS e LINSEMAN, et al, 2010; UTTARA, 2009). Os efeitos deletérios e acumulativos de espécies reativas sobre a integridade celular podem eventualmente conduzir ou participar no desenvolvimento de doenças ou processos patológicos tais como a aterosclerose, câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, processos inflamatórios crônicos, além de várias doenças neurodegenerativas em humanos e animais (FINKEL e HOLBROOK, 2000). Embora o estresse oxidativo não seja a causa direta ou o agente etiológico responsável pelas neuropatologias, sabe-se que ele participa da cascata de eventos patológicos por trás destas doenças (MARKESBERRY, MONTINE e LOVELL, 2001).

As espécies reativas são formadas no cérebro principalmente pelo transporte de elétrons na cadeia respiratória, que culmina na produção de ATP. Assim, devido à sua elevada taxa de atividade metabólica, acredita-se que o cérebro seja particularmente vulnerável ao estresse oxidativo (ROSSI et al., 2008; MARKESBERRY, MONTINE e LOVELL, 2001). Além desta fonte, os radicais livres nos neurônios podem ser formados durante o processo de excitotoxicidade, que é mediado pelo cálcio e o neurotransmissor glutamato, e durante o processo de desaminação oxidativa de catecolaminas, mediado pela enzima monoamina oxidase (MAO), dentre outros. Metais, como o cobre e ferro, também tem participação na geração de ERO: o ferro, por exemplo, catalisa reações de oxidação, e seus níveis encontram-se geralmente aumentados em

portadores de doenças neurodegenerativas. Por fim, evidências demonstram que as próprias proteínas tóxicas, envolvidas na patogênese das doenças neurodegenerativas, podem gerar mais espécies reativas, exacerbando a patologia (MARKESBERY, MONTINE e LOVELL, 2001).

Essencialmente todos os organismos vivos possuem uma variedade de moléculas e mecanismos que previnem ou reduzem os danos causados por ERO. A ativação do sistema endógeno de defesa que metaboliza e elimina xenobioticos tóxicos pode proteger o corpo humano dos radicais livres e retardar o progresso de muitas doenças (SPORN e LIBY, et al 2005). As proteínas de detoxificação envolvidas neste processo são classificadas em Fase I e Fase II. A citocromo P450 monooxigenase é a principal enzima envolvida na fase inicial (Fase I) do metabolismo xenobiótico. Uma rede de enzimas detoxificadoras e antioxidantes, tais como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione transferase fazem parte da Fase II. A ativação transcricional das enzimas da Fase II é mediada pelo elemento cis-atuante denominado ARE (Antioxidant Response Element) que é reconhecido pelo fator de transcrição do tipo zíper de leucina básico (bZIP) Nrf (Nrf1 e Nrf2) (ITOH et al., 1997).

Além destes sistemas antioxidantes endógenos, os seres vivos também utilizam um sistema exógeno, composto principalmente pelos antioxidantes obtidos na dieta, para sua proteção (CERQUEIRA et al, 2007). Estas substâncias podem agir diretamente, removendo radicais livres por serem capazes de se ligar aos mesmos, devido às suas propriedades estruturais; ou indiretamente, ativando diversas vias de sinalização. Dentre os antioxidantes indiretos, já foi demonstrado que vários compostos fitoquímicos são potentes indutores de Nrf2 e das enzimas de detoxificação da Fase II e aumentam a capacidade antioxidante da célula (OSBURN e KENSLER, 2008). Esta ativação aumenta a proteção contra processos inflamatórios, estresse oxidativo e desenvolvimento de tumores (DINKOVA-KOSTOVA et al., 2005; SPORN e LIBY et al., 2005).

1.1.2 Doenças Neurodegenerativas e o Turnover Proteico

Outra característica comum entre as doenças neurodegenerativas é a ocorrência de mal enovelamento, agregação e/ou acúmulo de algum tipo ou grupo específico de proteína. A síntese, o enovelamento e a degradação de

proteínas (*turnover* proteico) é um mecanismo dinâmico, necessário para processos celulares como o transporte de moléculas e o controle do ciclo celular, por exemplo. Assim, é fácil inferir que alterações no enovelamento ou na degradação de proteínas possa prejudicar tais processos, gerando proteínas com atividade anormal e levando a disfunções biológicas e ao surgimento de patologias (STEFANI e DOBSON, 2003). Além disso, as proteínas mal enoveladas e não degradadas acabam se acumulando nas células, formando agregados insolúveis e tóxicos (BRETTSCHEIDER et al, 2015). Já foram demonstradas evidências da presença de agregados proteicos anormais nas áreas do cérebro mais atingidas pelas doenças neurodegenerativas (SOTO, 2003), bem como foi observado que mutações nos genes das proteínas potencialmente tóxicas geram formas herdadas das doenças, com início geralmente precoce (BUXBAUM e TAGOE, 2000). Organismos modelos expressando proteínas tóxicas geralmente exibem algum tipo de sintoma ou desenvolvem algum tipo de patologia, e, ainda, agregados proteicos induzem apoptose *in vitro* (PRICE et al, 2000; BUCCIANTINI et al, 2002). Sabe-se que a deposição de proteínas na forma de fibras ou placas são características comuns de mais de 20 condições neurodegenerativas, entre elas o Alzheimer e a Doença de Parkinson (STEFANI e DOBSON, 2003).

Anteriormente, a toxicidade das proteínas nas doenças neurodegenerativas era associada diretamente aos seus agregados. Entretanto, evidências que demonstram que a formação de placas e agregados não é característica apenas das proteínas mutadas, mas sim de qualquer cadeia polipeptídica, associadas às observações de que os agregados são menos tóxicos que os oligômeros que antecipam sua formação sugerem que as doenças neurodegenerativas estão, na verdade, associadas à estágios pré-fibrilares de interação proteica. A toxicidade destes oligômeros parece estar associada à sua habilidade de interferir em processos celulares fundamentais, gerando estresse oxidativo e aumentando o cálcio livre, o que pode levar à morte neuronal por apoptose ou necrose (STEFANI e DOBSON, 2003). Ressalta-se, aqui, que o estresse oxidativo parece ser tanto causa como consequência da modificação de proteínas no contexto das doenças neurodegenerativas.

As células possuem vários sistemas que auxiliam no adequado funcionamento do *turnover* proteico. Estes sistemas de “controle de qualidade

proteica” ajudam a reparar ou eliminar proteínas mal formadas ou danificadas, e consistem em um arsenal de chaperonas moleculares e sistemas proteolíticos (Figura 1) (BUCHBERGER, BUKAU e SOMMER, 2010).

O correto enovelamento de proteínas é auxiliado pela atividade das proteínas da família das chaperonas. Estas proteínas estão envolvidas na homeostase proteica por medirem o enovelamento correto de proteínas e o desenovelamento daquelas mal formadas – em um mecanismo de reparo proteico, além de prevenirem a agregação. Quando os danos às proteínas as tornam “irreparáveis”, as chaperonas ainda auxiliam no seu encaminhamento aos sistemas de degradação (SU e WANG, 2010; BUCHBERGER, BUKAU e SOMMER, 2010).

A degradação de proteínas, tanto as nativas quanto as danificadas, é realizada por vários grupos de proteases, que se organizam em dois sistemas principais: o sistema ubiquitina-proteassoma e o sistema lisossomal autofágico. A degradação via sistema ubiquitina-proteassoma envolve duas etapas: a marcação das proteínas e sua posterior degradação. No primeiro passo, a proteína a ser degradada é “marcada” por moléculas de ubiquitina, processo que ocorre em 3 fases e é mediado pelas enzimas ativadora de ubiquitina (E1), conjugadora (E2) e ubiquitina ligase (E3) (SU e WANG, 2010). Na primeira fase, as enzimas do grupo E1 ativam o peptídeo ubiquitina através de uma reação que requer energia na forma de ATP. A ubiquitina é transferida para a proteína conjugadora E2, formando um intermediário E2-ubiquitina. Ao mesmo tempo, as enzimas do grupo E3 se ligam às proteínas que devem ser degradadas, e, em uma terceira fase, o intermediário E2-ubiquitina transfere a molécula de ubiquitina para a proteína alvo, em um processo mediado pelas enzimas E3. Esse processo ocorre em vários ciclos, permitindo a formação de uma cadeia poliubiquitina. Essa cadeia é reconhecida pelo proteassoma 26S, complexo catalítico que degrada proteínas poliubiquitinadas em pequenos peptídeos (GLICKMAN e CIECHANOVER, 2002).

No sistema lisossomal autofágico, a degradação de proteínas é mediada por hidrolases contidas no interior dos lisossomos (SU e WANG, 2010). Existem 3 tipos de autofagia, caracterizadas pela forma que a proteína a ser degradada chega ao lúmen do lisossomo: a macroautofagia, a microautofagia e a autofagia mediada por chaperonas (MATTSON, CHAN, e DUAN, 2002; KIRKWOOD,

2003). Na macroautofagia, observa-se a formação dos autofagossomos, uma organela especializada que envolve a proteína ou substrato a ser degradado e que se funde posteriormente ao lisossomo, formando o autofagolisossomo, onde a proteína será degradada por hidrolases lisossomais (SU e WANG, 2010; ESKELINEN e SAFTIG, 2009). Na microautofagia, a proteína a ser degradada é assimilada pela própria membrana do lisossomo, sem a necessidade de formação dos autofagossomos intermediários. Por último, na autofagia mediada por chaperonas, os substratos devem conter uma sequência comum relacionada ao pentapeptídeo KFERQ, que é reconhecida pelas chaperonas, permitindo a formação de um complexo substrato-chaperona. Esse complexo é reconhecido pelo lisossomo, permitindo a internalização do substrato através de um receptor, sem a necessidade de formação de autofagossomos ou a deformação da membrana do lisossomo (MARTINEZ-VICENTE, SOVAK e CUERVO, 2005).

Durante o envelhecimento, além do aumento dos danos às proteínas por oxidação, mutação ou erros traducionais, observa-se o declínio da eficiência dos sistemas acima citados (HAIGIS e YANKNER, 2010). Ainda, o próprio acúmulo de agregados proteicos sobrecarrega os sistemas de controle de qualidade proteica, culminando no aumento da agregação (BUCHBERGER, BUKAU e SOMMER, 2010). De fato, a deficiência na função dos sistemas de controle de qualidade proteica contribui para a patogênese de doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento, como o Alzheimer e a Doença de Huntington (HAIGIS e YANKNER, 2010).

1.2 Mal de Alzheimer

O Mal de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa crônica, na maioria dos casos senil, cujos sintomas aparecem geralmente após os 65 anos de idade, ainda que existam casos precoces associados à hereditariedade e a mutações principalmente nos genes da Proteína Precursora do Amilóide (APP) e das Presenilinas 1 e 2 (PSEN1 e PSEN2) (PAULA et al, 2009; REVETT et al, 2012).

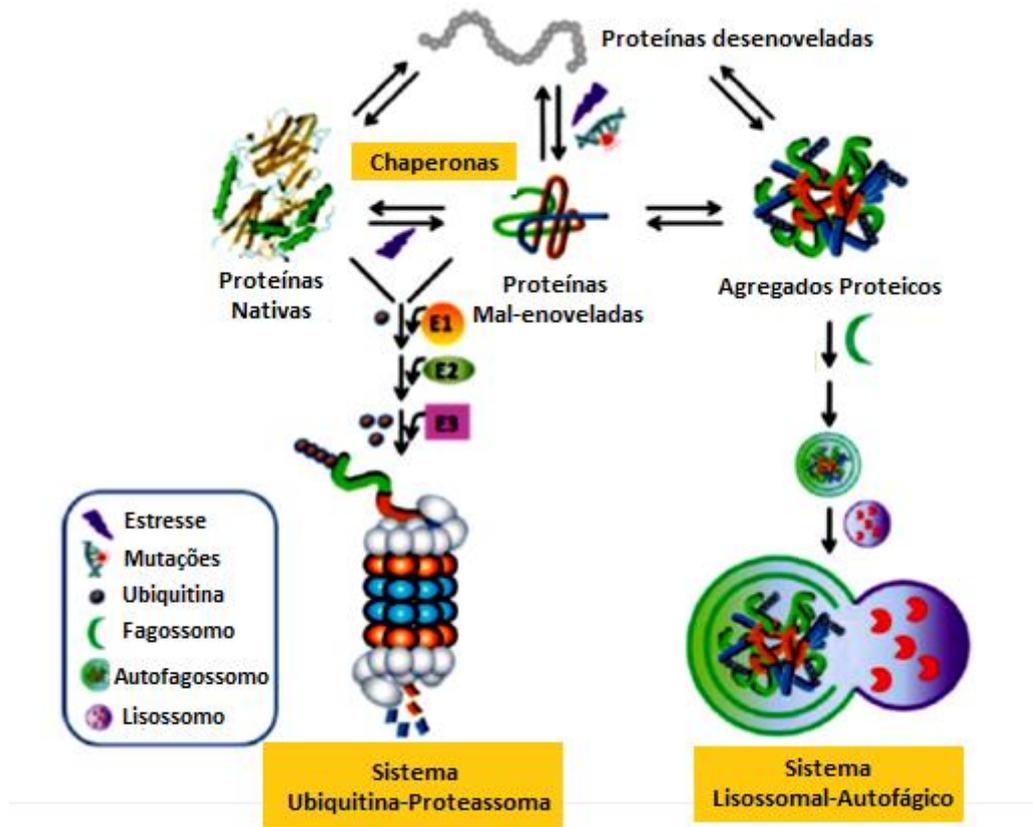


Figura 1 - Mecanismos envolvidos na homeostase proteica: chaperonas moleculares, o sistema ubiquitina-proteassoma e o sistema lisossomal autofágico. As proteínas desenoveladas, por ação de estressores ou por mutações, podem gerar proteína mal enoveladas. Estresses podem também fazer com que proteínas nativas percam sua conformação normal, gerando proteínas anormais. As chaperonas moleculares atuam auxiliando o correto enovelamento das proteínas, bem como reparando aquelas mal enoveladas. Quando o dano é irreparável, as proteínas são encaminhadas para a degradação por um dos dois sistemas de degradação proteica da célula: o sistema ubiquitina-proteassoma e o sistema lisossomal-autofágico. As proteínas anormais também podem gerar agregados proteicos, que geralmente sofrem degradação pelo sistema lisossomal-autofágico. (Adaptado de SU e WANG, 2010)

A morte progressiva de neurônios em regiões específicas do cérebro, especialmente o neocórtex (MARKAKI e TAVERNARAKIS, 2010) leva ao aparecimento dos sintomas cognitivos, sendo o mais impactante deles a perda de memória característica dos indivíduos portadores. Observam-se também distúrbios comportamentais, depressão e mudanças de personalidade (PAULA et al, 2009). Ainda não existem, disponíveis, tratamentos curativos para o Mal de Alzheimer. De acordo com o protocolo clínico e as diretrizes terapêuticas para a Doença de Alzheimer (BRASIL, 2013), o tratamento atual é constituído da administração dos fármacos Donezepil, Galantamina e Rivastigmina, e tem como objetivo apenas a “redução da velocidade de progressão da doença” e a “melhora da memória e atenção”.

Ainda que os mecanismos envolvidos na gênese e progressão da doença não tenham sido totalmente esclarecidos, três características fisiopatológicas podem ser observadas em todos os pacientes: os emaranhados neurofibrilares compostos pela proteína TAU, as placas senis compostas pelo peptídeo β -amilóide, e um quadro progressivo de neurodegeneração (PAULA et al, 2009; TRUSHINA e MIELKE, 2013).

A TAU é uma proteína intracelular que, dentre outras funções, está envolvida na composição do citoesqueleto através de sua interação intermitente com a tubulina, formando o microtúbulo. A temporariedade dessa interação é mediada pela fosforilação da proteína TAU (REVETT et al, 2012). Nos indivíduos acometidos pela doença, a TAU encontra-se constantemente hiperfosforilada, o que impede sua ligação com a tubulina e provoca sua agregação em emaranhados que se depositam dentro da célula (PAULA et al, 2009). Ainda que não tenha sido estabelecida uma relação causa-efeito entre os emaranhados neurofibrilares e os sintomas observados nos pacientes, estes são um dos principais achados no cérebro acometido pelo Mal de Alzheimer (MI e JOHSON, 2006).

A presença das diferentes formas de acúmulo do peptídeo β -amilóide (β A), entretanto, já foi associada à grande parte dos eventos e sintomas observados na progressão do Alzheimer, gerando a hipótese de que o β A poderia ser um fator causal na doença (Teoria da Cascata Amilóide) (KORCZYN, 2008). O peptídeo β A consiste em uma cadeia peptídica de 39 a 42 aminoácidos provenientes da clivagem sucessiva da APP (REVETT et al, 2012). Em

indivíduos normais, a APP é clivada preferencialmente pela α -secretase, gerando peptídeos sem importância patológica, e cujas funções ainda não são bem conhecidas. Em indivíduos acometidos pelo Alzheimer, a APP é clivada preferencialmente pela β -secretase, e em seguida pelas subunidades da γ -secretase (as presinilinas), gerando os peptídeos tóxicos (PAULA et al, 2009). Os monômeros de β A formam oligômeros intracelulares, que podem ser exportados para fora da célula e se depositar no meio extracelular, formando as placas senis. Atualmente, sabe-se que os oligômeros β A inibem o funcionamento normal do sistema de degradação protéica da célula (MUNOZ-LOBATO et al, 2013), interagem com os neurônios e células da glia induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), desregulam o metabolismo do cálcio e induzem a morte neuronal por apoptose (Figura 2) (PAULA et al, 2009). Ainda que controversa, a teoria da cascata amiloide é uma das hipóteses mais discutidas da literatura, e norteia o desenvolvimento de inúmeros ensaios clínicos com candidatos terapêuticos (TRUSHINA et al, 2013).

1.3 Doença de Huntington

As doenças poliglutamínicas constituem um grupo de desordens neurodegenerativas caracterizadas por repetições do triplete CAG, que codifica o aminoácido glutamina, no eixo de alguma proteína específica (SHAO e DIAMOND, 2007). No caso da Doença de Huntington, uma doença neurodegenerativa autossômica dominante, essa repetição ocorre na região codificante do gene da Huntingtina, gerando uma expansão glutamínica na região terminal amina da proteína (GIL-MOHAPEL e REGO, 2010). A doença é progressiva e fatal, sendo caracterizada pela disfunção motora, cognitiva, comportamental e psicológica dos indivíduos acometidos (BORGS et al, 2012). Os sintomas se iniciam, geralmente, por volta dos 40 a 50 anos de idade, mas os casos juvenis representam 6% dos indivíduos acometidos (BORGS et al, 2012; MYERS et al, 1993). O tratamento atualmente se foca na supressão da coreia – os movimentos involuntários, breves e espasmódicos que iniciam-se e espalham-se pelo corpo de maneira inesperada e contínua, além das alterações de humor. Nenhum tratamento curativo ou modificador do curso da doença foi

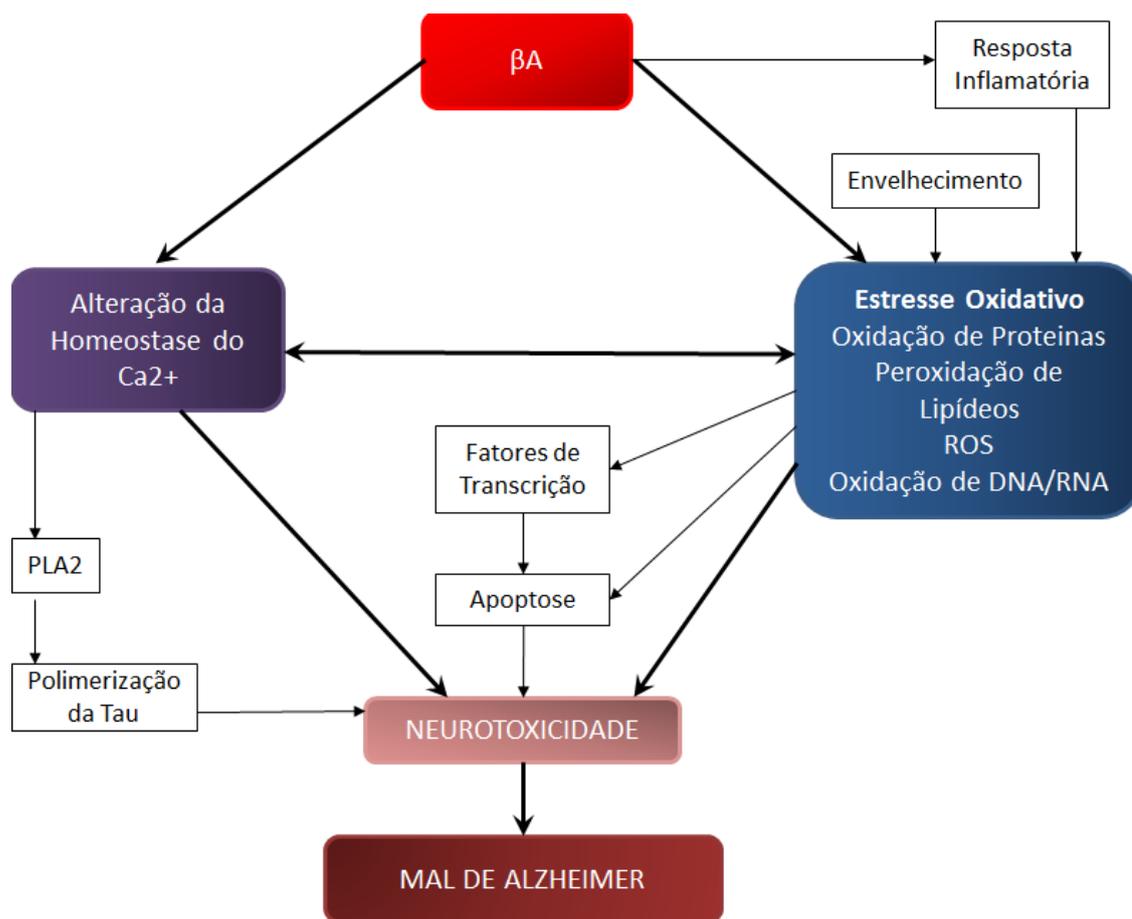


Figura 2 – Teoria da Cascata Amilóide. O estresse oxidativo gerado pelo peptídeo β -amilóide é evidenciado pela formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), peroxidação lipídica e oxidação de proteínas, marcadores encontrados em pacientes portadores do Mal de Alzheimer. Outra consequência do estresse associado ao peptídeo β -amilóide é a alteração da homeostase do cálcio, que pode inclusive levar à polimerização da proteína TAU através da ativação da fosfolipase A2 (PLA2) e da liberação de ácidos graxos livres (AAL). (Adaptado de BUTTERFIELD et al, 2001)

proposto até o momento (LABBADIA e MORIMOTO, 2013; MUNOZ-SANJUAN e BATES, 2011).

A patogênese da doença de Huntington parece estar associada não à disfunção da huntingtina, mas sim à sua clivagem proteolítica, formando fragmentos poliglutamínicos (poliQ) (SHAO e DIAMOND, 2007). Estes fragmentos, pela presença das repetições poliglutamínicas, tendem a sofrer alterações conformacionais que favorecem a formação de oligômeros, agregados e inclusões proteicas, que possuem efeitos tóxicos por promoverem desregulação transcricional, remodelamento da cromatina, disfunção metabólica, alteração da homeostase do cálcio, excitotoxicidade e ativação de caspases, podendo levar à morte neuronal (BORGS et al, 2012). Os fragmentos poliglutamínicos também já foram associados ao bloqueio da atividade normal do proteassoma e ao sequestro de chaperonas moleculares, interferindo assim na atividade dos sistemas de controle de qualidade proteica da célula (SHAO e DIAMOND, 2007). A Figura 3 mostra os potenciais alvos terapêuticos na via envolvida na patogênese da doença de Huntington.

1.4 Modelos *C. elegans* para o estudo de Doenças Neurodegenerativas

O *Caenorhabditis elegans* é um nematodo de vida livre introduzido como organismo modelo no mundo científico por Sidney Brenner, em 1965 (RIDDLE, 1997). Atualmente, é amplamente utilizado como modelo, sendo aplicado em vários campos de pesquisa como o desenvolvimento, a neurociência, a apoptose e o envelhecimento (CHEN et al, 2005). Suas vantagens como organismo modelo incluem ser facilmente cultivável em laboratório - os animais são pequenos (vermes adultos possuem cerca de 1 mm de comprimento) e podem ser mantidos em placas petri com a bactéria *Escherichia coli* como única fonte de alimento; além de possuir um curto ciclo e tempo de vida (cerca de 2 dias quando cultivados à 22°C – Figura 4 e 3,5 dias quando cultivados à 20°C, ambas as situações na bactéria *E. coli*). São hermafroditas, e portanto capazes de se auto-fertilizarem, produzindo, cada animal, uma descendência de cerca de 300 outros vermes: assim, milhares de animais podem ser cultivados em uma única placa petri, o que o torna ainda mais atraente como um organismo modelo (BRENNER, 1974; RIDDLE, 1997).

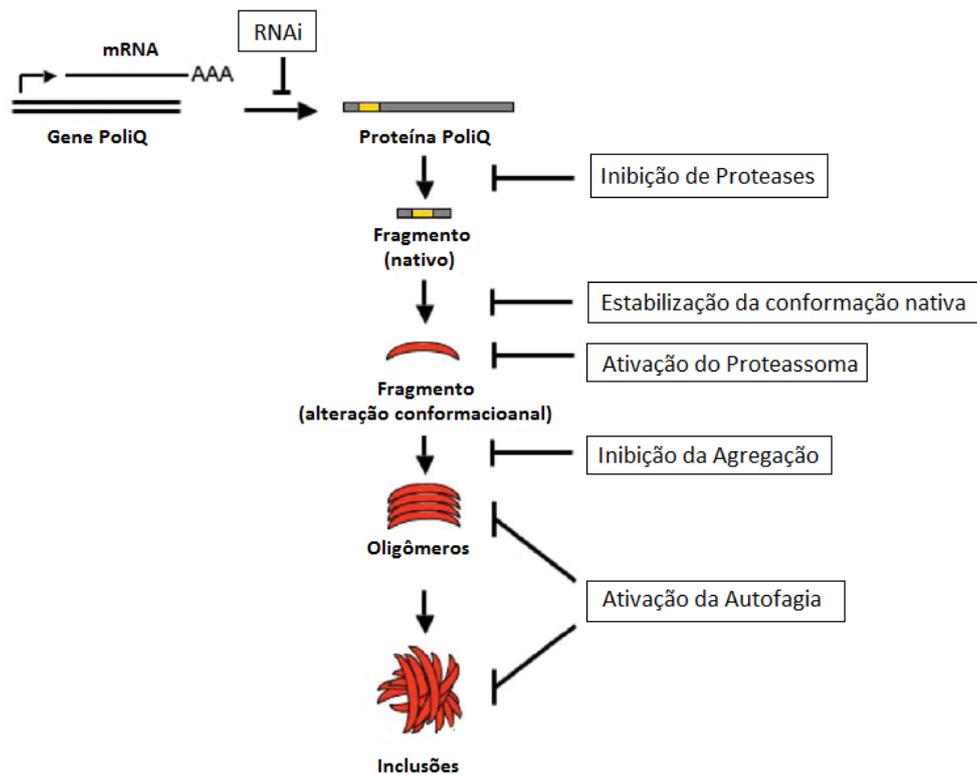


Figura 3 – Potenciais alvos terapêuticos na busca de tratamentos para a Doença de Huntington. Estes tratamentos visam ou diminuir a formação de agregado ou aumentar a remoção destes. Adaptado de (SHAO e DIAMOND, 2007).

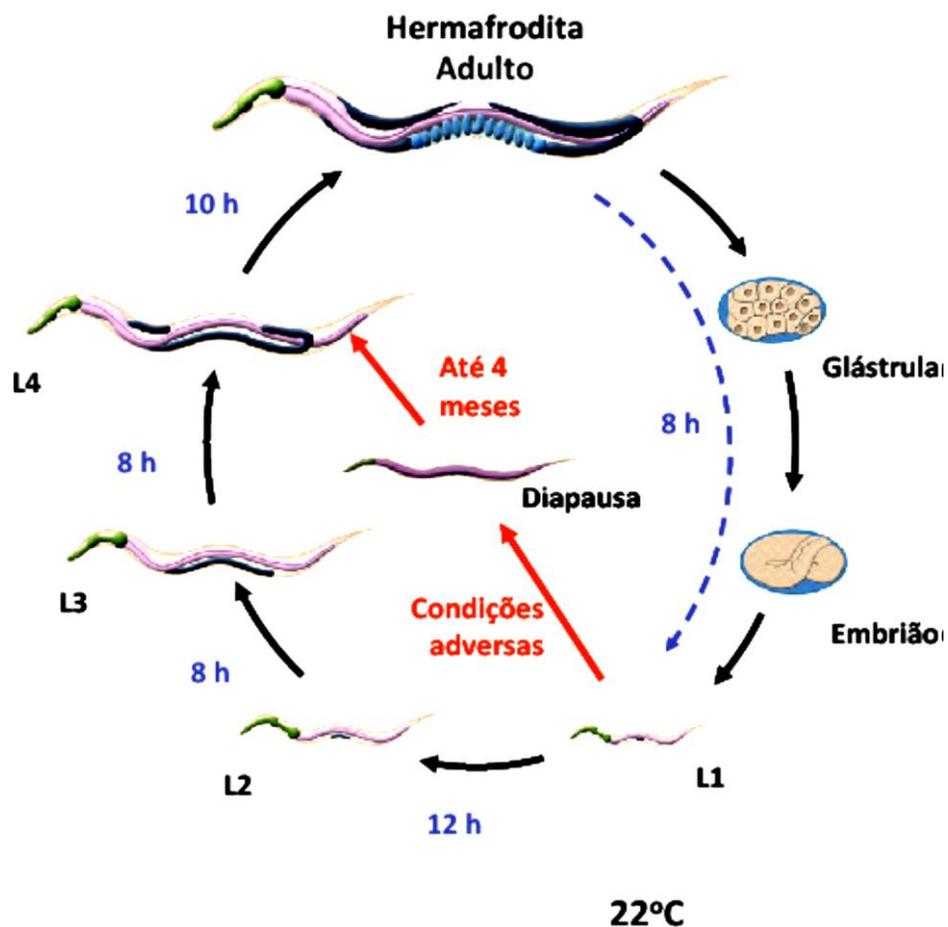


Figura 4 – Ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans* a 22°C. Representação de seus 4 estágios larvais (L1 – L4), estágio adulto e estágio de diapausa. O estágio de diapausa é decorrente da exposição dos animais a condições ambientais adversas, como ausência de alimento e baixas temperaturas. Nestas condições, os vermes podem permanecer estacionários no estágio larval L1 por até 4 meses. Fonte: Worm Atlas.

Sua simplicidade anatômica e a transparência de seu corpo permitiram a descrição de todos os seus sistemas, bem como de todas as suas 956 células somáticas (RIDDLE, 1997).

Brenner (1974) também foi o primeiro a descrever o *C. elegans* como um organismo extremamente favorável para análises genéticas: a auto-fertilização faz com que seja relativamente fácil isolar mutantes recessivos e produzir estoques de mutantes homocigotos com fenótipos extremamente severos. Além disso, os fenótipos são rastreáveis, o que permite a identificação e seleção de mutantes por suas dificuldades motoras ou seu diminuto tamanho corporal, por exemplo. O estudo genético do *C. elegans* está em constante evolução. O verme foi o primeiro organismo eucarioto a possuir o seu genoma totalmente sequenciado (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), além de possuir um banco de dados de bioinformática facilmente acessível, o *Wormbase* (CHEN et al, 2005), microarranjos de DNA (REINKE, 2002), um consórcio de construção de mutantes “knock-out” (<http://ipprg.wordpress.com/research/projects/c-elegans-gene-knockout-consortium>), e a capacidade para análise da função gênica por RNA interferente de maneira rápida e fácil (OHKUMO et al, 2008). Ainda no âmbito das análises genéticas, outra grande vantagem do uso do *C. elegans* como modelo é a facilidade de visualização de proteínas repórteres, como a GFP (*green fluorescent protein*), permitida pela transparência dos animais, o que facilita as análises por microscopia óptica, e pela facilidade de geração de linhagens transgênicas que carregam essas estruturas (BOULIN, ETCHBERGER e HOBERT, 2006).

O interesse do uso do *C. elegans* no campo da neurociência veio do conhecimento, já aprofundando, de seu sistema nervoso: das 959 células que o *C. elegans* possui, 302 correspondem ao sistema nervoso do animal, totalmente determinado através de microscopia eletrônica. Cada um destes neurônios possui uma posição única, e sua identidade é reprodutível de animal para animal (WHITE et al, 1986; RIDDLE et al, 1997). Além disso, os principais sistemas de neurotransmissão são conservados entre mamíferos e o nematodo (DIMITRIADI e HART, 2010). De uma maneira geral, é sabido que o *C. elegans* possui ortólogos para 42% dos genes envolvidos em doenças humanas (CULETTO e SATTELLE, 2000). Assim, o verme possui alguns genes que, em humanos, estão envolvidos em doenças neurodegenerativas, mas não todos. Nestes

casos, quando um ortólogo do gene potencialmente envolvido na doença humana não está presente em *C. elegans*, construções transgênicas permitem que os mecanismos envolvidos na citotoxicidade dos genes humanos possam ser facilmente estudados (DIMITRIADI e HART, 2010). Dimitriadi e Hart (2010) descreveram a existência de modelos *C. elegans*, transgênicos ou não, para várias doenças neurodegenerativas humanas como as doenças poliglutamínicas (entre elas, a Doença de Huntington), o Mal de Alzheimer, o Mal de Parkinson, a Esclerose Lateral Amiotrófica e a Atrofia Muscular Espinhal.

1.4.1 Modelos *C. elegans* para o Mal de Alzheimer

Ainda que o *C. elegans* possua um ortólogo da proteína APP humana, a APL-1, esta não possui a região codificadora do peptídeo β -amilóide (β A). Os vermes também não possuem um ortólogo para a proteína β -secretase. Dessa forma, o estudo do Mal de Alzheimer em modelos *C. elegans* se concentra principalmente no uso de animais transgênicos, que expressam construções que contém a região codificadora do peptídeo β -amilóide humano (DIMITRIADI E HART, 2010). Dentre as construções transgênicas já disponibilizadas, três possuem a maior aplicabilidade nos estudos já publicados até o momento: as cepas CL2006, CL4176 e CL2355 (Figura 5) (LINK, 1995; LINK et al, 2003; ; WU et al, 2006; LUBLIN e LINK, 2013).

A primeira delas, a cepa CL2006, foi proposta por Link, em 1995. Trata-se de animais com *background* tipo selvagem (N2), que expressam um minigene composto pelo peptídeo β A e o promotor *unc-54*. Dessa forma, a expressão é direcionada para as células musculares (LINK, 1995). O fenótipo decorrente da expressão desta construção é uma paralisia da região posterior do corpo dos animais, progressiva e diretamente dependente da idade. Esses animais foram amplamente utilizados no estudo da patogenia subsequente à expressão do peptídeo β A, sendo inclusive aplicados no estudo de potenciais substâncias que aliviassem tal fenótipo (ARYA, DWIVEDI e SUBRAMANIAM, 2009; DIOMEDE et al, 2010).



Figura 5 – Padrão de expressão do peptídeo β A nos principais modelos transgênicos *C. elegans* utilizados para o estudo do Mal de Alzheimer, avaliada por imunohistoquímica. Fonte: Adaptado de Lublin e Link, 2013.

A cepa CL4176 expressa o peptídeo β A de maneira induzível pela temperatura. A construção transgênica, nesse caso, tratou-se de um minigene composto pela região codificadora do peptídeo β A, o promotor *myo-3* e uma região 3'-UTR anormalmente longa, o que faz com o mRNA produzido seja degradado pelo sistema de vigilância do mRNA, e portanto, não seja transcrito em condições normais. Essa construção foi inserida em um animal mutante *smg-1*. Esse animal, em temperaturas baixas (16°C), apresenta um sistema de vigilância do mRNA operando normalmente. Entretanto, uma mutação de ponto no gene da proteína SMG-1 (parte deste sistema), faz com que em temperaturas acima de 25°C a proteína se desnature com maior facilidade e o sistema não opere normalmente. Dessa forma, o mRNA da construção transgênica pode ser traduzido normalmente, levando à expressão do peptídeo β A de maneira rápida e reproduzível, com 100% de penetrância (LINK et al, 2003; LUBLIN e LINK, 2013).

As cepas descritas acima apresentam a desvantagem de expressarem o peptídeo β A nos tecidos musculares, o que difere do Mal de Alzheimer no sentido que, neste, a toxicidade do peptídeo β A se dá nos neurônios.

O modelo CL2355 foi construído de forma a expressar o peptídeo β A nos neurônios (LUBLIN e LINK, 2013). Neste caso, a expressão do peptídeo β A é regulada pelo promotor da proteína ortóloga à sinaptobrevina humana (*snb-1*), o que promove uma expressão pan-neuronal do peptídeo. Assim como na cepa CL4176, a presença de uma região 3'-UTR anormalmente longa faz com que a expressão seja dependente da temperatura, e o fenótipo decorrente é uma alteração da quimiotaxia e da sensibilidade à serotonina dos animais (WU et al, 2006). Ainda assim, as cepas cuja expressão do peptídeo β A se concentra no músculo continuam a ser mais utilizadas, uma vez que permitem manipulações mais fáceis, principalmente no que tange à eficiência de técnicas como RNAi (DIMITRIADI e HART, 2010).

Os modelos *C. elegans* acima citados já permitiram a descoberta e um melhor entendimento de vários processos mediados pelo peptídeo β A, demonstrando a importância e aplicabilidade dos mesmos no estudo do Mal de Alzheimer (DIMITRIADI e HART, 2010). Cohen et al (2006) demonstraram que a via semelhante a insulina em *C. elegans* está envolvida na patogênese do peptídeo β A, uma vez que o *knock-down* do receptor de insulina/IGF-1 em *C.*

elegans, DAF-2, reduziu a toxicidade do peptídeo β A de maneira dependente dos fatores de transcrição DAF-16 (ortólogo de FOXO de mamíferos) e HSF-1 (*Heat-Shock Fator 1*). DAF-2 e DAF-16 estão envolvidos em processos relacionados ao envelhecimento; já HSF-1 é um fator de transcrição envolvido na síntese de chaperonas, proteínas envolvidas na homeostase proteica. Os resultados de Cohen et al (2006), sugerem, portanto, uma relação entre o envelhecimento, a homeostase proteica e a toxicidade do peptídeo β A.

De fato, a homeostase proteica em *C. elegans* pôde ser associada à toxicidade do peptídeo β A em outros estudos. Fonte et al (2002), observaram a coprecipitação do peptídeo β A e chaperonas, como HSP-16. Em outro estudo, Fonte et al (2008) demonstrou que a superexpressão de HSP-16.2 atenua o fenótipo de paralisia nos modelos *C. elegans*, enquanto Wu et al (2010) demonstraram que um pré-tratamento por estresse térmico a 35°C teria um efeito protetivo em modelos *C. elegans* que expressam o peptídeo β A por induzir a expressão de HSP-16.2. Ainda neste sentido, estudos da proteína AIP-1, que em humanos se associa e regula a função do proteassoma 26S, demonstraram que sua superexpressão em *C. elegans* protege contra a toxicidade do peptídeo β A, além de diminuir seus depósitos. Ainda, o RNAi contra *aip-1* aumenta a toxicidade do peptídeo, corroborando sua participação na patogenia do mesmo (HASSAN et al, 2009). Em conjunto, esses resultados sugerem que a homeostase proteica e os mecanismos envolvidos na mesma são fatores críticos para a toxicidade do peptídeo β A.

O estresse oxidativo também já pôde ser positivamente relacionado à presença e toxicidade do peptídeo β A em *C. elegans*. Drake, Link e Butterfield (2003) demonstraram a presença de estresse oxidativo em animais expressando o peptídeo β A em relação a animais controle. Esse estresse foi evidenciado pelos níveis de proteínas carboniladas, importante marcador da oxidação de proteínas. Neste estudo, também foi possível correlacionar o aumento do estresse oxidativo aos estágios anteriores à formação de fibras do peptídeo β A, uma vez que o aumento nos níveis de proteínas carboniladas não pode ser diretamente relacionado ao aumento dos depósitos de β A. Estes resultados demonstram que a toxicidade do β A no que tange à geração de espécies reativas antecede a formação de agregados e placas senis, dando suporte à teoria de que os oligômeros de β A seriam a verdadeira espécie tóxica (DRAKE, LINK e

BUTTERFIELD, 2003). A correlação do peptídeo β A com o estresse oxidativo também já pôde ser observada através da medida dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO). Smith e Luo (2003), demonstraram que os animais que expressam o peptídeo β A apresentam maiores níveis de ERO do que animais tipo selvagem, além de verificarem que esse aumento é dependente da idade.

1.4.2 Modelos *C. elegans* para a Doença de Huntington

O *C. elegans* também não possui ortólogos para a proteína Huntingtina; assim, os modelos para a Doença de Huntington tratam-se de animais que expressam fragmentos da proteína Huntingtina com expansões variáveis de glutamina nos neurônios, além de animais que expressam apenas repetições poliglutamínicas fusionadas a proteínas fluorescentes amarelas (YFP) no músculo ou intestino (DIMITRIADI e HART, 2010).

Faber et al (1999) descreveram a construção de animais transgênicos que expressavam fragmentos da proteína Huntingtina humana, de diferentes comprimentos, nos neurônios sensoriais e bilaterais ASH. A construção contendo 150 repetições (Htn-Q150) permitiu a observação de uma neurodegeneração progressiva e dependente da idade, mas não foi observada morte celular significativa, como acontece na doença humana. Além disso, foi possível observar que a proteína Htn-Q150 forma agregados celulares, e ativa mecanismos envolvidos na apoptose, sugerindo que este pode ser o mecanismo responsável pela morte celular, quando observada (FABER et al, 1999). Em outro estudo, Faber et al (2002) descrevem que o silenciamento da proteína PQE-1 (“*poliQ-enhancer protein*”) aumenta a toxicidade da proteína HtnQ150, e propõem o uso de animais mutantes para esta proteína como *background* para obtenção de uma neurodegeneração mais acentuada e mais rápida nestes modelos. A cepa proposta (HA759) contém, além da construção contendo a proteína HtnQ150, o gene repórter *osm-10::gfp*, que permite acompanhar a neurodegeneração nestes animais como a perda da fluorescência bilateral nos neurônios ASH. Esta cepa foi utilizada em outros estudos na triagem de compostos com potenciais propriedades protetoras contra a toxicidade de proteínas poliglutamínicas (ZHANG et al, 2012; VOISINE et al, 2007; XIAO et al, 2014).

Morley et al (2002) descreveram a construção de cepas transgênicas que expressavam diferentes expansões poliglutâmicas (que variavam de 19 a 82 repetições CAG) fusionadas ao gene da proteína amarela fluorescente (YFP), sob o controle do promotor do gene *unc-54*, que direcionava a expressão para o tecido muscular do animal. Em seus experimentos, os autores puderam demonstrar que a agregação das proteínas poliglutâmicas é dependente do comprimento das repetições (Figura 6), uma vez que havia uma transição entre a observação de uma fluorescência difusa para focal com o aumento do número de repetições poliglutâmicas que o animal apresentava. Além disso, foi possível observar que a toxicidade destes agregados se expressava como diminuição da motilidade, bem como que havia uma correlação positiva entre o aumento da idade e o aumento do número de agregados para algumas das cepas.

Assim como para o Mal de Alzheimer, os modelos acima citados para a Doença de Huntington já foram utilizados para compreender melhor os mecanismos envolvidos nesta doença. Jia, Hart e Levine (2007) demonstraram o envolvimento dos mecanismos de degradação proteica na patogênese das doenças poliglutâmicas ao observar que o silenciamento de três genes envolvidos no processo de autofagia (a degradação lisossomal de proteínas) acelerou e aumentou a agregação de proteínas em animais que expressam expansões poliQ no músculo, além de aumentar o número de agregados e a neurodegeneração causada pela proteína HtnQ150.

Chaperoninas, como HSP-1 e HSP-70, além de HSF-1 (*heat shock factor*) também já foram associados à atenuação da toxicidade de proteínas poliglutâmicas, uma vez que o *knock-down* de ambas antecipou e aumentou a agregação destas proteínas em modelos que as expressam no músculo (NOLLEN et al, 2004). O mesmo estudo identificou, ainda, através de RNAi, que além de chaperonas, genes envolvidos em muitas outras vias como de degradação proteassômica, síntese e processamento de RNA e síntese de proteínas e de subunidades ribossomais estão envolvidos na toxicidade das proteínas poliglutâmicas.

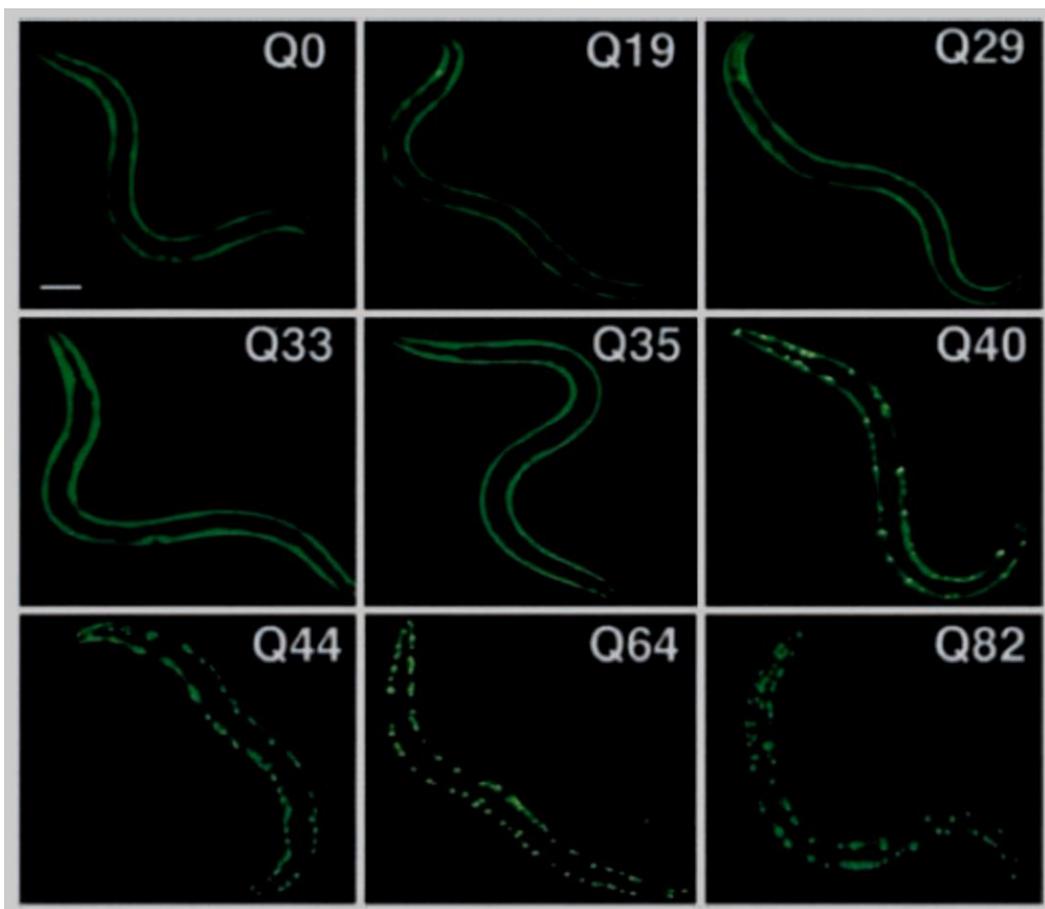


Figura 6 – Modelos *C. elegans* para doenças poliglutamínicas. Os animais possuem repetições CAG de diferentes extensões fusionadas a uma proteína fluorescente amarela. Observa-se a dependência entre o número de repetições glutamínicas e a agregação proteica (Adaptado de MORLEY *et al*, 2002).

Ainda, a via semelhante à insulina de *C. elegans* também foi correlacionada com a toxicidade das proteínas poliglutamínicas, uma vez que o *knock-down* de *age-1* foi capaz de reduzir a formação de agregados de uma maneira *daf-16* dependente (MORLEY et al, 2002). AGE-1 é ortólogo de uma fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3-quinase) em *C. elegans*, que atua na via de sinalização da insulina, e cujo *knock-down* já foi correlacionado com o aumento da longevidade (MORRIS, TISSENBAUM e RUVKUN, 1996). Estes dados sugerem que, assim como para o Alzheimer, existe uma ligação entre os mecanismos que controlam o envelhecimento e aqueles que influenciam o surgimento de doenças neurodegenerativas.

1.4.3 Uso de modelos *C. elegans* na pesquisa de potenciais drogas terapêuticas para o Mal de Alzheimer e a Doença de Huntington

Os modelos *C. elegans* para o Mal de Alzheimer e a Doença de Huntington citados nas seções anteriores já foram amplamente utilizados na triagem de drogas e substâncias com potenciais benefícios no tratamento destas doenças. A vantagem do uso de modelos *C. elegans* está no curto tempo para obtenção de cepas, quando comparado com modelos murinos, por exemplo; a capacidade de realização de triagens rápidas, considerando o curto tempo de vida dos animais; e a vantagem da possibilidade de manipulação genética, através de técnicas de RNAi, por exemplo, que permitem a elucidação de potenciais mecanismos genéticos envolvidos na ação destas drogas e substâncias (LUBLIN e LINK, 2013).

Gutierrez-Zepeda et al (2005) demonstraram que a gliciteína, uma isoflavona derivada da soja, é capaz de atenuar o fenótipo de paralisia no modelo para o Alzheimer CL4176. Ao mesmo tempo, a gliciteína foi capaz de reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio associadas ao peróxido de hidrogênio intracelular (ERO) no modelo CL2006, além de reduzir os depósitos do peptídeo β A, corado por tioflavina C, no mesmo modelo. Os resultados permitiram associar os efeitos benéficos da gliciteína ao seu potencial antioxidante. O *Ginkgo biloba*, que já é aplicado no tratamento de demências como o Alzheimer, também demonstrou capacidade de atenuar o fenótipo de paralisia no modelo *C. elegans* CL4176 (WU et al, 2006). Além deste modelo, o *Ginkgo biloba* demonstrou efeitos benéficos no modelo CL2355, atenuando os fenótipos de

quimiotaxia e hipersensibilidade à serotonina. Os resultados demonstraram que o *Ginkgo biloba* é capaz de reduzir os níveis de ERO e a deposição do peptídeo β A nestes modelos.

A Reserpina, um alcalóide atualmente utilizado como droga anti-hipertensiva, mas que possui atividade moduladora da liberação de neurotransmissores, também teve suas propriedades estudadas em modelos *C. elegans* para o Alzheimer (ARYA et al, 2009). Neste estudo, foi demonstrado que a reserpina atenua a paralisia, além de aumentar a longevidade e a termotolerância de animais da cepa CL2006. Entretanto, não foi observado qualquer efeito nos níveis do peptídeo β A, mensurado por RT-PCR e imunohistoquímica. Uma outra droga já comercializada, o antibiótico Tetraciclina, também demonstrou capacidade de atenuar a paralisia no modelo CL4176. Esse efeito, entretanto, pôde ser positivamente relacionado à sua capacidade de impedir a formação de fibras e oligômeros do peptídeo β A, evidenciado pela diminuição de ambos quando analisados por coloração por X34 e western blotting; bem como à uma ação antioxidante, evidenciada pela diminuição dos ânions superóxidos nos animais tratados (DIOMEDE et al, 2010).

Estudos com outros compostos se aprofundaram mais na elucidação do mecanismo envolvido na ação benéfica dos mesmos em modelos para o Alzheimer. As propriedades benéficas do Café, que é rico em metilxantinas como a cafeína, foram estudadas por Dostal, Roberts e Link (2010). O estudo demonstrou sua capacidade de atenuar a paralisia dos animais da cepa CL4176, além de diminuir os depósitos do peptídeo β A visualizados por imunoblot. Não foi observada, entretanto, redução na expressão do peptídeo β A, analisada por RT-PCR. Os efeitos não puderam ser relacionados à cafeína de maneira isolada, sugerindo um efeito sinérgico de todos os componentes fitoquímicos do café. As análises demonstraram que o tratamento com café não foi capaz de aumentar a expressão das chaperoninas HSP-16.2 e HSP-4, como também não promoveu a localização nuclear do fator de transcrição DAF-16, descartando a via da insulina como um possível mecanismo de ação do café. Em contrapartida, o tratamento foi capaz de aumentar a expressão de GST-4, enzima antioxidante cuja transcrição está sob o controle do fator de transcrição SKN-1. O estudo do envolvimento deste fator de transcrição demonstrou que a ação do café depende diretamente do mesmo: animais expressando o peptídeo β A mas mutantes para

o fator de transcrição SKN-1 (cepa CL6222) não demonstravam melhorias na paralisia quando tratados com café. Além disso, quando submetidos ao *knock-down* de SKN-1 por RNAi, os animais da cepa CL4176 não demonstraram melhoria do fenótipo de paralisia, nem redução dos depósitos do peptídeo β A.

Sangha e colaboradores (2012), ao estudar a fórmula medicinal chinesa Liuwei Dihuang (LWDH), rica em compostos fenólicos, observaram que a mesma possuía capacidade de atenuar o fenótipo de paralisia do modelo CL4176 para o Alzheimer, além de diminuir os depósitos do peptídeo β A. Os autores observaram, também, a capacidade do extrato de reduzir o estresse oxidativo e aumentar a expressão da chaperonina HSP-16.2, observada tanto através de qPCR, quanto através de experimentos com o gene repórter *hsp-16.2::gfp*.

Já Martorell et al (2013) demonstraram que um peptídeo isolado do cacau também possui a capacidade de atenuar o fenótipo de paralisia no modelo CL4176. Seus benefícios foram positivamente relacionados à sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo e os agregados β A. Mais profundamente, experimentos de microarranjo demonstraram que o peptídeo isolado é capaz de regular positivamente 13 diferentes vias KEGG. Dentre elas, pode-se citar as vias do metabolismo do piruvato, vias de metabolismo e degradação de aminoácidos, vias de oxidação de lipídeos e carboidratos, além de vias de degradação de proteínas (proteassoma).

Em estudo recente (REGITS, DUBLING e WENZEL, 2014), a capacidade do polifenol quercetina em inibir a paralisia e a agregação do peptídeo β A na cepa CL2006 foi demonstrada. Neste caso, a paralisia foi intensificada por submissão dos animais ao estresse térmico a 35°C por 1 hora, de forma a reduzir o tempo dos experimentos. Esta metodologia também permitiu a realização de análises de RNAi: desta forma, foi demonstrado que o efeito da quercetina depende de dois ortólogos de enzimas ubiquitinadoras em *C. elegans*. Paralelamente, foi demonstrado que a quercetina aumenta a atividade do proteassoma, confirmando que seu efeito está correlacionado com o aumento da degradação proteica. Os experimentos de RNAi também demonstraram que a ação da quercetina é dependente da proteína BEC-1, indispensável para a formação dos autofagossomos e envolvida na autofagia, outro mecanismo celular de degradação de proteínas. Estes resultados demonstram que compostos fitoquímicos podem ser benéficos na atenuação de fenótipos em

modelos para o Alzheimer não apenas por suas propriedades antioxidantes, mas também por sua capacidade de modular a homeostase proteica.

Os modelos *C. elegans* para a Doença de Huntington foram utilizados por Voisine e colaboradores (2007) para realizar uma triagem de potenciais drogas terapêuticas para o tratamento da doença, demonstrando que o modelo de neurodegeneração (HA759 - que expressa a proteína HtnQ150) pode ser uma valiosa ferramenta para a rápida descoberta de novos tratamentos. Os compostos, entre eles o cloreto de lítio (LiCl), a cistamina, a mitramicina, a tricostatina e a budesonida, foram escolhidos por terem apresentado, em estudos anteriores, capacidade de reduzir a degeneração em cultura de células ou animais modelos PoliQ. Destes, a mitramicina, tricostatina e o cloreto de lítio demonstraram capacidade neuroprotetora dose dependente; além disso, a associação entre mitramicina e cloreto de lítio também mostrou resultados superiores àqueles das drogas isoladas. Os efeitos para ambos os fármacos foram independentes do fator de transcrição DAF-16, demonstrando que, ainda que possam estar envolvidos, existem outros mecanismos que não aqueles relacionados à longevidade que podem influenciar a toxicidade de proteínas poliQ.

A salidroside, glicosídeo extraído da *Rhodiola rósea*, planta com crescente aplicação medicinal, demonstrou capacidade neuroprotetora no modelo *C. elegans* para a Doença de Huntington; entretanto, não foi observada diminuição da agregação proteica no modelo que expressa proteínas PoliQ no músculo. Na verdade, os efeitos neuroprotetores da salidroside puderam ser associados à redução dos níveis de ERO aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e diminuição da peroxidação lipídica no modelo HA759, permitindo relacionar diretamente a neuroproteção à um efeito antioxidante (XIAO et al, 2014).

Zhang et al (2012) demonstraram que o astragalan, polissacarídeo derivado do *Astragalus*, planta tradicional chinesa, é capaz de reduzir os agregados nos modelos poliQ, bem como apresenta um efeito neuroprotetor no modelo HA759. Foi também observado que o polissacarídeo é capaz de aumentar a longevidade dos animais poliQ e também de animais tipo selvagem. O fato de sua capacidade em aumentar a longevidade ter sido perdida em mutantes *daf-16* sugere que seus efeitos dependem deste fator de transcrição.

1.5 Guaraná

O guaraná, extrato obtido das sementes da *Paullinia cupana Mart. var. Sorbilis* (Sapindaceae), ou guaranazeiro, é largamente consumido nacionalmente na forma de bebidas, como refrigerantes e energéticos, ou na forma de pó, como suplemento alimentar e dietético (KENNEDY et al, 2004). O uso do Guaraná na medicina tradicional, especialmente a indígena, baseia-se em suas propriedades estimulantes, analgésicas e antipiréticas. Existem relatos de seu uso para o tratamento de disenterias, neuralgias e até mesmo hipertensão (BASILE et al, 2005). Ainda que por muito tempo os estudos ao seu respeito tenham se limitado às suas propriedades estimulantes, que se acredita serem reflexo de seu grande conteúdo de cafeína (BASILE et al, 2005; KENNEDY et al, 2004), atualmente vem crescendo na literatura dados sobre outras propriedades biológicas do Guaraná, como antioxidante (YAMAGUTI-SASAKI et al, 2007; MATTEI et al, 1998; PORTELLA et al, 2013; BASILE et al, 2005; BITTENCOURT et al, 2013; LEITE et al, 2011; BITTENCOURT et al, 2014), antibacteriana (YAMAGUTI-SASAKI et al, 2007; BASILE et al, 2005), e sobre o sistema nervoso central (KENNEDY et al, 2004; OTOBONE et al, 2007; OLIVEIRA et al, 2010). Ainda segundo a literatura, o guaraná possui uma rica composição de compostos fitoquímicos como polifenóis (ácido tânico, ácido caféico, ácido gálico, procianidinas, catequinas, epicatequinas e taninos) e metilxantinas (cafeína, teofilina e teobromina) (BITTENCOURT et al, 2014; BITTENCOURT et al, 2013; YAMAGUTI-SASAKI et al, 2007; BASILE et al, 2005).

Grande parte das publicações sobre o Guaraná destaca suas propriedades antioxidantes *in vitro*. (YAMAGUTI-SASAKI et al, 2007; MATTEI et al, 1998; PORTELLA et al, 2013; BASILE et al, 2005; BITTENCOURT et al, 2014). Em alguns casos, esse efeito antioxidante pôde ser relacionado, de maneira proporcional, ao conteúdo de polifenóis dos extratos (YAMAGUTI-SASAKI et al, 2007). Em estudo *ex vivo*, Bittencourt et al (2013), demonstraram os efeitos antioxidantes do Guaraná em culturas de células avaliadas após exposição à nitroprussiato de sódio (SNP), cuja degradação gera óxido nítrico, potente indutor de estresse oxidativo. Neste estudo, o tratamento com Guaraná em baixas concentrações foi capaz de reverter a toxicidade do SNP, demonstrada através da redução da mortalidade celular, da peroxidação lipídica,

do dano ao DNA e do estresse oxidativo celular (neste caso, avaliado por análise de fluorescência com o corante 2,7 – Diclorofluorescina Diacetato, ou DCF-DA). O Guaraná foi também capaz de aumentar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), envolvida nos processos celulares de combate ao estresse oxidativo. Leite e colaboradores, em 2011, demonstraram os efeitos antioxidantes do Guaraná *in vivo*, ao comprovar um efeito protetor do Guaraná contra danos induzidos por tratamento de ratos Wistar com o metal pesado cádmio, que sabidamente provoca dano celular mediado por radicais livres. A melhora foi observada pela atenuação de mudanças morfológicas e pela redução da resposta inflamatória, avaliada nos testículos dos animais.

Efeitos benéficos do consumo de Guaraná também já foram relatados em estudos epidemiológicos em humanos. Costa-Krewer et al (2011), observaram, em indivíduos idosos de uma região ribeirinha da Amazônia que consumiam guaraná habitualmente, uma menor prevalência de obesidade e síndrome metabólica, além de menores níveis de LDL colesterol e menores níveis pressóricos, em comparação aos indivíduos que não consumiam Guaraná, segundo seus próprios relatos. Outro estudo observou, em indivíduos idosos saudáveis que consumiam Guaraná habitualmente, redução nos níveis de oxidação de LDL, a qual também pôde ser relacionada ao conteúdo de polifenóis dos extratos de maneira diretamente proporcional. (PORTELLA et al, 2013). A menor oxidação de LDL, associada ao efeito inibidor do Guaraná sobre a agregação plaquetária (RAVI e YANKER, 2008), sugerem potenciais benefícios para a saúde cardiovascular.

Estudos sobre os efeitos estimulantes do Guaraná, tanto físicos quanto sobre o sistema nervoso central, já foram realizados em diversos modelos. Espínola et al (1997) mostraram que baixas doses de Guaraná foram capazes de aumentar o desempenho físico de ratos. Este aumento não pode ser associado somente ao conteúdo de cafeína do extrato, uma vez que esta, isolada, não gerou os mesmos efeitos, o que sugeriu uma ação sinérgica dos componentes do Guaraná. Já Otobone et al (2007), em estudo sobre o perfil comportamental de ratos em alimentação suplementada com Guaraná, demonstraram um efeito antidepressivo em uma administração em longo prazo do suplemento. Em estudo em humanos, Kennedy et al (2004) demonstraram um aumento do desempenho cognitivo de indivíduos consumindo Guaraná.

Entretanto, segundo Oliveira e colaboradores (2010), apesar do aumento dos dados sobre as propriedades do Guaraná, seus efeitos sobre o sistema nervoso central não são testados com frequência, e seus potenciais efeitos benéficos para doenças neurodegenerativas continuam pouco conhecidos.

A composição fitoquímica do guaraná é um outro fator que o torna um objeto interessante no âmbito da pesquisa de tratamentos para doenças neurodegenerativas, uma vez que estes fitoquímicos já foram associados a efeitos benéficos em modelos para neuropatologias. A cafeína, isoladamente, já demonstrou ser capaz de reduzir a oligomerização do peptídeo β -amilóide (β A) *in vitro* (ZHANG et al, 2015), além de diminuir os níveis de β A no cérebro de ratos (CHU et al, 2012), reduzir marcadores proinflamatórios e de estresse oxidativo em ratos modelos para o Alzheimer (LAURENT et al, 2014) e prevenir o desenvolvimento de déficits de memória nestes animais (LAURENT et al, 2014; HAN et al, 2013; CHU et al, 2012). Os polifenóis também já demonstraram capacidade *in vitro* de inibir a formação e induzir a degradação do peptídeo β amiloide (ONO et al, 2003). A epicatequina, polifenol encontrado no EHG, já demonstrou capacidade de inibir o processamento da APP *in vitro*, além de reduzir os níveis e a patologia do β A em ratos (COX et al, 2015). Também já foi demonstrado que as catequinas epicatequina galato e epigallocatequina galato, componentes do chá verde, inibem efeitos apoptóticos induzidos pelo peptídeo β A e sua agregação *in vitro* (BASTIANETTO et al, 2006).

Neste contexto, Oliveira et al publicaram, em 2010, um estudo sobre os efeitos do Guaraná sobre um modelo para doença de Parkinson. Neste trabalho, células dopaminérgicas de neuroblastoma foram tratadas com o pesticida Rotenona, utilizado para gerar um modelo *in vitro* de neurodegeneração e Parkinson. O autor observou que o tratamento destas células com Guaraná foi capaz de protegê-las contra os efeitos deletérios da Rotenona, avaliados pela viabilidade celular, integridade de membrana e pela condensação e fragmentação nuclear. Em alguns casos, ocorreu uma reversão do quadro de toxicidade, já que o Guaraná foi capaz de recuperar a viabilidade celular e a integridade da membrana aos níveis equivalentes ao controle. Considerando o mecanismo de ação da Rotenona (que inibe a atividade mitocondrial normal e aumenta os níveis de radicais livres na célula), o autor sugere que os efeitos

benéficos do Guaraná seriam devidos aos seus constituintes fitoquímicos, cujas propriedades antioxidantes já foram descritas na literatura.

Recentemente, Bittencourt e colaboradores (2014) demonstraram que o guaraná é capaz de reduzir, de maneira significativa, a formação de fibras do peptídeo β -amilóide em cultura de células. Neste mesmo estudo, o guaraná também foi relacionado à prevenção da glicação de proteínas e à diminuição do estresse oxidativo e da morte celular causada pela acroleína. A glicação de proteínas leva a formação de produtos avançados de glicação (AGEs), os quais já foram relacionados ao envelhecimento e às doenças neurodegenerativas (RAMASAMY et al, 2005). Já a acroleína, produto da combustão de óleos que pode ser obtido na dieta, por exemplo, também já foi relacionado ao dano oxidativo em diversas doenças neurodegenerativas, inclusive o Alzheimer (BRADLEY, MARKESBERRY e LOVELL, 2010).

Avaliando a literatura disponível sobre o Guaraná atualmente, é possível observar que ainda são limitados os dados obtidos *in vivo* em relação as suas propriedades antioxidantes e os mecanismos envolvidos. Além disso, é especialmente notável a ausência de dados sobre seus potenciais benefícios para doenças neurodegenerativas, já que são claras sua capacidade de agir no sistema nervoso central (evidenciada por suas propriedades estimulantes e antidepressivas), e o potencial benéfico de sua composição fitoquímica para doenças neurodegenerativas. Por fim, as evidências positivas encontradas em modelo *ex vivo* para a doença de Parkinson e na diminuição da agregação *in vitro* do peptídeo β A tornam interessante testar os efeitos do Guaraná em modelos de doenças neurodegenerativas, como o Mal de Alzheimer e a Doença de Huntington.

CAPÍTULO II
OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar *in vivo* as propriedades antioxidantes e neuroprotetoras do Guaraná (*Paullinia cupana*), bem como avaliar seu potencial protetor contra a proteotoxicidade em modelos *Caenorhabditis elegans* para o Mal de Alzheimer e Doença de Huntington.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter a fração hidroalcoólica do Guaraná em Pó e caracterizar sua composição fitoquímica e sua capacidade antioxidante *in vitro*;
- Avaliar a toxicidade do EHG sobre os vermes através da análise do desenvolvimento e de marcadores do envelhecimento;
- Avaliar o potencial efeito protetor do EHG contra a proteotoxicidade em modelos *C. elegans* para o Mal de Alzheimer e Doença de Huntington;
- Avaliar as propriedades antioxidantes do EHG *in vivo* no modelo *C. elegans* através da análise de marcadores do estado REDOX do organismo, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a expressão de enzimas de detoxificação;
- Avaliar o efeito do EHG sobre quatro parâmetros relacionados à homeostase proteica: a resistência ao estresse térmico, a expressão do peptídeo β A e de chaperoninas, e a atividade do proteassoma

CAPÍTULO III

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 O Extrato Hidroalcoólico de Guaraná (EHG)

3.1.1 Obtenção do extrato de Guaraná em Pó

O extrato de guaraná em pó do fornecedor Deg Fragon, lote PGU00977, utilizado neste estudo, foi obtido na Drogaria Drogamed, em Ouro Preto – MG no dia 22/08/2013.

3.1.2 Preparo do Extrato Hidroalcoólico de Guaraná (EHG)

Uma vez que o extrato de guaraná em pó não é solúvel em solução aquosa, este foi submetido à uma extração hidroalcoólica para obtenção de frações solúveis, de acordo com Bittencourt et al (2013). Basicamente, o extrato em pó foi diluído em solução etanol:água (70:30) de forma a se obter uma concentração final de 300 mg/ml. Essa suspensão foi mantida em agitação em shaker ou agitador magnético por 24 horas em temperatura ambiente. Após esse período, o conteúdo foi separado em tubos cônicos de 50 ml e centrifugado a 3000 rpm, por 10 minutos, em temperatura ambiente.

Para obtenção do extrato seco, o sobrenadante obtido após a etapa anterior foi submetido à rotavaporização a 50°C até eliminação do máximo de solvente possível. O extrato resultante foi mantido, então, em estufa ventilada a 50°C até completa secagem.

3.1.3 Obtenção do Guaraná utilizado nos experimentos

Para ser utilizado nos experimentos, o extrato hidroalcoólico seco foi pesado e diluído em solução basal (0,1 M NaCl; 50mM tampão KPO₄) em quantidade suficiente para obtenção de uma concentração final de 50 mg/ml. Em seguida, foi misturado em vórtex por 10 minutos (aproximadamente) e centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos (BITTENCOURT et al, 2013). Trabalhou-se com o sobrenadante. Concentrações menores do extrato (10 mg/ml ou qualquer desejada) foram obtidas por diluição seriada. O EHG utilizado nos experimentos de caracterização da atividade antioxidante *in vitro* pelo método de DPPH e curva de crescimento bacteriano foi obtido através deste processo.

Para o tratamento dos animais em experimentos, as diluições nas concentrações de 50 mg/ml e 10 mg/ml foram esterilizadas em filtro de 0,22 µm, utilizadas para ressuspender pellet de bactéria *Escherichia coli* OP50 (OD=1) e

semeadas nas placas de NGM para o cultivo dos animais. As placas controle foram semeadas com *E. coli* ressuspensa apenas em solução basal.

3.2 Caracterização do Extrato Hidroalcoólico de Guaraná

3.2.1 Caracterização fitoquímica por HPLC

A quantificação dos compostos fitoquímicos do EHG foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), e o método foi baseado naquele proposto por Sousa et al (2010). A Tabela 1 sumariza os aspectos técnicos das análises. Estas análises foram realizadas pela equipe da Professora Cecília Verônica Nunez, do Departamento de Produtos Naturais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

3.2.2 Caracterização da atividade antioxidante do EHG *in vitro* pelo método de neutralização do radical DPPH

A capacidade antioxidante do EHG foi caracterizada *in vitro* através do método adaptado de Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995). O método se baseia na medida da neutralização do radical DPPH pelo composto de interesse, que é proporcional à diminuição da absorvância do radical a 515nm. Os resultados obtidos são comparados à redução da absorvância provocada pelo antioxidante padrão TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetra methylchroman-2-carboxylic acid). Em síntese, 100 µl do EHG em três diferentes concentrações (5, 10 e 50 mg/ml) e 100 µl do padrão TROLOX nas concentrações de 200 – 800 µM, foram individualmente adicionados a 3,9 ml de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 60 µM dissolvido em metanol 80%. A mistura foi homogeneizada e mantida no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. A absorvância da solução foi determinada a 515nm e metanol 80% foi utilizado como branco. Solução basal pura foi utilizada como controle das diferentes concentrações de EHG.

A porcentagem de inibição foi determinada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = (1 - A_{\text{amostra}515}/A_{\text{controle}515}) \times 100$$

Tabela 1: Características técnicas do método cromatográfico aplicado para quantificação de Cafeína, Teobromina, Catequina e Epicatequina no EHG

Equipamento	Shimadzu LC-6A, com duas bombas LC-6AD, controlador SCL-10Avp, detector SPD-M20A, auto injetor/amostrador SIL-10AF
Pré-coluna	Phenomenex® SecurityGuard™ C18 (4 x 3 mm I.D.)
Coluna	Phenomenex® Luna® C18(2) (5 µm, 100 Å, 250 x 4,6 mm I.D.)
Modo de separação	Fase reversa
Condições de detecção	280 nm
Fase(s) móvel(s)	H ₂ O:ACN:MeOH:AcOEt (89mL:6mL:1mL:3mL) + 0,2 mL de HAc
Modo de eluição	Isocrático
Fluxo de eluição	1 mL/min
Padrões utilizados	Cafeína, Teobromina, Catequina e Epicatequina (pureza 97-99,9%, Farmacopéia Brasileira, Sigma Aldrich)
Preparação dos padrões	Dissolvidas em metanol e filtradas em membrana tipo PTFE (47 mm, 0,45 µm)
Procedimento de calibração	Cafeína: faixa de concentração de 0-380 µg/mL Teobromina: 0-35 µg/mL Catequina e Epicatequina: 0-130 µg/mL
Preparação da(s) amostra(s)	Dissolvida em metanol e filtrada em membrana tipo PTFE (47 mm, 0,45 µm)

Os percentuais de inibição foram comparados àqueles observados para o padrão TROLOX, e a atividade antioxidante expressa como equivalente TROLOX.

3.3 Cepas de *Caenorhabditis elegans*

As cepas utilizadas neste trabalho, descritas na Tabela 2, foram obtidas no *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), University of Minnesota, EUA (<http://www.cbs.umn.edu/CGC>) ou gentilmente cedidas pelo Dr. T. Keith Blackwell do Joslin Diabetes Center, Boston, EUA.

3.4 Crescimento, Manutenção e Sincronização cronológica dos animais

Os vermes utilizados nos experimentos foram cultivados em placas petri de 60mm contendo NGM (Nematode Growth Medium - NaCl 3g/L; bactopeptona 2,5g/L; ágar bacteriológico 17g/L; colesterol 1mg; CaCl 1M; MgSO₄ 1M; KPO₄ 25M) (BRENNER, 1974) semeadas com a bactéria *Escherichia coli* OP50, a qual é utilizada como fonte de alimento para os animais. Todas as cepas foram mantidas a 20°C, com exceção das cepas CL4176 e CL2006 que, por serem sensíveis à temperatura, foram mantidas a 16°C até uso em experimentos. A manutenção de todas as linhagens foi realizada através da transferência semanal de animais em diferentes estágios de desenvolvimento para novas placas com fonte renovada de alimento.

A sincronização cronológica dos animais, para sua utilização em experimentos, foi realizada através de dois métodos: lise alcalina e ovoposição. A lise alcalina consiste no tratamento de vermes hermafroditas adultos com solução de lise (50% hipoclorito de sódio; 2,5mM NaOH) por 5 minutos. Os ovos, resistentes a esse processo, são centrifugados e ressuspensos em meio líquido M9 (KH₂PO₄ 22 mM; K₂HPO₄ 42 mM; NaCl 85,5 mM; MgSO₄ 1 mM) e mantidos em agitação em homogeneizador overnight, na ausência de alimento. Isso permite que os ovos eclodam, mas a ausência de alimento faz com que todos os animais permaneçam no seu primeiro estágio evolutivo, L1. Já a ovoposição consiste na transferência de 20 a 100 hermafroditas adultos grávidos para uma placa de interesse, contendo alimento. Os animais são mantidos nessas placas cerca de 3 a 6 horas, período em que realizam a postura de ovos.

Tabela 2: Cepas *C. elegans* utilizadas neste trabalho

CEPA	GENÓTIPO	DESCRIÇÃO
N2		Tipo selvagem
CL4176	dvIs27[pAF29(<i>myo-3/A</i> -Beta 1-42/let UTR) + pRF4(<i>rol-6(su1006)</i>)].	Expressa o peptídeo β -amilóide humano no músculo de maneira induzível. Apresenta fenótipo de paralisia após indução.
CL802	pRF4(<i>rol-6</i>)	Controle para a cepa CL4176.
CL2006	dvIs2[pCL12(<i>unc-54</i> /human Abeta peptide 1-42 minigene) + pRF4].	Expressa o peptídeo β -amilóide humano no músculo de maneira constitutiva. Apresenta fenótipo de paralisia progressiva.
AM141	rmls133 [<i>unc-54p::Q40::YFP</i>]	Apresentam 44 repetições poliglutamínicas (PoliQ44) fundidas a uma proteína amarela fluorescente (YFP) nas células musculares, que formam agregados de maneira dependente da idade.
HA759	rtIs11 [<i>osm-10p::GFP</i> + <i>osm-10p::HtnQ150</i> + <i>dpy-20(+)</i>]	Expressa a proteína Htn-Q150 e uma proteína GFP nos neurônios ASH.
TJ735	gpls[<i>hsp-16::GFP</i>]	Expressa a chaperonina HSP16-2 fusionada a uma proteína verde fluorescente (GFP).
CF1553	muls84[(pAD76) <i>sod-3p::GFP</i> + <i>rol-6</i>]	Expressa a proteína SOD-3 fusionada a uma proteína verde fluorescente (GFP).
CL2166	dvIs19[(pAF15) <i>gst-4p::GFP::NLS</i>]	Expressa a proteína GST-4 fusionada a uma proteína verde fluorescente (GFP).

Após esse período, os vermes são retirados das placas, obtendo-se apenas os embriões.

3.5 Avaliação do desenvolvimento dos animais pela medida do comprimento corporal

Para avaliar se o EHG altera o desenvolvimento dos animais, vermes tipo selvagem (N2) sincronizados em L1 foram semeados em placas contendo ou não EHG nas concentrações de 10 mg/ml e 50 mg/ml e mantidos a 20°C por 48 horas, até atingirem o estágio larval L4. Nesta idade, 20 vermes de cada grupo foram microfotografados em microscópio óptico (Axio Imager Z2, Zeiss, NY, USA) e seu comprimento corporal analisado através do software AxioVision Rel. 4.8. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.6 Análise de organelas relacionadas ao lisossomo (LRO) coradas pelo corante Vermelho Nilo

Para avaliar se o EHG é tóxico para os animais, os níveis do corante Vermelho Nilo depositados nas organelas relacionadas ao lisossomo (LRO) foram mensurados. O corante foi adicionado às placas sobre o meio de cultura NGM, na concentração de 500 µg/mL. Após secarem, as placas foram mantidas *overnight* a 37°C, quando o EHG nas concentrações de 10 mg/ml e 50 mg/ml foi adicionado ou não às essas placas. Após este preparo, vermes tipo selvagem (N2) sincronizados em L1 foram semeados nas placas e mantidos a 20°C por 72 horas, até atingirem a idade de adulto de 1 dia. Nesta idade, 20 vermes de cada grupo foram microfotografados em microscópio óptico (Axio Imager Z2, Zeiss, NY, USA), e a fluorescência foi mensurada através do *software* NIH ImageJ. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.7 Ensaios de paralisia induzida pelo peptídeo β -amiloide humano

Para avaliar se o EHG é capaz de proteger o organismo contra a toxicidade induzida pelo peptídeo β -amiloide humano, dois modelos *C. elegans* para o Mal de Alzheimer foram utilizados: a cepa CL4176, que expressa o peptídeo β -amiloide de maneira induzível no músculo, e a cepa CL2006, que também expressa o peptídeo no músculo, mas de maneira constitutiva.

Os ensaios com a cepa CL4176 foram desenvolvidos de acordo com Dostal, Roberts e Link (2010). Cerca de 15 animais foram colocados em placas controle ou contendo EHG nas concentrações de 10 mg/ml e 50 mg/ml e deixados ovopor por cerca de 3 horas. Os embriões, sincronizados, foram então incubados por 40 horas a 16°C, momento no qual a expressão do peptídeo β -amiloide foi induzida por aumento da temperatura de cultivo dos animais para 25°C. Vinte e duas horas após a indução, 30 animais por grupo foram transferidos para novas placas e o fenótipo de paralisia passou a ser quantificado em intervalos de 2 horas, até que se completassem 30 horas. Durante todas as etapas, animais da cepa CL802, controle da cepa CL4176, foram mantidos sob as mesmas condições, de forma a demonstrar que os efeitos de paralisia eram decorrentes da toxicidade do peptídeo β -amilóide.

Nos ensaios com a cepa CL2006, os animais foram colocados em placas contendo ou não EHG nas concentrações já descritas e deixados ovopor overnight. Após 72 horas, 30 animais por grupo foram transferidos para novas placas e incubados a 35°C para acelerar o aparecimento do fenótipo de paralisia (REGITZ, DUSSLIN e WENZEL, 2014), que passou a ser quantificado em intervalos de 1 hora, durante 5 horas. Durante todo o experimento, animais tipo selvagem (N2) foram mantidos à 35°C para garantir que o fenótipo observado era decorrente apenas da toxicidade do peptídeo β -amiloide, e não do estresse térmico causado pelo aumento da temperatura.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.8 Quantificação da agregação poliglutamínica

O efeito do EHG sobre a agregação proteica foi observado em animais *unc-54p::Q40::YFP* (AM141), um modelo *C. elegans* para a Doença de Huntington que expressa, no músculo, 40 glutaminas fusionadas a uma proteína fluorescente amarela, o que permite a visualização de um padrão de agregação

dependente da idade em microscópio óptico de fluorescência. Basicamente, animais sincronizados em L1 foram semeados em placas contendo ou não EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/ml e incubados a 20°C por 72 horas, até que atingissem a idade de adulto de 1 dia. Nesse estágio, 20 animais por grupo foram microfotografados microscópio óptico (Axio Imager Z2, Zeiss, NY, USA) e o número de agregados proteicos por animal foi mensurado através do software NIH Image J. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.9 Ensaio de sobrevivência neuronal

Animais da cepa HA759, outro modelo *C. elegans* para a Doença de Huntington, foram utilizados para testar possíveis efeitos neuroprotetores do EHG. Essa cepa expressa, nos neurônios bilaterais ASH, a proteína HtnQ150, uma extensão poliglutamínica de 150 resíduos derivada da proteína Huntingtina humana (ZHANG et al, 2012). A toxicidade desta proteína pode ser acompanhada pela construção GFP também inserida nos neurônios ASH: a perda bilateral ou total da fluorescência observada por microscopia óptica é sinal de neurodegeneração. Nos experimentos, animais sincronizados em L1 foram colocados em placas contendo ou não EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/ml e incubados a 20°C por 6 dias até que atingissem a idade de adulto de 4 dias. Os animais foram então analisados em microscópio óptico de fluorescência quanto à expressão GFP nos neurônios ASH. Vários experimentos foram realizados até o alcance de um número amostral (n) suficiente de neurônios.

3.10 Ensaio de crescimento bacteriano

Para avaliar o efeito do EHG sobre o crescimento da bactéria *E. coli* OP50 utilizada como alimento dos animais, a bactéria foi crescida overnight e centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos a 4°C para formação de um pellet. Em seguida, foi ressuspensa com EHG nas concentrações de 10 mg/ml e 50 mg/ml, sendo utilizado como controle o meio Luria-Bertani (LB) puro (caseína 10g/L; extrato de levedura 5g/L; NaCl 10g/L -pH 7.0). Os tubos foram incubados à 37°C, e a densidade óptica (OD600) foi lida a cada 40 minutos até exceder OD=1,000. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.11 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) intracelular

Os experimentos de quantificação do ERO intracelular foram realizados em animais tipo selvagem (N2), para avaliar o efeito do EHG sobre o estado redox do organismo, e na cepa CL2006, para avaliar o efeito do EHG sobre a produção de ERO em animais que expressam o peptídeo β -amiloide humano. A sonda 2',7'- diclorodihidro-fluoresceína diacetato (H₂DCF-DA) foi utilizada como marcador.

Os animais tipo selvagem foram tratados ou não por 48 horas com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/ml. Atingido o estágio de vida L4, animais de cada grupo foram submetidos ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 5mM por 1 hora. Aqueles não submetidos ao estresse permaneceram em meio líquido M9 pelo mesmo período de tempo. Em seguida, cerca de 20 a 30 animais por grupo foram transferidos para microtubos contendo PBS + 1% Tween 20, lavados duas vezes e transferidos para uma placa de 96 poços – cada condição foi analisada em triplicata biológica e experimental. O H₂DCF-DA foi adicionado na concentração final de 50 μ M. A leitura da placa foi realizada a cada 30 minutos pelo período de 4 horas, no leitor de microplaca VICTOR X3 (Perkin Elmer, MA, USA), a 37°C e com excitação e emissão de 485 e 535nm, respectivamente.

Os animais da cepa CL2006 foram sincronizados por ovoposição *overnight* em placas contendo ou não EHG nas mesmas concentrações. Após 72 horas, quando atingiram a fase de vida de adulto de 1 dia, foram transferidos para microtubos contendo PBS + 1% Tween 20, lavados duas vezes e transferidos para uma placa de 96 poços – cada condição foi analisada em triplicata biológica e experimental. O H₂DCF-DA foi adicionado na concentração final de 50 μ M. A leitura da placa foi realizada a cada 30 minutos pelo período de 2 horas, no leitor de microplaca VICTOR X3 (Perkin Elmer, MA, USA), a 37°C e com excitação e emissão de 485 e 535nm.

3.12 Quantificação da atividade do proteassoma

a) Preparo do extrato proteico bruto

Para avaliar os efeitos do EHG sobre um dos sistemas de degradação proteica do organismo, a atividade do proteassoma em animais tratados ou não

com EHG nas concentrações de 10 mg/mL e 50 mg/mL foi mensurada. Primeiramente, cerca de 3000 animais tipo selvagem (N2) por grupo foram tratados ou não com EHG em ambas as concentrações citadas até atingirem a idade de adulto de 1 dia. Nesta idade, foram recolhidos das placas por lavagem com tampão M9, e transferidos para microtubos previamente tarados. Após a retirada do excesso de tampão M9, o peso dos animais em cada microtubo foi determinado, e um volume de tampão de homogeneização (Tris-HCl 5mM pH 8,0; glicerol 1%; EDTA 1 mM) correspondente à 3 vezes este peso foi adicionado. Além disso, adicionou-se também 10 µL do coquetel de inibidores de proteases Amresco (código M221). O material foi homogeneizado por sonicação, e centrifugado por 30 minutos a 20000 G (DE PAULA, 2013). Trabalhou-se com o sobrenadante. Os extratos foram armazenados a -80°C para posterior análise. Nestes casos, adicionou-se glicerol ao sobrenadante, para uma concentração final de 20%.

A concentração de proteínas em cada um dos extratos obtidos foi determinada através do método do BCA, segundo as recomendações do fabricante (QuantiPro™ BCA Assay Kit – SIGMA ALDRICH).

b) Determinação da atividade proteolítica exógena

A atividade do proteassoma foi determinada como “atividade semelhante à quimiotripsina”. Para tanto, foi utilizado o substrato fluorogênico Succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-4-metil-cumaril-7-amida (SLLVT-MCA). Para cada análise, foram utilizados 25 µg de proteínas totais, o tampão de reação composto por MgCl₂ 10 mM, DTT 1mM e Tris-HCl 50mM, além de 13 µM de substrato. As análises foram realizadas na presença e ausência do inibidor MG132 (Cbz-Leu-Leu-Leucinal), na concentração de 20 µM. O volume final da reação foi de 240 µL. As reações foram realizadas em microplacas, a 37°C por 60 minutos, sendo as leituras de fluorescência realizadas a cada 30 minutos pelo leitor de microplacas VICTOR X3 (Perkin Elmer, MA, USA), nos comprimentos de onda de 380 nm (excitação) e 440 nm (emissão). A atividade do proteassoma foi determinada como a diferença entre as atividades mensuradas na ausência e na presença do inibidor MG132, uma vez que este possui atividade inibidora específica da atividade do proteassoma.

3.13 Ensaio de resistência ao estresse térmico

Para avaliar de o EHG protege o organismo modelo contra o estresse térmico, potente indutor de danos proteicos, animais tipo selvagem (N2) foram submetidos ou não ao tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/ml por cerca de 44 horas. Após esse período, os animais foram transferidos para placas de tratamento ou não que continham, misturado ao meio NGM, a droga 5-fluoro-2'-deoxiuridina (FUdR), em uma concentração final de 12 µg/mL. Essa droga induz esterilidade parental no *C. elegans*, o que permitiu que os animais fossem tratados até a idade de adulto de 5 dias sem que precisassem ser transferidos diariamente de placas em decorrência da presença de progênie. Alcançada a idade de adulto de 5 dias, 10 animais foram transferidos para três placas por grupo e submetidos ao estresse térmico por aumento da temperatura de cultivo para 35°C. A sobrevivência dos animais foi avaliada após 6, 9 e 12 horas de estresse. Animais que “explodiam” ou dessecavam nas paredes das placas foram desconsiderados das contagens. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.14 Análise de genes repórteres

Os efeitos do EHG sobre a expressão da chaperonina HSP-16.2 e das enzimas de detoxificação SOD-3 e GST-4 foram analisados através do emprego de cepas transgênicas que expressam tais proteínas fusionadas a uma proteína verde fluorescente (GFP).

Animais da cepa TJ375, que expressam a chaperonina HSP-16.2, foram sincronizados em L1, semeados em placas contendo ou não EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/ml e mantidos a 20°C até o estágio larval L4. Os animais foram então submetidos ou não ao estresse térmico a 35°C por 1 hora, e deixados descansar por cerca de 20 horas. Após esse período, 20 animais por grupo foram analisados por microscopia óptica de fluorescência. Os experimentos foram realizados em triplicata. A expressão da chaperonina HSP-16.2 foi quantificada através do software NIH Image J e expressa como fluorescência por área relativa ao controle.

Os animais das cepas CF1553 e CL2166, que expressam respectivamente as enzimas SOD-3 e GST-4, também foram tratados ou não EHG até o estágio larval L4, e submetidos a duas diferentes condições de

estresse oxidativo: os animais da cepa CF1553 foram tratados ou não com H₂O₂ 3mM por 1 hora e os animais da cepa CL2166 foram tratados ou não com tert-butil hidroperóxido (t-BOOH), um análogo do peróxido de hidrogênio mais estável em meio líquido, na concentração de 7,5 mM por 1 hora. Após um período de descanso de 1 hora, ao qual os animais de ambas as cepas foram submetidos, 20 animais por grupo foram analisados por microscopia óptica de fluorescência no microscópio óptico (Axio Imager Z2, Zeiss, NY, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata. A expressão de ambas as enzimas foi quantificada através do software NIH Image J e expressa como fluorescência por área relativa ao controle.

3.15 Análise da expressão gênica

a) Extração de RNA

A extração do RNA dos animais das cepas CL4176, que expressam o peptídeo β-amilóide humano, foi realizada através de método adaptado de Chomczynsky & Sacchi (2006), conforme descrito por De Paula em 2014.

Para a cepa CL4176, cerca de 50 animais foram colocados em placas controle ou contendo EHG nas concentrações de 10 mg/ml e 50 mg/ml e deixados ovopor por cerca de 6 horas. Os embriões, sincronizados, foram então incubados por 40 horas a 16°C, momento no qual a expressão do peptídeo β-amilóide foi induzida por aumento da temperatura de cultivo dos animais para 25°C. Trinta horas após a indução, os animais foram submetidos à extração de RNA, conforme será descrito abaixo.

Para a extração, vale ressaltar que todos os materiais utilizados foram autoclavados por 40 minutos para a inativação de RNAses. As placas contendo os animais foram individualmente lavadas utilizando água tratada com dietilpírocarbonato (DEPC), substância que inativa RNAses presentes na amostra biológica, e os animais foram transferidos para microtubos estéreis. O conteúdo dos microtubos foi centrifugado e as amostras lavadas mais três vezes, de forma a se remover o excesso de bactéria OP50.

Após as lavagens, os microtubos foram centrifugados, o sobrenadante dispensado e ao pellet adicionado quantidade de BRAzol equivalente à quantidade de animais nos microtubos. O BRAzol é um detergente que lisa a

parede celular do *C. elegans*, permitindo o extravasamento do seu conteúdo celular, sem prejudicar a integridade de seus ácidos nucléicos. Após a adição do BRAzol, os microtubos foram invertidos de 3 a 5 vezes e submetidos a homogeneização por vórtex por 10 segundos. Em seguida, os microtubos foram mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos, para que se realizasse a extração. Os microtubos foram então centrifugados por 20 minutos a 16000G, a uma temperatura de 4°C, sendo o sobrenadante transferido para novos microtubos estéreis.

Ao sobrenadante adicionou-se quantidades equivalentes de clorofórmio UV/HPLC. A homogeneização em vórtex foi então realizada por 15 segundos, e após 3 minutos em temperatura ambiente, o conteúdo dos microtubos foi novamente centrifugado por 20 minutos a 16000G, a uma temperatura de 4°C. Após essa centrifugação, o conteúdo dos microtubos visivelmente se separava em duas fases: uma cristalina, superior, e outra azul e espessa, inferior. Um volume fixo da camada superior, cristalina, foi então transferido para novos microtubos, e a este adicionou-se o mesmo volume de isopropanol. Os microtubos foram invertidos 6 vezes para uma leve homogeneização e deixados em temperatura ambiente por 10 minutos, para precipitação do RNA. Os microtubos foram então centrifugados por 10 minutos a 13000G e 4°C. Após essa etapa, era possível visualizar a formação de um pellet de RNA no fundo dos tubos.

O sobrenadante foi retirado, e o RNA resultante lavado com quantidade equivalente de Etanol 70% (feito com água DEPC). Após centrifugação a 16000G por 5 minutos a uma temperatura de 4°C, o etanol foi removido, e os microtubos, contendo RNA, deixados secar em temperatura ambiente. Ao pellet de RNA resultante, adicionou-se 24 µL de água DEPC para ressuspensão. Para dissolução do RNA na água, os microtubos eram submetidos à banho-maria de 60°C por 10 minutos. As amostras foram armazenadas congeladas a -80°C. As extrações foram realizadas em triplicata.

b) Quantificação de RNA e verificação de sua integridade

A quantificação do RNA presente em cada amostra foi realizada através de espectrofotometria, que fornece além da concentração, informações sobre a

razão ácido nucleico/proteína (A260/A280). Apenas as amostras que apresentaram (A260/A280) maiores que 1,80 foram utilizadas nos experimentos.

A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose. De cada amostra de RNA, foi retirada uma alíquota contendo 10 µg de RNA total. A estas alíquotas foram adicionados 2 µL de tampão de coloração de formaldeído 10X (50% glicerol diluído em água DEPC; EDTA 10 mM pH 8,0; azul de bromofenol 0,25% m/v; xileno cianol 0,25% m/v) e 2 µL de brometo de etídio (200µg/mL). As amostras foram então aquecidas a 75°C durante 10 minutos, para que ocorresse a desnaturação do RNA, e em seguida, foram aplicadas em gel de agarose 1% (agarose 0,50g e TBE 1X 50mL), sendo submetidas à eletroforese por aproximadamente duas horas e meia a 80V. O gel foi submetido a uma pré-corrida, com voltagem de 70Vpor 10 minutos, antes de se aplicar as amostras nas canaletas.

TBE 1X foi utilizado como tampão de corrida na eletroforese. Toda a vidraria utilizada nesse processo passou previamente por uma lavagem e posterior aquecimento a 160°C por 3 horas, e a cuba e demais materiais sofreram tratamento com peróxido de hidrogênio 3 volumes para remoção de quaisquer RNAses que pudessem degradar as amostras carregadas.

Ao término da eletroforese, o gel foi visualizado em um transiluminador UV, no qual foi possível verificar o padrão de bandas de RNA comparado com um peso molecular de DNA. O gel foi fotografado para análise.

c) Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese do cDNA a partir do mRNA obtido foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Basicamente, 1500 ng de RNA foram pipetados para microtubos de 0,2mL, e a ele foram adicionados 2,0µL de 10X RTBuffer (tampão de reação), 0,8 µL de 25XdNTPMix, 2,0 µL de iniciadores aleatórios (Random Primers), 1,0 µL da enzima transcriptase reversa Multiscribe. O volume da reação foi completado para 20 µL com H2O DEPC. Esta solução foi submetida à reação de RT-PCR em um termociclador MG96+ (Biocycler), que consiste em uma etapa a 25°C por 10 minutos, seguida de 37°C por 120 minutos, e 85°C por 5 minutos. Este cDNA foi diluído para a concentração de 25 ng/µL

utilizando-se H₂O DEPC, e armazenado em freezer a -20° até a realização dos estudos de qPCR.

d) Iniciadores

Os iniciadores (*primers*) utilizados para o gene do peptídeo β -amilóide, *amy-1*, cuja sequência é F-CCGACATGACTCAGGATATGAAGT e R-CACCATGAGTCCAATGATTGCA, foram obtidos do estudo de Sangha et al (2012). O gene de referência endógena utilizado foi o *cdc-42*, que codifica uma RHO-GTPase e cuja sequência é F- CTGCTGGACAGGAAGATTACG e R-CTCGGACATTCTCGAATGAAG.

e) PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

As análises de PCR quantitativa em tempo real foram realizadas através do sistema de detecção de sequência 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) e o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). A amplificação por PCR foi realizada em placas de polipropileno para 96 reações (Axygen Scientific) cobertas com tampas para microplacas (Axygen Scientific) e em triplicata, utilizando-se 2,0 μ L (50 μ g) de cDNA, 4,3 μ L de H₂O MiliQ, 7,5 μ L de SYBR® Green (Applied Biosystems), e 1,2 μ L (20 μ M) do primer do gene-alvo, para um volume total de reação de 15 μ L. As amostras foram mantidas, na etapa inicial, a 95°C por 10 minutos (desnaturação inicial), na etapa seguinte, 40 ciclos, a 95°C por 1s (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão). O protocolo de dissociação foi realizado alternando a temperatura entre 95°C (15s), 60°C (1 minuto), 95°C (30 segundos) e 60°C (15 segundos).

A determinação da eficiência dos iniciadores foi realizada a partir de diluições seriadas de cDNA (500 ng, 50 ng, 5 ng e 0,5 ng) dos animais CL4176 e/ou de animais tipo selvagem (N2), com os parâmetros descritos acima. Da mesma forma, o mesmo protocolo descrito acima foi utilizado na definição do gene de referência. O nível de expressão de cada gene candidato foi comparado em todas as condições (controle e tratamento com 10 e 50 mg/mL de EHG).

A análise dos níveis de expressão dos genes foi realizada por meio do método de Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). O cálculo do $\Delta\Delta Ct$ é feito ao se subtrair a média dos valores do CT do gene de referência endógena da média do CT de

cada gene-alvo em cada condição. Dessa forma, obtém-se o primeiro Δ . O segundo Δ é obtido ao se subtrair o Δ encontrado na condição controle do gene-alvo do Δ desse mesmo gene nas demais condições. Elevando-se 2 à potência do valor negativo do $\Delta\Delta CT$, é possível determinar a alteração no nível de expressão de cada gene-alvo, quando comparado ao gene de referência endógena. O nível de expressão da referência endógena é normalizado em 1,00, uma vez que o seu $\Delta\Delta CT$ é igual a 0

3.16 Análise Estatística

Os dados obtidos neste trabalho foram compilados e analisados através do *software* GraphPad Prism, versão 5.0. Os dados foram avaliados quanto à sua normalidade (distribuição Gaussiana) através do teste de Kolmogorov-Smirnov. As análises estatísticas foram realizadas através do Teste t de Student, sendo $p \leq 0,05$ considerado significativo. Amostras que não apresentaram distribuição normal foram analisadas utilizando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, sendo $p \leq 0,05$ considerado significativo. Os experimentos que geraram dados de sobrevivência pelo tempo foram analisados através do teste estatístico Log Rank (Mantel-Cox).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Caracterização do Extrato Hidroalcoólico de Guaraná (EHG)

4.1.1 Caracterização fitoquímica por HPLC

A caracterização do EHG produzido neste estudo foi feita através da determinação dos compostos fitoquímicos que o compõe. As análises foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em parceria com a Dra. Cecília Nunez do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Os compostos quantificados foram escolhidos de acordo com a composição fitoquímica do guaraná (BITTENCOURT et al, 2013). Os fitoquímicos testados representam os 2 grupos que reconhecidamente predominam no guaraná: as catequinas e epicatequinas pertencem ao grupo dos polifenóis, reconhecidos por suas propriedades antioxidantes; enquanto a cafeína e a teobromina pertencem ao grupo das metilxantinas, associadas a propriedades estimulantes do sistema nervoso central. A Tabela 3 apresenta a quantificação em $\mu\text{g/mL}$ (ou mg/g) dos compostos fitoquímicos presentes no EHG. É possível observar que a cafeína é o fitoquímico presente em maior quantidade no extrato produzido (166,07 mg/g). O conteúdo de catequinas observado foi de 34,59 mg/g , enquanto o de epicatequinas foi de 36,35 mg/g . O fitoquímico em menor quantidade é a teobromina, cuja concentração no extrato produzido é de apenas 2,49 mg/g .

4.1.2 O EHG possui atividade antioxidante *in vitro*

Para avaliar se o Extrato Hidroalcoólico de Guaraná (EHG) produzido em nosso laboratório possui atividade antioxidante, a capacidade de três diferentes concentrações de EHG (5, 10 e 50 mg/ml) em neutralizar o radical DPPH foi determinada. De acordo com os resultados (Figura 7), é possível observar que todas as concentrações testadas de EHG possuem considerável capacidade antioxidante, neutralizando o radical DPPH em níveis que variaram de 48,30 a 54,37% de inibição. É interessante notar que o efeito não foi dose dependente, e, inclusive, a menor concentração (5 mg/mL) demonstrou uma maior capacidade antioxidante. Comparado ao padrão, pode-se determinar a capacidade antioxidante do EHG, para as três concentrações, como equivalente a 500 μM de Trolox.

Tabela 3: Concentração de compostos fitoquímicos no Extrato Hidroalcoólico de Guaraná (EHG) determinada por HPLC.

Compostos	Tempo de retenção[‡]	Média (µg/mL)[†]	Teor (%)[*]	Desvio Padrão (DP)
Cafeína	3,747	166,07	16,61	10,61
Teobromina	8,255	2,49	0,25	0,62
Catequina	12,463	34,59	3,46	10,11
Epicatequina	15,684	36,25	3,63	9,65

* g do composto em 100 g do extrato.

† também pode ser apresentado como mg/g de extrato.

‡ em minutos.

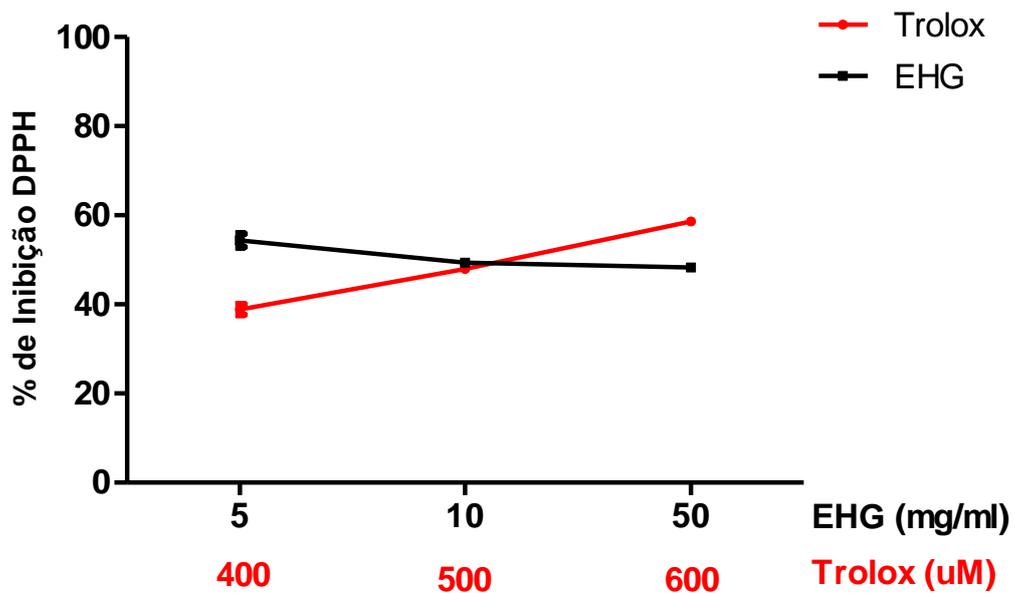


Figura 7 – Comparação da inibição do radical DPPH pelo EHG nas concentrações de 5, 10 e 50 mg/mL e pelo padrão Trolox.

4.2 O EHG não interfere no desenvolvimento dos animais

Uma vez que não foi observada diferença na capacidade antioxidante do EHG em diferentes concentrações, optou-se por escolher as concentrações que seriam utilizadas nos testes *in vivo* baseando-se na dose máxima tolerada, ou seja, a maior dose que apresentasse efeitos benéficos sem apresentar efeitos tóxicos. Neste sentido, as duas maiores doses (10 e 50 mg/mL) tiveram sua toxicidade demonstrada experimentalmente através da avaliação do seu efeito sobre o desenvolvimento dos animais. Animais em estágio larval L4 tratados ou não com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL foram microfotografados e tiveram seu tamanho corporal mensurado através do *software* AxioVision Rel. 4.8. Na Figura 8, é possível observar que nenhuma das duas concentrações testadas provocou diminuição do tamanho corporal, ou seja, nenhuma das concentrações interferiu negativamente no desenvolvimento dos animais. Os resultados indicam, portanto, que o EHG nas concentrações escolhidas não é tóxico para o *C. elegans*. Considerando que ambas as concentrações não foram tóxicas, ambas foram utilizadas nos demais experimentos.

4.3 O EHG diminui o acúmulo do corante Vermelho Nilo nos animais

O corante vermelho Nilo foi utilizado como um segundo marcador da possível toxicidade do EHG sobre o organismo modelo. De acordo com a literatura, um aumento de organelas relacionadas ao lisossomo (LRO) coradas pelo vermelho Nilo poderia ser relacionado à uma diminuição no tempo de vida dos animais, e portanto, à um efeito tóxico. Já uma diminuição nas mesmas estruturas seria um marcador de aumento de longevidade, e portanto, poderia representar um efeito benéfico do EHG a longo prazo (O'ROURKE *et al*, 2009; SOUKAS *et al*, 2009). Para testar esta hipótese, animais tipo selvagem (N2) foram mantidos em placas contendo ou não EHG nas concentrações de 10 mg/mL e 50 mg/mL, além do corante, até atingirem a idade de adulto de 1 dia, quando foram microfotografados. Os níveis de fluorescência foram mensurados através do *software* ImageJ, e os resultados da Figura 9 demonstram que o tratamento com EHG, em ambas as concentrações, diminui de maneira significativa os níveis do corante vermelho Nilo. A redução foi de 59,88% nos animais tratados com 10 mg/mL de EHG, e atingiu 67,53% de redução naqueles tratados com 50 mg/mL de EHG. Os

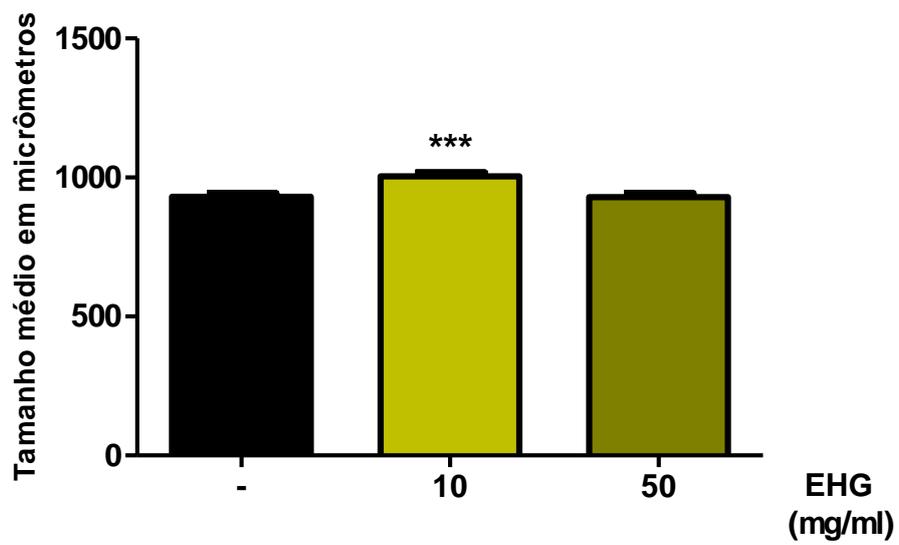


Figura 8 - Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre o desenvolvimento dos animais. *** $p < 0,0001$, determinado pelo teste de Mann Whitney

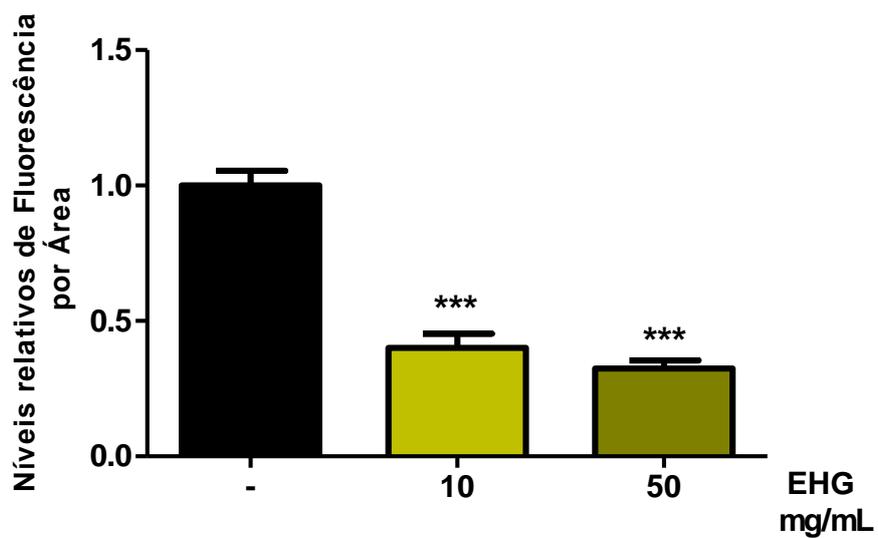


Figura 9 – Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre os níveis de organelas relacionadas ao lisossomo coradas pelo corante vermelho Nilo em animais tipo selvagem (N2). *** $p < 0,0001$ determinado pelo Teste Mann Whitney.

resultados sugerem, portanto, que o EHG, além de não ser tóxico para os animais, apresenta um potencial efeito benéfico, uma vez que altera de maneira positiva marcadores biológicos associados à longevidade.

4.4 O EHG atenua a paralisia induzida pela toxicidade do peptídeo β -amilóide humano em modelos *C. elegans* para o Mal de Alzheimer

Considerando que o extrato de guaraná é amplamente consumido sob alegações de propriedades estimulantes do sistema nervoso central (SNC), bem como considerando os dados da literatura que demonstram que ele possui efeitos benéficos em modelos *in vitro* relacionados a doenças neurodegenerativas, o presente estudo teve como objetivo investigar se o guaraná teria algum efeito benéfico sobre fenótipos induzidos por marcadores de doenças neurodegenerativas em um modelo *in vivo*.

Em primeiro lugar, o efeito benéfico do EHG foi testado em modelos *C. elegans* para o Mal de Alzheimer, doença neurodegenerativa que, de acordo com a teoria da cascata amiloide, está diretamente relacionada à toxicidade de uma proteína específica, o peptídeo β -amilóide. Tais modelos expressam uma construção transgênica contendo o peptídeo β -amilóide humano (β A), seja de maneira constitutiva (cepa CL2006), ou de maneira induzida pela temperatura (cepa CL4176). Em ambos os casos, a expressão do β A é direcionada para as células musculares, implicando em um fenótipo de paralisia progressiva.

A cepa CL2006 expressa o peptídeo β A desde os primeiros estágios larvais, sendo o fenótipo de paralisia dependente da idade. Para acelerar o aparecimento de tal fenótipo, os animais adultos de 1 dia tratados ou não com EHG 10 e 50 mg/mL foram mantidos em temperatura de 35°C durante as 5 horas de experimento. Na Figura 10, é possível observar que o tratamento com EHG foi capaz de retardar o aparecimento do fenótipo de paralisia no grupo de animais tratados com 50 mg/mL de EHG: apenas no tempo de 3 horas foi possível observar animais paralisados, em contraste com o grupo controle, onde era possível observar animais paralisados no tempo de 1 hora. Além disso, o tratamento com ambas as concentrações de EHG diminuiu a proporção de animais paralisados ao fim do experimento de maneira significativa: enquanto o grupo controle apresentava apenas 23,66% de animais não paralisados, o grupo

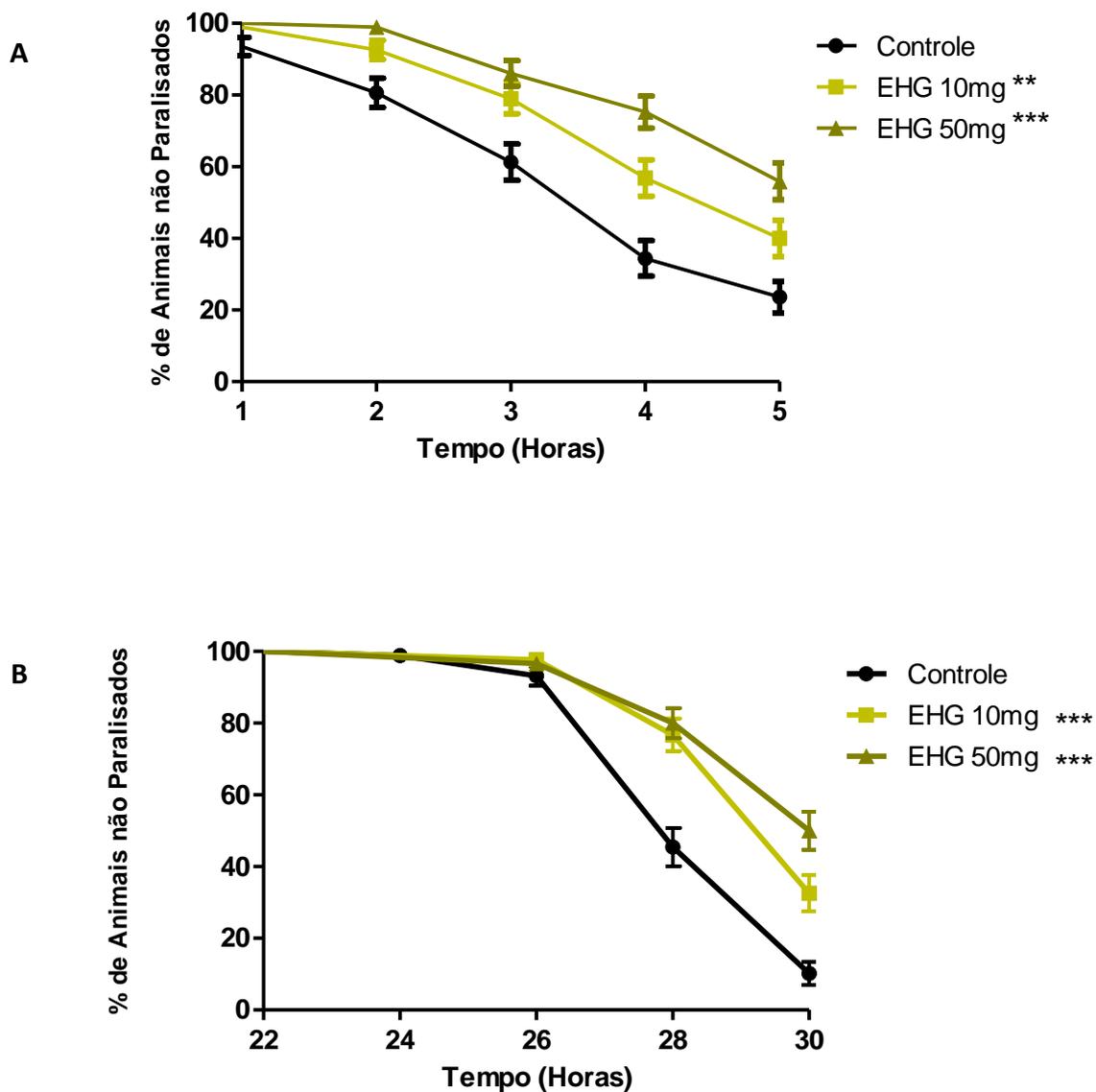


Figura 10 – Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre o fenótipo de paralisia induzido pela toxicidade do peptídeo β - amiloide humano. (A) Efeito do EHG sobre o modelo *C. elegans* CL2006. ** $p = 0,002$ e *** $p < 0,0001$ determinados pelo teste Log Rank (Mantel-Cox). (B) Efeito do EHG sobre o modelo *C. elegans* CL4176. *** $p < 0,0001$ determinado pelo teste Log Rank (Mantel-Cox).

tratado com EHG na concentração de 10 mg/mL apresentava 40,00% de animais não paralisados, e o grupo tratado com 50 mg/mL de EHG contava com 55,91% de animais não paralisados.

Uma das limitações da utilização do modelo CL2006 é a dificuldade de diferenciar se os efeitos benéficos de determinado composto se relacionam tão somente à modulação da toxicidade do peptídeo β A ou se estes efeitos são devidos à uma modulação do processo de envelhecimento, já que a expressão do β A é dependente da idade. Neste sentido, o uso da cepa CL4176 é vantajoso já que nestes animais o peptídeo β A é expresso de maneira rápida e reproduzível, com 100% de penetrância, em animais jovens (L4) (LUBLIN e LINK, 2013). A Figura 10 demonstra que o tratamento dos animais CL4176 com EHG em ambas as concentrações também foi efetivo na diminuição da toxicidade do peptídeo β A: foi possível observar um retardo de 2 horas no aparecimento do fenótipo de paralisia em ambas as concentrações, além da diminuição da proporção de animais paralisados ao final do experimento: o grupo controle contava com 10,23% de animais não paralisados após 30 horas de indução da expressão do β A, enquanto o grupo tratado com EHG na concentração de 10 mg/mL contava com 32,56% de animais não paralisados, e o grupo tratado com EHG na concentração de 50 mg/mL apresentava 50,00% de animais não paralisados.

Os dados demonstram, portanto, que o EHG é capaz de proteger o organismo dos efeitos tóxicos do peptídeo β A, sugerindo uma capacidade de modular fenótipos dependentes do peptídeo β -amilóide humano.

4.5 O EHG diminui a agregação de proteínas poliglutamínicas em modelo *C. elegans* para a Doença de Huntington

A Doença de Huntington é uma doença monogênica que, assim como o Mal de Alzheimer, está relacionada à toxicidade decorrente da agregação de uma proteína específica. Neste caso, uma mutação no gene da proteína Huntingtina provoca a expansão de repetições do aminoácido glutamina no eixo proteico (denominada expansão poliglutamínica ou PoliQ). Modelos *C. elegans* expressando expansões PoliQ fundidas a genes repórteres foram construídos de forma a permitir um melhor entendimento desta doença. Esses animais apresentam um fenótipo de agregação protéica dependente do número de

repetições PoliQ e da idade. Neste estudo, um modelo *C. elegans* expressando uma repetição de 40 glutaminas (PoliQ40) no tecido muscular foi utilizado para avaliar se o EHG teria efeitos benéficos sobre a agregação de proteínas poliglutamínicas, relacionando portanto seu uso a uma segunda doença neurodegenerativa, a DH. Animais adultos de 1 dia tratados ou não com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL foram microfotografados em microscópio óptico de fluorescência e o número de agregados proteicos mensurado através do *software* ImageJ. De acordo com os resultados observados na Figura 11, o EHG demonstrou ser capaz de diminuir o número médio de agregados proteicos de maneira significativa: enquanto os animais do grupo controle apresentavam uma média de 78,45 agregados, os animais tratados com EHG 10 mg/mL apresentavam uma média de 70,29 agregados e os animais tratados com EHG 50 mg/mL, 65,27 agregados. Estes resultados sugerem que o EHG é capaz de interferir no padrão de agregação de proteínas poliglutamínicas expressas no músculo do organismo modelo *C. elegans*.

4.6 O EHG atenua a degeneração neuronal em um modelo *C. elegans* para a Doença de Huntington

Ainda que os modelos utilizados anteriormente expressem fenótipos decorrentes de proteínas envolvidas na patogênese de doenças neurodegenerativas, uma clara limitação de seu uso no estudo de doenças do SNC é o fato de tais proteínas serem expressas no tecido muscular do modelo. Neste sentido, a cepa HA759, que expressa a proteína Huntingtina humana (Htn) com uma expansão de 150 glutaminas (Q150) e uma proteína verde fluorescente nos neurônios ASH, foi utilizada neste estudo para avaliar se o EHG ainda teria efeitos benéficos quando a expressão da proteína tóxica se concentrasse no neurônio, ou seja, no sistema nervoso do animal. Os neurônios ASH são dois neurônios bilaterais situados na região anterior do verme. A expressão da proteína Htn causa a morte destes neurônios de maneira dependente da idade. Essa neurotoxicidade pode ser visualizada pela perda da fluorescência bilateral ou total. Assim, os animais da cepa HA759 foram tratados ou não com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL até atingirem a idade de adulto de 4 dias, e então foram avaliados em microscópio óptico de fluorescência.

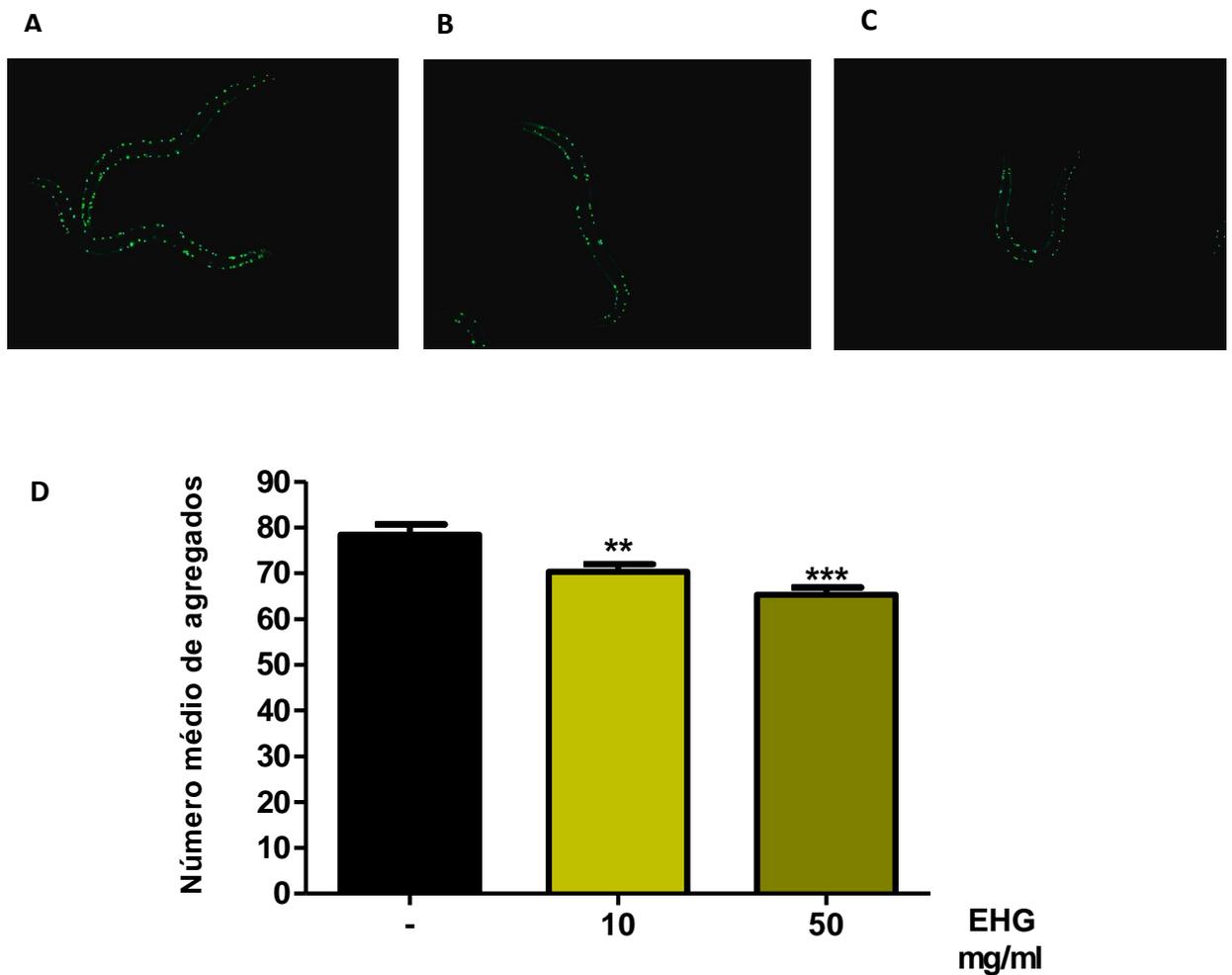


Figura 11 – Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre o a formação de agregados poliglutamínicos na cepa *unc-54p::Q40::YFP*. Microfotografias de animais *unc-54p::Q40::YFP* adultos de 1 dia (A) sem tratamento, (B) tratados com EHG 10 mg/mL e (C) tratados com EHG 50 mg/mL. (D) Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre a agregação de proteínas poliglutamínicas em modelo *C. elegans* PoliQ40. ** p = 0,0040 e *** p < 0,0001 determinado pelo Teste T de Student.

Foram observados cerca de 70 animais por grupo, e a sobrevivência neuronal contabilizada como sendo 100% quando foram observados 2 neurônios ASH, 50% quando foi observado apenas 1 neurônio e 0% quando nenhum neurônio ASH era visível – Figura 12 (A, B e C, respectivamente). Como demonstrado na Figura 12, apenas a concentração de EHG de 10 mg/mL mostrou efeito benéfico, uma vez que os animais deste grupo apresentaram 76,4% de sobrevivência neuronal, contra 67,6% do grupo controle. Os animais tratados com EHG 50 mg/mL apresentaram 65,5% de sobrevivência neuronal, sendo que essa leve diminuição não foi estatisticamente significativa. Os resultados sugerem que os potenciais efeitos benéficos do EHG também são capazes de atingir os neurônios, protegendo estes contra a toxicidade induzida por uma proteína envolvida na patogênese de uma doença neurodegenerativa.

4.7 O EHG não age através de efeitos bacteriostáticos ou bactericidas

É sabido que a bactéria *Escherichia coli* OP50 utilizada como alimento dos modelos *C. elegans* apresenta certo grau de patogenicidade para o mesmo (PIETSCH et al, 2011). Sendo assim, alguns compostos testados no *C. elegans* podem apresentar capacidade de melhoria de alguns fenótipos não por atuarem diretamente nas vias envolvidas, mas por diminuírem a patogenicidade da *E. coli* através de efeitos bacteriostáticos ou bactericidas.

Portanto, para avaliar se os efeitos benéficos demonstrados pelo EHG estavam relacionados com a diminuição da patogenicidade da bactéria utilizada como alimento dos animais, o efeito do EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre o crescimento bacteriano foi testado. A bactéria *E. coli* foi incubada em meio LB puro (controle) e contendo cada uma das concentrações de EHG durante 5 horas, e seu crescimento foi mensurado através da leitura espectrofotométrica da densidade óptica (OD600). De acordo com a Figura 13, é possível observar que o EHG produzido neste estudo não possui qualquer atividade bacteriostática ou bactericida, já que não influenciou, de maneira significativa, o crescimento da *E. coli*. Os resultados sugerem, portanto, que o efeito benéfico do EHG sobre os fenótipos induzidos por proteínas tóxicas não está relacionado com a diminuição da patogenicidade da bactéria utilizada como alimento dos vermes.

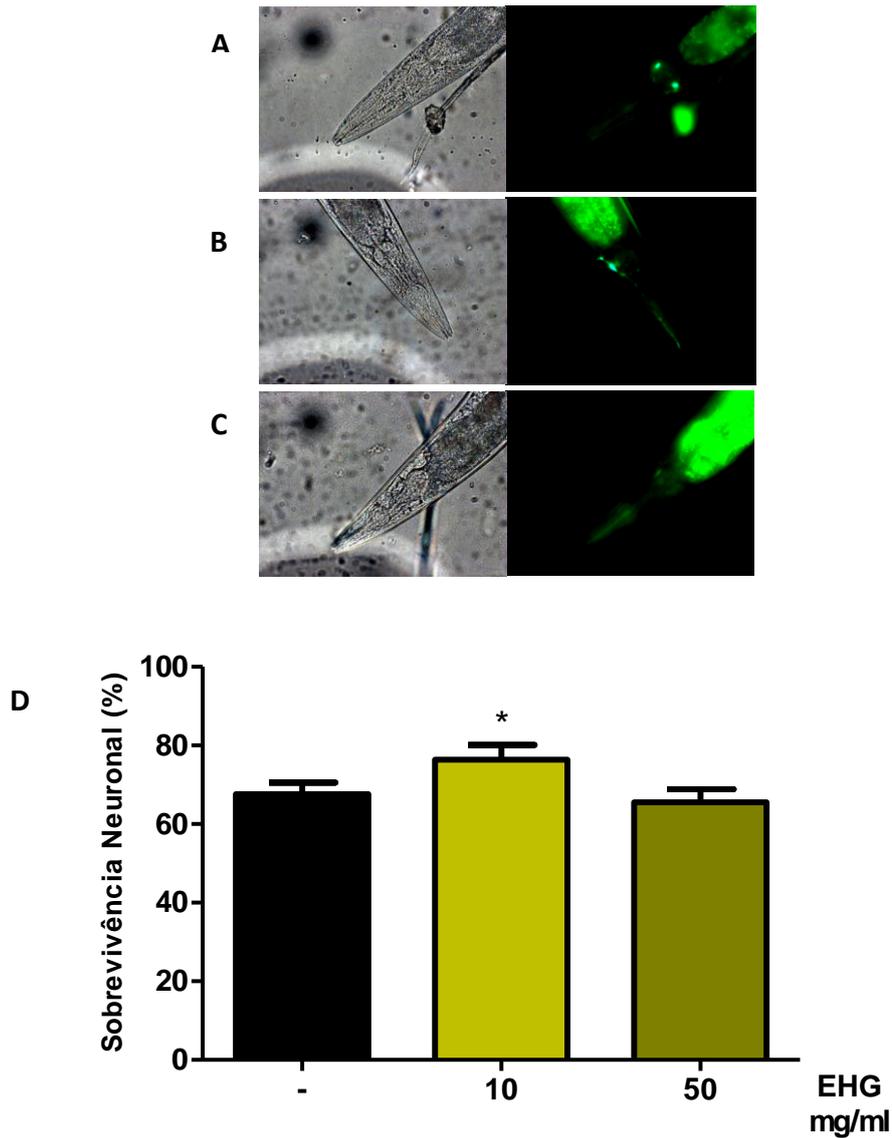


Figura 12 – Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre a degeneração do neurônio ASH na cepa HA759. Sobrevivência neuronal avaliada ao microscópio óptico de fluorescência: (A) 100% de sobrevivência correspondem a 2 neurônios visíveis, (B) 50% a 1 neurônio visível, (C) 0% a nenhum neurônio visível. (D) Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre a sobrevivência de neurônios expressando a proteína neurotóxica Htn. * $p = 0,0483$ determinado pelo Teste Mann Whitney.

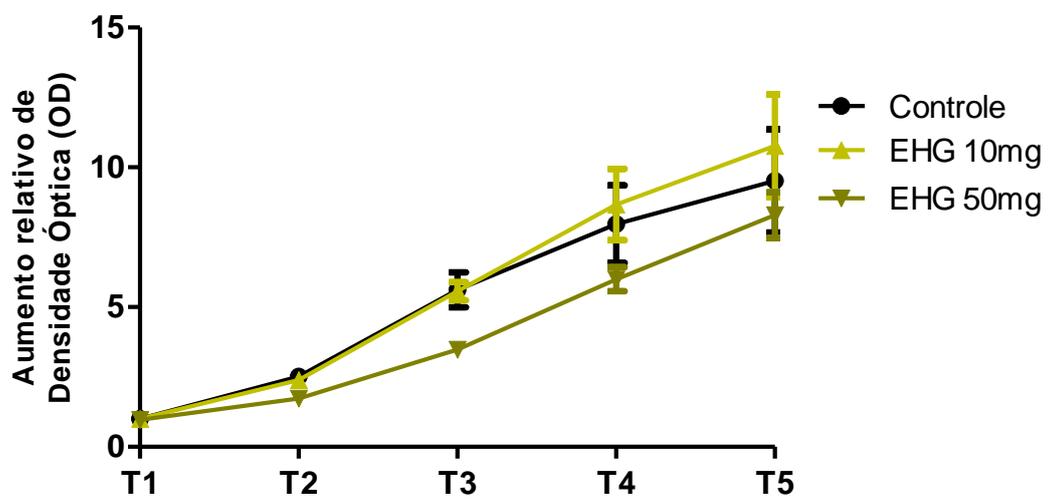


Figura 13 – Efeito do EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre o crescimento da bactéria *Escherichia coli* OP50, utilizada como alimento dos vermes. Estatística determinada pelo Teste T de Student.

4.8 O EHG altera o estado REDOX do organismo

Considerando que os efeitos benéficos do EHG não estavam relacionados à diminuição da patogenicidade da bactéria *E. coli*, duas outras hipóteses foram levantadas: na primeira hipótese, o EHG agiria através de suas propriedades antioxidantes, diminuindo o estresse oxidativo gerado pela presença de proteínas mal formadas e de seus agregados. Na segunda hipótese o EHG seria capaz de alterar a homeostase proteica, e, de alguma forma, aumentar a degradação ou diminuir a síntese das proteínas tóxicas causadoras dos fenótipos observados

O estresse oxidativo está associado à morte neuronal durante a patogênese de várias doenças neurodegenerativas, incluindo o Mal de Alzheimer e a Doença de Huntington (JOHSON et al, 2008). Aumento nos níveis de ERO já foram associados com a expressão do peptídeo BA, inclusive em modelos *C. elegans* (DRAKE, LINK e BUTTERFIELD, 2003; SMITH e LUO, 2003). Considerando os dados da literatura que apresentam as propriedades antioxidantes do guaraná, bem como o fato do EHG produzido neste estudo ter apresentado capacidade antioxidante *in vitro*, testou-se se o EHG agiria através do balanceamento do estado REDOX do organismo, reduzindo as espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou aumentando as defesas do organismo contra o estresse oxidativo.

4.8.1 O EHG diminui os níveis ERO em condições normais e de estresse oxidativo induzido

Os efeitos antioxidantes *in vivo* do EHG foram avaliados através da medida dos níveis intracelulares de ERO em modelos *C. elegans* tipo selvagem (N2). Avaliou-se tanto a capacidade do EHG em reduzir os níveis de ERO do organismo em condições normais, quanto em condições de estresse oxidativo induzido pelo tratamento com 5mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 1 hora. Basicamente, animais tratados ou não com EHG até o estágio larval L4 foram submetidos ou não ao estresse e então incubados em microplacas com a sonda H₂DCFDA, cuja oxidação produz fluorescência detectável por leitor de microplacas. A leitura foi realizada durante 4 horas.

De acordo com a Figura 14, é possível observar que, em condições normais, apenas a concentração de EHG 50 mg/mL foi capaz de reduzir os

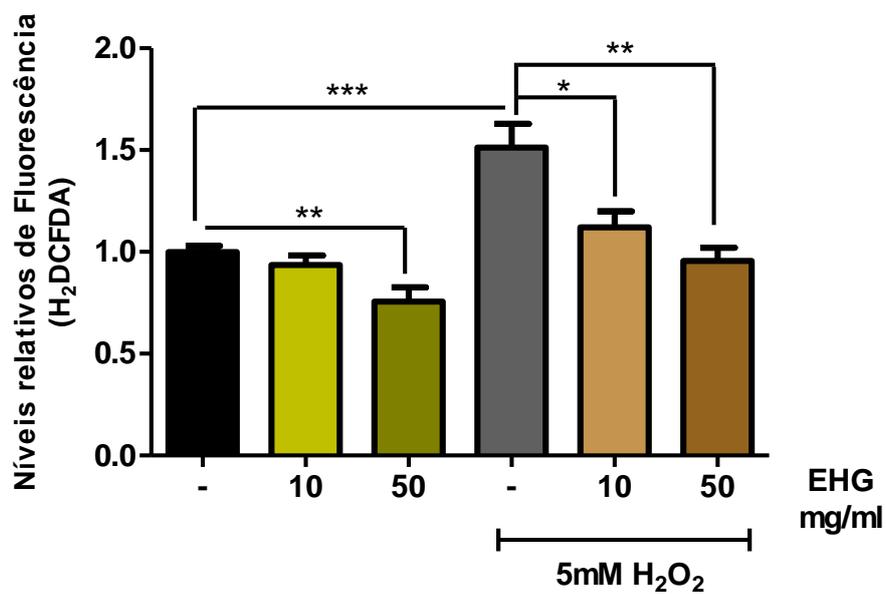


Figura 14 – Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) de animais tipo selvagem submetidos às condições normais e de estresse oxidativo induzido por 5mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). * p = 0,0244; ** p = 0,0064 e 0,0012, respectivamente; *** p = 0,0006, determinados pelos Testes T de Student e Mann Whitney.

níveis de ERO de maneira significativa, diminuindo em 24,42% a fluorescência mensurada. Já na situação de estresse oxidativo induzido por H₂O₂, ambas as concentrações de EHG foram capazes de diminuir os níveis de ERO: o tratamento com 10 mg/mL de EHG reduziu os níveis de ERO em 39,2% em relação ao controle também submetido ao estresse, enquanto o tratamento com 50 mg/mL de EHG reduziu os níveis em 55,71% em relação aos animais controle sob condição de estresse, atingindo, inclusive, níveis de ERO inferiores aos animais do grupo controle sob condições normais.

Estes resultados indicam que o EHG possui, além da capacidade antioxidante *in vitro*, significativa capacidade antioxidante *in vivo*.

4.8.2 O EHG diminui os níveis de ERO em animais que expressam o peptídeo β -amilóide

Os efeitos antioxidantes *in vivo* do EHG também foram avaliados em animais que expressam o peptídeo β -amilóide. Animais da cepa CL2006 que expressam o peptídeo β A de maneira constitutiva desde os primeiros estágios larvais, foram tratados ou não com EHG até atingirem a idade de adulto de 1 dia, quando foram então transferidos para microplacas contendo a sonda fluorescente H₂DCFDA, sendo os níveis de ERO mensurados durante 2 horas. Os resultados obtidos (Figura 15) demonstram que o EHG possui a capacidade de reduzir o estresse oxidativo também na presença do peptídeo β A, já que o tratamento com EHG na concentração de 10 mg/mL promoveu uma redução de 13,50% dos níveis de ERO, enquanto o tratamento com a concentração de 50 mg/mL foi capaz de reduzir os níveis de ERO em 24,18%.

4.8.3 O EHG diminui a expressão de GST-4 sob condições de estresse

Para avaliar se os efeitos antioxidantes do EHG estariam relacionados à sua capacidade de modular a expressão de enzimas antioxidantes, a expressão de duas enzimas envolvidas na manutenção do estado REDOX do organismo foi avaliada. No modelo *C. elegans* CL2166, a fusão do gene da proteína GST-4 ao gene de uma proteína repórter permite que a expressão de GST-4 seja acompanhada *in vivo* através de microscopia óptica de fluorescência.

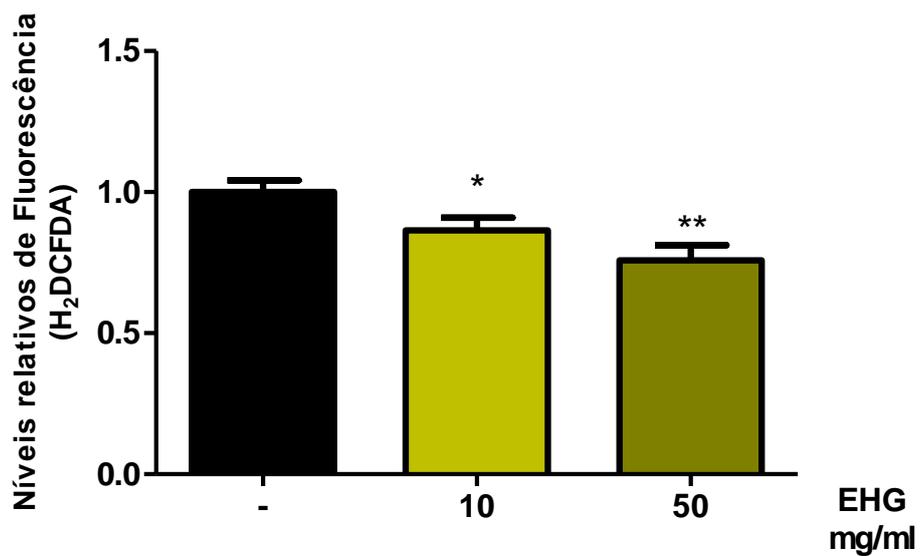


Figura 15 – Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) em animais da cepa CL2006, que expressam o peptídeo β -amilóide de maneira constitutiva no músculo. * $p = 0,0440$ e ** $p = 0,0033$, determinados pelo Teste T de Student.

Assim, animais da cepa CL2166 foram tratados ou não com EHG nas concentrações de 10 mg/mL e 50 mg/mL até atingirem o estágio larval L4. Neste estágio, parte dos animais de cada grupo foi submetido à situação de estresse oxidativo induzido por tratamento em solução contendo 7,5mM de *t*-BOOH, um análogo mais estável do peróxido de hidrogênio. Após 1 hora de estresse, os animais foram deixados descansar por 1 hora em placa contendo ou não o respectivo tratamento, e então microfotografados, sendo a fluorescência mensurada através do *software* ImageJ. De acordo com os resultados, mostrados na Figura 16, é possível observar que o EHG não é capaz de alterar, de maneira significativa, a expressão de GST-4 em condições normais. Já em condições de estresse oxidativo, o tratamento com EHG em ambas as concentrações reduz, de maneira significativa, a expressão da enzima.

4.8.4 O EHG aumenta a expressão da proteína SOD-3 em condições normais

A enzima superóxido dismutase, cuja ortóloga se denomina SOD-3 em *C. elegans*, é uma enzima envolvida no metabolismo de espécies reativas de oxigênio, sendo responsável pelo catabolismo de ânions superóxido. O modelo *C. elegans* CF1553 expressa a enzima SOD-3 fusionada à uma proteína verde fluorescente, o que permite acompanhar sua expressão *in vivo* através de microscopia óptica de fluorescência. Para avaliar se os efeitos antioxidantes do EHG poderiam ser mediados pelo aumento da expressão desta enzima, animais da cepa CF1553 foram tratados ou não com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL até atingirem o estágio larval L4. Nesta idade, parte dos animais de cada grupo foram submetidos à situação de estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na concentração de 3mM por 1 hora, e após 1 hora de descanso, foram microfotografados, sendo a expressão relacionada aos níveis de fluorescência mensurados através do *software* ImageJ. De acordo com os resultados apresentados na Figura 17, é possível observar que o EHG aumenta, em condições normais, a expressão de SOD-3. O aumento foi de 33,8% nos animais tratados com 10 mg/mL de EHG, enquanto um aumento de 37,5% foi observado para os animais tratados com 50 mg/mL de EHG. Sob condições de estresse oxidativo, nenhuma diferença significativa foi observada entre os animais tratados e os animais do grupo controle.

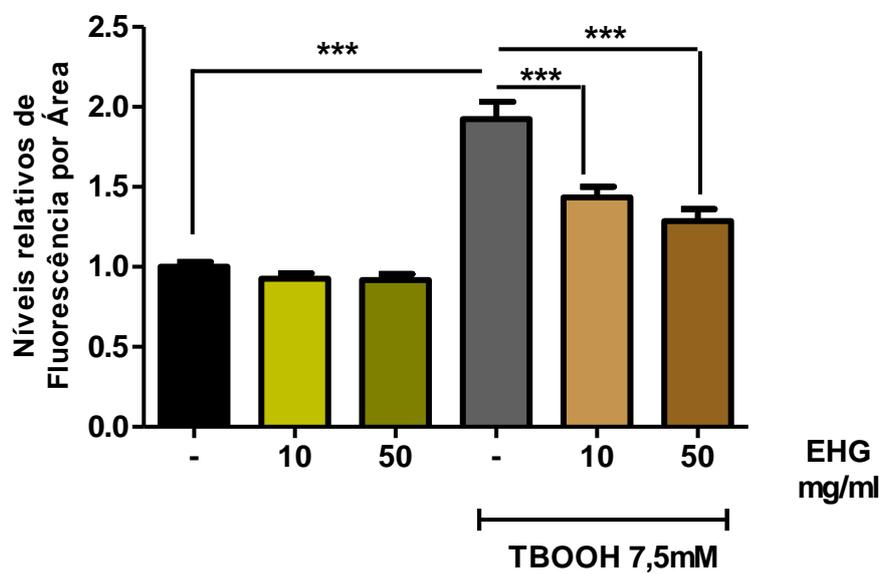


Figura 16 – Efeito do EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre a expressão da enzima antioxidante GST-4 em condições normais e de estresse oxidativo induzido por exposição à TBOOH na concentração de 7,5mM. *** $p < 0,0001$ determinado pelo Teste Mann-Whitney.

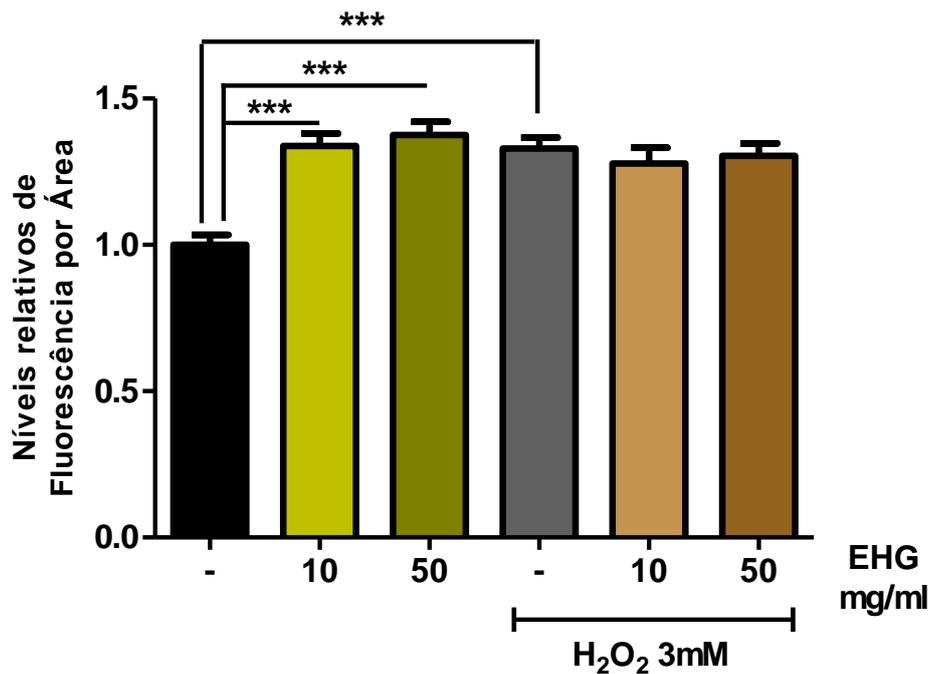


Figura 17 – Efeito do EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre a expressão da enzima antioxidante SOD-3 em condições normais e de estresse oxidativo induzido por exposição à H₂O₂ na concentração de 3mM. *** p < 0,0001 determinado pelo Teste T de Student.

4.9 O EHG interfere na homeostase proteica

Na segunda hipótese do mecanismo de ação, o EHG seria capaz de alterar a homeostase proteica, e, de alguma forma, diminuir a síntese ou aumentar a degradação das proteínas tóxicas causadoras dos fenótipos observados. De fato, alterações da homeostase proteica como o aumento da atividade do proteassoma e o aumento da expressão de chaperoninas já foram associadas à atenuação de fenótipos decorrentes da proteotoxicidade (HASSAN et al, 2009; WU et al, 2010; FONTE et al, 2008; NOLLEN et al, 2004)

Para testar esta hipótese, avaliou-se o efeito do EHG sobre quatro parâmetros relacionados à homeostase proteica: a resistência ao estresse térmico, a transcrição do peptídeo β A, a expressão de chaperoninas, a atividade do proteassoma.

4.9.1 O EHG aumenta a resistência do organismo ao estresse térmico

Em um primeiro momento, com o objetivo de se confirmar se, de fato, o EHG poderia ter alguma influência sobre a homeostase proteica, um experimento biológico foi conduzido para avaliar os efeitos do EHG sobre a resistência ao estresse térmico, um conhecido indutor de estresse e dano proteico. O estresse térmico foi induzido por aumento da temperatura de cultivo dos animais, de 20°C para 35°C. Animais adultos de 5 dias foram colocados em placas contendo 10 animais por grupo, e mantidos à 35°C por 12 horas, sendo a sobrevivência mensurada nos tempos de 6, 9 e 12 horas. De acordo com a Figura 18, é possível observar que o tratamento com EHG em ambas as concentrações de 10 e 50 mg/mL foi capaz de aumentar significativamente a resistência dos animais: no tempo de 12 horas, todos os animais do grupo controle já haviam morrido em decorrência do estresse térmico, enquanto 17,01% e 25,70% dos animais ainda estavam vivos nos grupos tratados com 10 mg/mL e 50 mg/mL de EHG, respectivamente. Estes resultados indicam que o EHG é capaz de proteger o organismo em uma situação que induz danos a proteínas, dando suporte à hipótese de que o EHG pode modular a homeostase proteica.

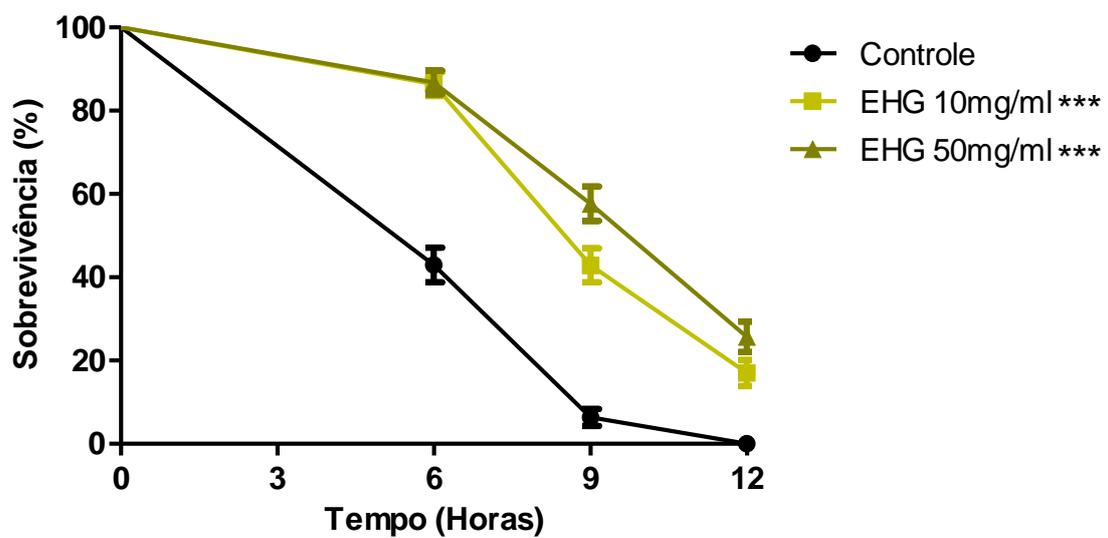


Figura 18 – Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre a resistência ao estresse térmico induzido por aumento da temperatura de cultivo para 35°C por 12 horas. *** $p < 0,0001$ determinado pelo teste Log Rank (Mantel-Cox).

4.9.2 O EHG não altera a transcrição do peptídeo β -amilóide

Um possível mecanismo através do qual o EHG poderia alterar a homeostase proteica seria através de um efeito pré-traducional, diminuindo a transcrição ou aumentando a degradação do mRNA da proteína tóxica de interesse. Dessa forma, uma menor quantidade da proteína estaria presente nos animais tratados com EHG, e, portanto, um fenótipo mais brando seria observado. Este efeito pode ser mensurado através de qPCR, onde os níveis do mRNA de determinada proteína podem ser quantificados em tempo real. Neste trabalho, os níveis do peptídeo β -amilóide foram determinados em animais tratados ou não com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL. Basicamente, animais da cepa CL4176, que expressam o peptídeo β A de maneira induzível no músculo, foram submetidos às mesmas condições do experimento de paralisia. Entretanto, ao atingirem 30 horas pós indução da expressão do peptídeo β A, foram submetidos à extração de RNA para obtenção de cDNA e posterior realização da qPCR. O método de análise foi o de expressão ou quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), e apenas mudanças de no mínimo dois ciclos (ou seja, valores relativos abaixo de 0,5 ou acima de 2) foram consideradas significativas.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 19, é possível afirmar que o EHG não possui efeito sobre a transcrição ou a degradação do mRNA do peptídeo β A, uma vez que não foi capaz de alterar seus níveis. Como as diferenças observadas não superaram dois ciclos, estas não foram consideradas significativas. Dessa forma, sugere-se que qualquer alteração da homeostase proteica causada pelo EHG acontece em estágios posteriores à tradução do peptídeo β -amilóide.

4.9.3 O EHG aumenta a expressão da chaperonina HSP-16 sob condições normais e de estresse térmico

Chaperoninas fazem parte da família das chaperonas, proteínas envolvidas na homeostase proteica por mediar o enovelamento correto de proteínas e o desenovelamento daquelas mal formadas, além encaminha-las, quando necessário, para degradação (SU e WANG, 2010). Para testar se o EHG poderia agir através da modulação da homeostase proteica, a expressão de uma

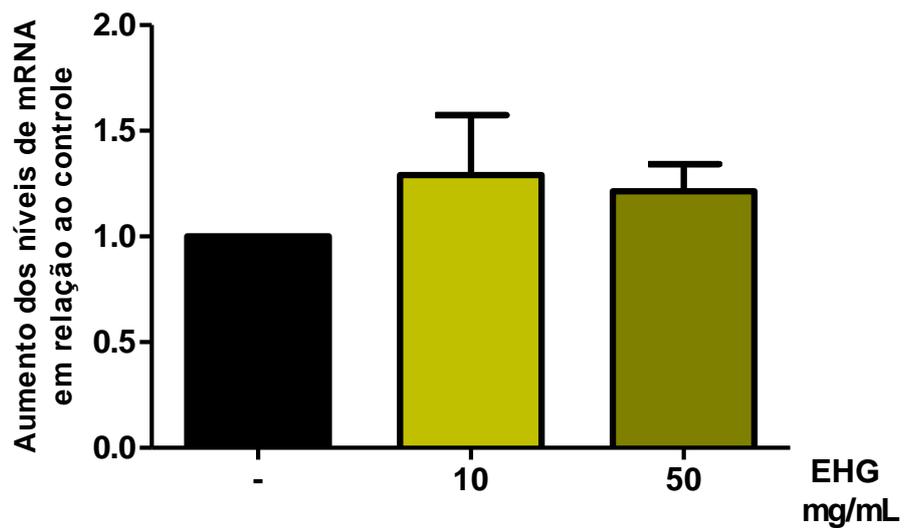


Figura 19 – Efeito do tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre os níveis do mRNA do peptídeo β -amilóide nos modelos CL4176, que expressam o peptídeo β A de maneira induzível nos músculos. Apenas variações de 2 ciclos (abaixo de 0,5 ou acima de 2) foram consideradas significativas.

chaperonina, a HSP-16, foi testada. No modelo *C. elegans* TJ375, o gene da proteína HSP-16 foi fusionado a uma proteína verde fluorescente (GFP), o que permite que a expressão da chaperonina seja mensurada através de microscopia óptica de fluorescência. Assim, animais TJ375 foram tratados ou não com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL até o estágio larval L4, quando uma parte de cada grupo foi submetida a estresse térmico por aumento da temperatura de cultivo para 35°C por 1 hora. Após 20 horas de descanso (em placas controle ou de tratamento), os animais foram avaliados através de microscopia. Conforme dito anteriormente, o estresse térmico é um conhecido indutor de dano proteico, o que permite, portanto, esclarecer os efeitos do EHG sobre a expressão de chaperoninas em condições de estresse proteico.

De acordo com os resultados demonstrados na Figura 20, é possível observar que o EHG aumenta, de maneira significativa, a expressão da chaperonina HSP-16: os aumentos chegaram a 12,1% (EHG 10 mg/mL) e 21,3% (EHG 50 mg/mL) na situação normal e 58,4% (EHG 10 mg/mL) e 34,9% (EHG 50 mg/mL) na situação de estresse térmico.

4.9.4 O EHG aumenta a atividade do Proteassoma

O sistema Ubiquitina-Proteassoma constitui um dos mecanismos de degradação de proteínas da célula. Formado por proteases citosólicas, este sistema é responsável por degradar tanto proteínas mal formadas ou danificadas, quanto proteínas nativas que já não são mais úteis ao organismo (SU e WANG, 2010). O efeito do EHG sobre a atividade deste sistema também foi avaliado neste estudo. Animais foram tratados ou não com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL por 72 horas, até atingirem a idade de adulto de 1 dia, quando foram submetidos à lise por sonicação para obtenção de extrato proteico. A atividade do proteassoma semelhante à quimiotripsina foi então determinada neste extrato, com auxílio do substrato Succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-4-metil-cumaril-7-amida (SLLVT-MCA), cuja fluorescência podia ser detectada em leitor de microplacas. Conforme observado na Figura 21, o tratamento com EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL provocou aumentos significativos de 59,1% e 53,4%, respectivamente, na atividade do proteassoma. Estes resultados suportam os anteriores, fornecendo mais evidências à hipótese de que o EHG atua através da modulação da homeostase proteica.

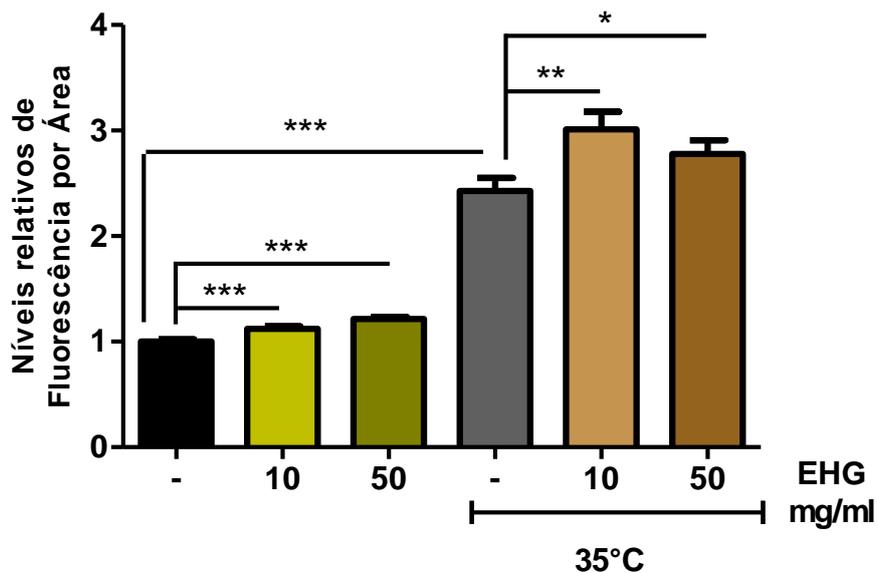


Figura 20 – Efeito do EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre a expressão da chaperonina HSP-16.2 em condições normais e de estresse térmico a 35°C. * $p = 0,0459$; ** $p = 0,0063$; *** $p < 0,0001$, determinados pelos Testes T de Student e Mann-Whitney.

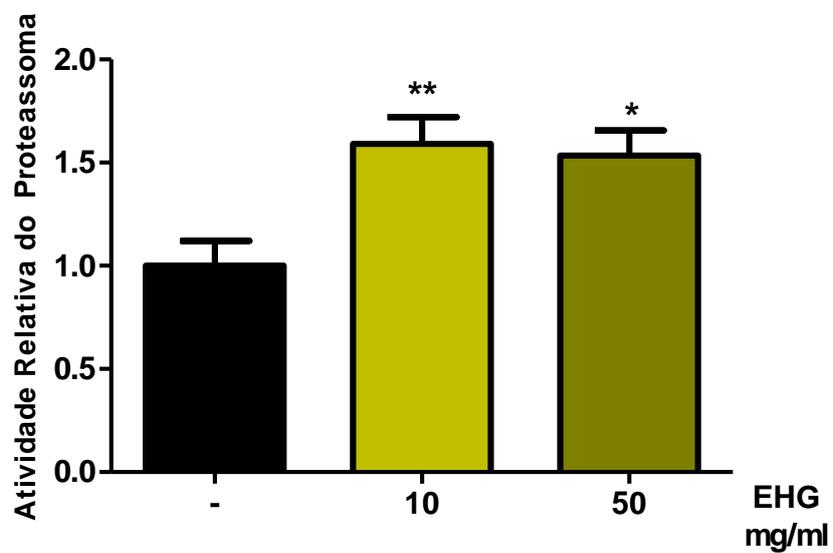


Figura 21 - Efeito do EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL sobre a atividade do proteassoma. * $p = 0,0111$; ** $p = 0,0046$; determinados pelos Testes T de Student e Mann-Whitney, respectivamente.

CAPÍTULO V
DISCUSSÃO

O guaraná é um extrato obtido da semente do guaranazeiro (*Paullinia cupana*), amplamente consumido no Brasil na forma de bebidas, como refrigerantes e energéticos, e na forma de pó, como suplemento alimentar. Apesar de sua comercialização se basear em propriedades estimulantes e termogênicas, existem poucos estudos que relatam as propriedades biológicas do guaraná, de forma a corroborar sua comercialização. Dentre estes estudos, propriedades antioxidantes e estimulantes já foram relatadas (YAMAGUTI-SASAKI et al, 2007; MATTEI et al, 1998; PORTELLA et al, 2013; BASILE et al, 2005; BITTENCOURT et al, 2013; LEITE et al, 2011; KENNEDY et al, 2004; OTOBONE et al, 2007). Ainda assim, apesar dos seus efeitos estimulantes sugerirem ações sobre o sistema nervoso central, poucos estudos tiveram como objetivo avaliar o potencial benefício do consumo do guaraná em relação às doenças neurodegenerativas. Na verdade, apenas dois estudos o fizeram, demonstrando efeitos positivos em modelo *ex vivo* para o Mal de Parkinson (OLIVEIRA et al, 2010), e capacidade de reduzir a agregação do peptídeo β -amilóide *in vitro* (BITTENCOURT et al, 2014). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os potenciais efeitos benéficos do tratamento com guaraná em modelos *C. elegans* para doenças neurodegenerativas, demonstrando, pela primeira vez, sua capacidade de reduzir a toxicidade de proteínas associadas ao Mal de Alzheimer e à Doença de Huntington *in vivo*.

Os estudos foram desenvolvidos com um extrato hidroalcoólico do guaraná (EHG) uma vez que o guaraná em pó não é hidrossolúvel, o que dificultava sua administração aos modelos *C. elegans*. O EHG foi caracterizado através da quantificação de seus componentes fitoquímicos por HPLC. A escolha dos fitoquímicos quantificados foi baseada naqueles descritos na literatura como prevalentes no guaraná. Assim, foi possível identificar no EHG a presença de metilxantinas (cafeína e teobromina) e polifenóis (catequinas e epicatequinas) (Tabela 3). Estes resultados estão de acordo com os componentes já descritos na literatura para o guaraná (BITTENCOURT et al, 2013; YAMAGUTI-SASAKI et al, 2007; BASILE et al, 2005). É interessante notar a prevalência do conteúdo de cafeína no extrato, que corresponde à um teor de 16,61%. Bittencourt et al (2013) também demonstrou uma predominância do conteúdo de cafeína no extrato hidroalcoólico de guaraná produzido em seu estudo.

Antes de avaliar a capacidade protetora do EHG, sua toxicidade foi avaliada no *C. elegans*, com o objetivo de assegurar que as doses utilizadas neste estudo não poderiam trazer efeitos deletérios que ocultariam os efeitos benéficos desejados. Observou-se que o EHG nas concentrações de 10 e 50 mg/mL não perturba o desenvolvimento dos animais, uma vez que não houve impacto negativo no tamanho corporal dos animais tratados com EHG (Figura 8). Na verdade, o tratamento com EHG na concentração de 10 mg/mL promoveu um leve, porém significativo, aumento no tamanho dos animais. Surco-Laos et al (2011) observaram que o tratamento do *C. elegans* com quercetina, um polifenol, também aumentava o tamanho corporal dos animais, ainda que nenhuma explicação para este fato tenha sido proposta.

Ainda, o EHG em ambas as concentrações diminuiu o número de *lysosome related organel*s (LRO) coradas pelo corante vermelho Nilo (Figura 9). Ainda que este resultado não possa diretamente indicar efeitos pró-longevidade do EHG, ele indica que o EHG não é tóxico e que pode ter efeitos benéficos a longo prazo: estudos demonstraram que cepas *C. elegans* mutantes com longevidade estendida, como os mutantes *daf-2*, apresentam baixos níveis de acúmulos do corante vermelho Nilo, enquanto mutantes que possuem um tempo de vida reduzido, como os mutantes *daf-16*, por exemplo, apresentam níveis elevados de LROs corados (O'ROURKE et al, 2009; SOUKAS et al, 2009). Uma correlação definitiva entre consumo do EHG e o aumento da longevidade dos animais será, posteriormente, avaliada por ensaios de longevidade, onde o tempo de vida médio e máximo de animais tratados com EHG será comparado ao de animais sem tratamento.

Bittencourt et al (2014) observaram que o guaraná é capaz de reduzir a agregação do peptídeo β -amilóide *in vitro*. Isto sugere que o mesmo seria capaz de interferir em processos patológicos mediados pelos agregados do peptídeo β A. De fato, conforme observamos em nosso estudo (Figura 10), o EHG foi capaz de reduzir o fenótipo de paralisia, que é decorrente da toxicidade do peptídeo β A, no modelo *C. elegans* CL2006 para o Mal de Alzheimer. Entretanto, como os animais dessa cepa apresentam a desvantagem de não permitir discernir, com clareza, se a melhoria de fenótipo decorrente de determinados tratamentos está associada com a diminuição da toxicidade do peptídeo β A ou a influência destes compostos na fisiologia do envelhecimento (LUBLIN e LINK,

2013), o modelo CL4176 também foi testado, sendo que o benefício do EHG ainda pode ser observado.

Com o objetivo de avaliar se o EHG teria efeitos benéficos em modelos para outras doenças neurodegenerativas, modelos *C. elegans* que expressam expansões poliglutamínicas fusionadas a genes repórteres no músculo (AM141) foram utilizados. Os resultados (Figura 11) demonstraram que o EHG em ambas as concentrações foi capaz de reduzir o número de agregados proteicos, demonstrando 1) um efeito benéfico também para a Doença de Huntington e 2) uma capacidade do EHG de reduzir a agregação proteica *in vivo*, o que pode ser relacionado aos dados *in vitro* obtidos por Bittencourt et al (2014), ainda que não se trate da mesma proteína.

Uma limitação dos modelos acima é o fato de que estes animais apresentam a proteína tóxica no tecido muscular. De forma a correlacionar esses resultados com um possível efeito neuroprotetor do EHG, animais que expressam fragmentos da proteína Huntingtina (Htn-Q150) nos neurônios bilaterais ASH foram testados. O EHG demonstrou, nestes animais, um efeito neuroprotetor, uma vez que animais tratados com a concentração de 10 mg/mL apresentaram maior viabilidade das células ASH quando comparados ao grupo controle (Figura 12). Estes resultados sugerem que, além de possuir efeitos benéficos contra a toxicidade de proteínas envolvidas na patologia de doenças neurodegenerativas, o EHG é capaz de atuar nos neurônios, sendo absorvido e agindo dentro destas células. Os resultados deste experimento apontam, ainda, que as doses ideais de consumo do guaraná devem ser cuidadosamente escolhidas, uma vez que, nem sempre, o consumo de doses maiores é garantia da observação de um efeito proporcional ou significativo.

Sabe-se que a bactéria utilizada como fonte de alimento para o *C. elegans* pode ser patogênica para o mesmo, e que portanto algumas substâncias podem ser benéficas para os vermes somente devido aos seus efeitos antimicrobianos (PIETSCH et al, 2011). Assim, o efeito do EHG sobre o crescimento bacteriano foi avaliado para eliminar a hipótese de que o EHG poderia agir através de efeitos bacteriostáticos ou bactericidas, uma vez que propriedades antibacterianas já foram descritas para o guaraná na literatura (YAMAGUTI-SASAKI et al, 2007; BASILE et al, 2005). Como nenhum efeito significativo do EHG sobre o crescimento bacteriano foi observado (Figura 13), concluiu-se que a diminuição

da patogenicidade da bactéria *E. coli* não poderia ser um dos mecanismos de ação do EHG. Assim, outros mecanismos passaram a ser estudados.

Para explicar os nossos resultados, duas hipóteses foram consideradas. A primeira hipótese foi uma ação antioxidante do EHG. Neste sentido, Dostal, Roberts e Link (2010) demonstraram que o café, rico em metilxantinas, era capaz de reduzir os fenótipos de paralisia nos modelos *C. elegans* através de efeitos antioxidantes. Já Sangha et al (2012) observaram que uma fórmula medicinal chinesa rica em polifenóis era capaz de atenuar a paralisia dos animais ao mesmo tempo que reduzia os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e o estresse oxidativo, enquanto Xiao et al (2014) demonstrou que efeitos antioxidantes também podem reduzir a neurotoxicidade dos fragmentos de huntingtina nos modelos *C. elegans* para a doença de Huntington.

De fato, o EHG demonstrou grande capacidade antioxidante *in vitro*, neutralizando o radical DPPH em níveis que variaram de 48,30 a 54,37% de inibição para as concentrações utilizadas (5, 10 e 50 mg/mL – Figura 7). Esta capacidade também foi demonstrada *in vivo*, uma vez que o EHG foi capaz de reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), mensuradas pela sonda H₂DCF-DA, tanto em condições normais quanto em condições de estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (Figura 14). Estes resultados endossam as evidências, na literatura, das propriedades antioxidantes do guaraná. Mais importante, observou-se ainda que o EHG foi capaz de reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) no modelo para Alzheimer CL2006 (Figura 15), permitindo relacionar os efeitos benéficos do EHG na redução de fenótipos associados à expressão de proteínas tóxicas diretamente à sua capacidade antioxidante

Esta atividade antioxidante pode ser, pelo menos em parte, atribuída aos componentes fitoquímicos do EHG, especialmente os polifenóis. O mecanismo de ação antioxidante dos polifenóis parece estar relacionado principalmente à uma ação direta de remoção de radicais livres, mediada por sua estrutura química rica em hidroxilas, capaz de doar hidrogênios formando radicais fenoxilas estabilizados por ressonância (ROSSI et al, 2008). Entretanto, evidências sugerem que polifenóis poderiam exercer sua atividade antioxidante através de mecanismos indiretos, modulando a atividade de enzimas que participam da

detoxificação (fase II) de xenobióticos no organismo (OSBURN e KENSLER, 2008).

A enzima GST-4 é ortóloga à enzima GST (glutathione S-transferase) de mamíferos, e participa da fase II do sistema de detoxificação dos organismos. Esta enzima catalisa a conjugação da glutathione ao centro eletrofílico de uma variedade de substratos, permitindo que esta atue direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo o metabolismo e a proteção celular (HAMILTON et al, 2003; MA, 2010). Os estudos com o café demonstraram que seus efeitos benéficos na redução da paralisia dos modelos *C. elegans* para o Mal de Alzheimer eram mediados pela ativação de enzima GST-4 e também pelo fator de transcrição SKN-1, ortólogo de Nrf-2 em mamíferos e responsável pelo controle da expressão de GST-4 (DOSTAL, ROBERTS e LINK, 2010). Curiosamente, a análise da expressão desta enzima em modelos *C. elegans* transgênicos tratados com EHG demonstrou que este não altera a expressão da enzima GST-4 em condições normais, e a diminui em condições de estresse oxidativo (Figura 16), um efeito diferente daquele observado nos animais tratados com café. Ainda que se saiba que muitos fitoquímicos presentes em plantas ou extratos naturais induzem a expressão ou aumentam a atividade de GST, produzindo assim efeitos protetores ao organismo (GALAL, WALKER e KHAN, 2015), os resultados obtidos demonstram que este não é um dos mecanismos de ação do EHG. Cabe ressaltar que no estudo de Dostal, Roberts e Link (2010), a indução de GST-4 foi demonstrada com o café descafeinado, e, portanto, o estudo não mostrou nenhuma relação direta entre a expressão de GST-4 e a cafeína. Além disso, considerando a atuação de GST-4 no metabolismo de xenobióticos (HIGGINS e HAYES, 2011), a não alteração de sua expressão pelo EHG em condições normais indica que, nas concentrações usadas, O EHG não age como um xenobiótico para o organismo modelo. Por fim, a capacidade do EHG em reduzir a expressão de GST-4 nas condições de estresse oxidativo pode ser relacionada aos resultados observados na análise dos níveis de ERO: uma vez que reduz os níveis de espécies reativas, o EHG diminuiria, assim, a necessidade da expressão da enzima antioxidante, demonstrando, até este ponto, uma ação antioxidante direta.

A superóxido dismutase - SOD-3 em *C. elegans* - é uma enzima conservada entre organismos eucarióticos e procarióticos que catalisa a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, participando de processos de inativação de espécies reativas em conjunto com a enzima catalase, que neutraliza o peróxido de hidrogênio produzido transformando-o em oxigênio molecular e água (McCORD, 1986; SIES, 1993; RATNAM et al, 2006). O aumento da expressão de SOD-3, aliado à uma redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio, foi demonstrado por Yin et al (2014) como o mecanismo de ação de nanopartículas de Reverastrol, um polifenol, na redução da toxicidade do peptídeo β -amilóide em modelos *C. elegans*. Xiong et al (2014) demonstraram que o chá preto, rico em catequinas, aumenta a expressão de SOD-3 e reduz espécies reativas de oxigênio em *C. elegans*. Em nosso estudo, o EHG demonstrou capacidade de aumentar a expressão de SOD-3 em condições normais, apesar de não possuir qualquer efeito sobre a expressão desta enzima em condições de estresse oxidativo (Figura 17). O aumento da expressão de SOD-3 em condições normais indica que o EHG possa modular a expressão desta enzima. Estes resultados sugerem que, além do mecanismo antioxidante direto demonstrado nas análises *in vitro* e nos ensaios da expressão de GST-4, o EHG possui um mecanismo antioxidante indireto, e que possivelmente pode reduzir os níveis de ERO no organismo através do aumento da expressão de uma enzima antioxidante.

Contudo, as propriedades antioxidantes do EHG não podem ser consideradas o único mecanismo de ação deste. Wu et al (2006), demonstraram que a capacidade antioxidante de um composto, isoladamente, não é capaz de reverter fenótipos ocasionados pela proteotoxicidade: em seu estudo, a vitamina C, um conhecido e potente composto antioxidante, foi capaz de reduzir os níveis de ERO de maneira significativa em modelos *C. elegans* expressando o peptídeo β A, mas nenhuma alteração do fenótipo de paralisia foi observada.

Assim, uma segunda hipótese para o mecanismo de ação do EHG foi levantada: a alteração da homeostase proteica do organismo. A homeostase proteica se refere ao processo dinâmico de síntese e degradação de proteínas, ou *turnover* proteico (KLIONSKY et al, 2005), bem como ao controle da qualidade deste processo. Neste âmbito, a primeira possibilidade testada foi a de que o EHG poderia interferir na síntese de proteínas tóxicas, diminuindo a síntese do

peptídeo β -amilóide, por exemplo. Entretanto, nenhum efeito foi observado (Figura 19). Este resultado indica apenas em parte que o EHG não altera a síntese do peptídeo β -amilóide, já que ele poderia ainda interferir na tradução do mRNA transcrito. Neste contexto, seria ainda interessante avaliar a capacidade do EHG sobre a diminuição do acúmulo de peptídeo β -amilóide, o que pode ser mensurado através de western blotting ou com o auxílio de corantes específicos como a tioflavina; entretanto, esses experimentos ainda não foram realizados.

O fato de o EHG não ter sido capaz de alterar os níveis do mRNA do peptídeo β A leva-nos, também, a considerarmos outras duas possibilidades: a primeira, que o EHG ativaria mecanismos que atuam diminuindo o mal enovelamento e a agregação de proteínas, e a segunda, que ele ativaria diretamente os mecanismos de degradação de proteínas.

As chaperonas, grupo de proteínas do qual fazem parte as chaperoninas, facilitam o enovelamento de peptídeos nascentes e previnem a agregação de proteínas mal enoveladas (SU e WANG, 2010). Além disso, participam nos processos de degradação proteica, encaminhando proteínas mal enoveladas para degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma (SU e WANG, 2010) e participando da degradação lisossomal de proteínas por participar da autofagia mediada por chaperoninas (MARTINEZ-VICENTE, SOVAK e CUERVO, 2005). A superexpressão de cheperoninas já foi associada à atenuação da agregação de proteínas poliglutamínicas (NOLLEN et al, 2004) e também à supressão da toxicidade do peptídeo β A em *C. elegans* (WU et al, 2010, FONTE et al, 2008). No nosso estudo, o EHG demonstrou ser capaz de aumentar a expressão da chaperonina HSP-16.2 nas situações normal e de estresse térmico, um potente indutor de dano proteico (Figura 20). O aumento da expressão em ambas as situações sugere que o EHG atua tanto de maneira preventiva quanto em resposta ao estresse, já que os aumentos observados na condição de estresse térmico superaram aquelas observados em condição normal. Sangha et al (2012) associaram os efeitos benéficos da fórmula por eles estudada, rica em polifenóis, ao aumento da expressão da chaperonina HSP-16.2, observada, inclusive, pelo aumento dos níveis de seu mRNA. A epigalocatequina galato (EGCG), uma catequina presente no chá verde, já foi associada a um aumento da expressão de HSP-16::GFP (ZHANG et al, 2009), e à redução da oligomerização do peptídeo β -amilóide (ABBAS e WINK, 2010), sendo que neste

último caso não foi observado o aumento da expressão de HSP-16 quando avaliada por qPCR. Dostal, Roberts e Link (2010), não puderam associar os efeitos benéficos do café ao aumento da expressão de HSP-16.2. Entretanto, é interessante notar que este resultado foi obtido com café descafeinado, o que, portanto, não exclui a possibilidade de associar a cafeína presente no EHG ao aumento da expressão da chaperonina.

A degradação de proteínas é mediada por dois principais mecanismos celulares: o sistema ubiquitina-proteassoma, composto por proteases citosólicas e responsável pela remoção de proteínas mal formadas ou proteínas nativas de vida curta (CIECHANOVER, 2005); e o sistema lisossomal-autofágico, onde a degradação de proteínas ocorre dentro dos lisossomos (MARTINEZ-VICENTE, SOVAK e CUERVO, 2005). Hassan e colaboradores (2009) demonstraram que a superexpressão da proteína AIP-1, que regula a função do proteassoma, protege contra a toxicidade do peptídeo β A e diminui seus depósitos em *C. elegans*. Já foi demonstrado na literatura que o mecanismo de ação de alguns compostos na redução de fenótipos associados a proteínas tóxicas pode envolver a ativação de mecanismos de degradação proteica: a quercetina, por exemplo, atenuou a paralisia e diminuiu a agregação do peptídeo β A de maneira dependente de proteínas envolvidas no sistema ubiquitina-proteassoma e lisossomal-autofágico, além de ter sido capaz de aumentar a atividade do proteassoma (REGITS, DUBLING e WENZEL, 2014). Conforme observamos, o EHG aumentou a atividade do proteassoma em ambas as concentrações avaliadas (Figura 21). Este resultado indica que o aumento da degradação proteica também pode ser um dos mecanismos de ação do EHG, o que inclusive é compatível com a observação de que o tratamento com o EHG diminui o número de agregados de proteínas poliglutamínicas no modelo PoliQ40 (AM141) (Figura 11).

Em conclusão, nossos resultados mostraram que o EHG possui a capacidade de alterar fenótipos associados ao Mal de Alzheimer e a Doença de Huntington nos modelos *C. elegans* estudados. Estes fenótipos são decorrentes da toxicidade de proteínas específicas, que provocam paralisia, neurotoxicidade e formam agregados nos modelos. O EHG demonstrou ser capaz de reduzir a paralisia nos modelos para o Alzheimer, bem como a neurotoxicidade e a agregação proteica nos modelos para Huntington. Os nossos dados sugerem

que os efeitos do EHG são mediados pela sua capacidade de aumentar a atividade do proteossoma e a expressão de chaperoninas, o que indica sua capacidade de regular positivamente os sistemas de controle de qualidade proteico das células. Além disso, o EHG também parece atuar através de seus efeitos antioxidantes, tanto diretos de remoção de radicais livres, quanto indiretos através da ativação da enzima superóxido dismutase (SOD-3) (Figura 22).

De acordo com Bittencourt et al (2013), os fitoquímicos presentes no guaraná podem ser, ao menos em parte, os responsáveis pelos seus efeitos. De fato, conforme descrito na revisão bibliográfica, os fitoquímicos presentes no EHG já foram associados a propriedades neuroprotetoras. Por outro lado, estudos com compostos como o café demonstram os benefícios do efeito sinérgico entre vários fitoquímicos: neste estudo, os benefícios do café foram muito maiores que os benefícios da cafeína isolada, sendo, inclusive, observado que o café descafeinado ainda apresentava efeitos protetores para o modelo *C. elegans* (DOSTAL, ROBERTS e LINK, 2010). Assim, mesmo que o atual estudo não tenha testado frações do EHG, a fim de determinar quais os princípios ativos por trás dos efeitos benéficos do guaraná, ressalta-se a importância de se considerar a ingestão do extrato de guaraná, completo, como uma alternativa terapêutica ou preventiva para doenças neurodegenerativas.

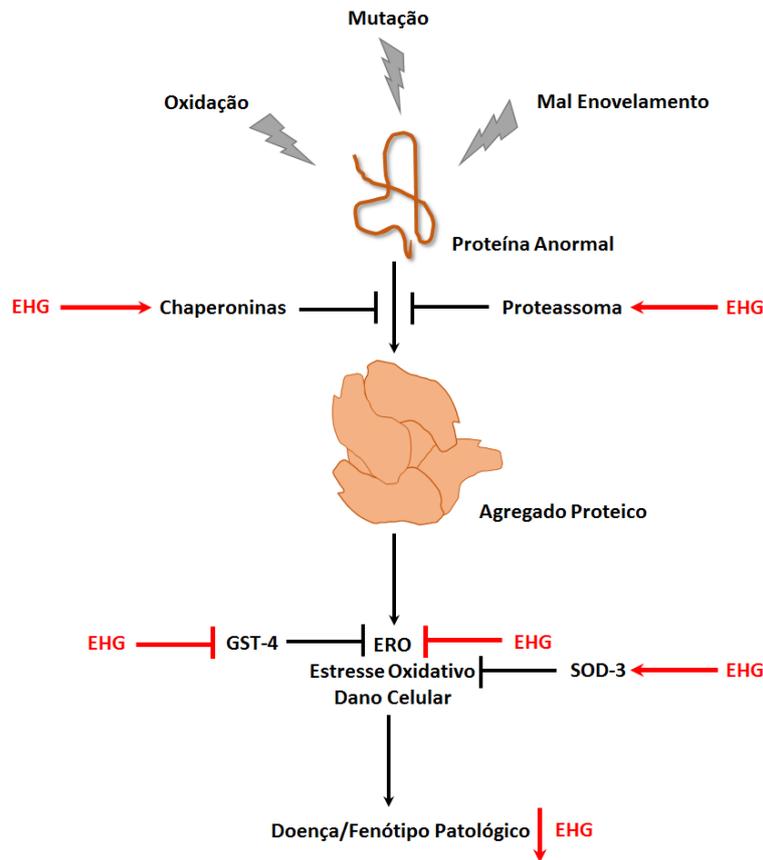


Figura 22 – Possível mecanismo de ação antioxidante e neuroprotetor do EHG nos modelos *C. elegans* para o Mal de Alzheimer e a Doença de Huntington. Proteínas anormais são geradas pela oxidação de macromoléculas, pelo mal enovelamento de proteínas ou por mutações em genes específicos. Os sistemas celulares de controle de qualidade proteica, como as chaperoninas e o proteassoma, atuam reparando ou degradando estas proteínas. Essas proteínas, quando não reparadas ou degradadas, podem formar agregados nas células, que possuem efeitos tóxicos como geração de espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo e dano celular. Esses efeitos podem gerar patologias, como observado em humanos, ou fenótipos patológicos, como observado nos modelos *C. elegans*. Os nossos resultados sugerem que o EHG é capaz de reduzir tais fenótipos patológicos, através da indução da atividade do proteassoma e da expressão de chaperoninas e da redução do estresse oxidativo através de mecanismos diretos de remoção de espécies reativas de oxigênio e indiretos de indução da expressão de uma enzima antioxidante, SOD-3.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

- O EHG produzido neste estudo é rico em cafeína, teobromina, catequinas e epicatequinas e possui capacidade antioxidante *in vitro*;
- O EHG, nas concentrações de 10 e 50 mg/mL não é tóxico para o *C. elegans*, uma vez que não interferiu no desenvolvimento dos animais e diminuiu o acúmulo de marcadores do envelhecimento;
- O EHG atenua a paralisia induzida pelo peptídeo β -amilóide humano nos modelos *C. elegans* para o Mal de Alzheimer;
- O EHG diminui o número de agregados de proteínas poliglutamínicas e atenua a neurotoxicidade de fragmentos de huntingtina em modelos *C. elegans* para a Doença de Huntington;
- O EHG não demonstrou atividade bacteriostática ou bactericida;
- O EHG foi capaz diminuir os níveis ERO em animais tipo selvagem tanto em condições normais e de estresse oxidativo,
- O EHG também foi capaz diminuir os níveis ERO em animais que expressam o peptídeo β -amilóide.
- EHG aumenta a expressão da enzima antioxidante SOD-3.
- O EHG não alterou os níveis do mRNA do peptídeo β -amilóide,
- o EHG foi capaz de aumentar a expressão da chaperonina HSP-16.2 e a atividade do proteassoma, sugerindo que possa atuar através do aumento da degradação das proteínas tóxicas.

CAPÍTULO VII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, S. e WINK, M. Epigallocatechin gallate inhibits beta amyloid oligomerization in *Caenorhabditis elegans* and affects the daf-2/insulin-life signaling pathway. **Phytomedicine**. v. 17, n. 11, p. 902-909. Abr, 2010.

ARYA, U.; DWIVEDI, H. e SUBRAMANIAM, J. R. Reserpine ameliorates A β toxicity in the Alzheimer's disease model in *Caenorhabditis elegans*. **Experimental Gerontology**, v. 44, n. 6-7, p. 462–466, doi:10.1016/j.exger.2009.02.010, 2009.

BASILE, A. et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 32–36, doi:10.1016/j.jep.2005.05.038, 2005.

BASTIANETTO, S. et al. Neuroprotective effects of green and black teas and their catechin gallate esters against beta-amyloid-induced toxicity. **The European Journal of Neuroscience**. v. 23, n. 1, p. 55-64. Jan, 2006.

BITTENCOURT, L. S. et al. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 53, p. 119–125, doi:10.1016/j.fct.2012.11.041, 2013.

BITTENCOURT, S. et al. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) Prevents β - Amyloid Aggregation , Generation of Advanced Glycation-end Products (AGEs), and Acrolein- Induced Cytotoxicity on Human Neuronal-Like Cells. **Phytotherapy Research**. doi: 10.1002/ptr.5173, 2014.

BORGS, L. et al. Huntington's Disease: From the physiological function of Huntingtin to the Disease. In: TUNALI, N. E. **Huntington's Disease – Core Concepts and Current Advances**. Ed. InTech, 2012. p. 3-41.

BOULIN, T.; ETCHBERGER, J. F. e HOBERT, O. Reporter gene fusions. **WormBook: the online review of C. elegans biology**, p. 1–23, doi:10.1895/wormbook.1.106.1, 2006.

BRADLEY, M. A.; MARKESBERY, W. R. e LOVELL, M. A. Increased levels of 4-hydroxynonenal and Acrolein in the brain in preclinical Alzheimer's disease. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 48, p. 1570-1576. 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E. e BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5, 1995.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. Portaria N° 1298, de 21 de Novembro de 2013. Aprova o Protocolo Clínico e Terapêutico para a Doença de Alzheimer. 2013.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.

BRETTSCHEIDER, J. et al. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases : a focus on human studies. **Nature Reviews - Neuroscience**. v. 16, n. 2, p. 109–120, doi:10.1038/nrn3887. Jan, 2015.

BROWN, R. C.; LOCKWOOD, A. H. e SONAWANE, B. R. Neurodegenerative Diseases: An Overview of Environmental Risk Factors. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 9, p. 1250–1256, doi:10.1289/ehp.7567. Set, 2005.

BUCCIANTINI, M. et al. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. **Nature**. v. 416, n. 6880, p. 507-511. 2002.

BUCHBERGER, A., BUKAU, B. e SOMMER, T. Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. **Molecular cell**, v. 40, n. 2, p. 238–252, doi:10.1016/j.molcel.2010.10.001. Out, 2010.

BUTTERFIELD, D. A. et al. Evidence of oxidative damage in Alzheimer ' s disease brain : central role for amyloid β -peptide. **Trends in Molecular Medicine**. v. 7, n. 12, p. 548–554, 2001.

BUXBAUM, J. N. e TAGOE, C. E. The genetics of amyloidoses. **Annual Review of Medicine**. v. 51, p. 543-569. 2000.

C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**, v. 282. p 2012-2018, 1998.

CERQUEIRA, F. M. HELENA, M. MEDEIROS, G. D. et al. Antioxidantes Dietéticos: Controvérsias e Perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007

- CIECHANOVER, A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 1, p. 79–87, 2005.
- CHEN, N. et al. WormBase: a comprehensive data resource for *Caenorhabditis* biology and genomics. **Nucleic acids research**, v. 33, n. Database issue, p. D383–389, doi:10.1093/nar/gki066, 2005.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 581–5, 2006.
- CHU, Y. F. et al. Crude caffeine reduces memory impairment and amyloid β (1-42) levels in an Alzheimer's mouse model. **Food Chemistry**. v. 135, n. 3, p. 2095-2102. Jun, 2012.
- COHEN, E. et al. Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. **Science** v. 313, n. 5793, p. 1604-1610. Set, 2006.
- COSTA KREWER, C. et al. Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population. **Phytotherapy research**, v. 1374, p. 1367–1374, doi:10.1002/ptr.3437. Fev, 2011.
- COX, C. J. et al. Dietary (-)-epicatechin as a potent inhibitor of $\beta\gamma$ -secretase amyloid precursor protein processing. **Neurobiology of Aging**, v. 36, n. 1, p. 178–187, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.032, 2015.
- CULETTO, E. e SATTELLE, D. B. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interections of human disease genes. **Human Molecular Genetics**. v. 9, p. 869-877, 2000.
- De PAULA, I. T. B. R. **A inibição do esforço reprodutivo e do fator de transcrição SKN-1 / Nrf2 diminui a formação de agregados poliglutamínicos no intestino do *Caenorhabditis elegans***. 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), Universidade Federal de Ouro Preto, 2014.

DIMITRIADI, M. e HART, A. C. Neurodegenerative disorders: Insights from the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Neurobiology of Disease**, v. 40, n. 1, p. 4–11, doi:10.1016/j.nbd.2010.05.012, 2010.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T. LIBY, K. T. STEPHENSON, K. K. *et al.* Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 12, p. 4584–4589. Mar, 2005.

DIOMEDE, L. *et al.* Tetracycline and its analogues protect *Caenorhabditis elegans* from β amyloid-induced toxicity by targeting oligomers. **Neurobiology of Disease**, v. 40, n. 2, p. 424–431, doi:10.1016/j.nbd.2010.07.002, 2010.

DOSTAL, V.; ROBERTS, C. M. e LINK, C. D. Genetic Mechanisms of Coffee Extract Protection in a *Caenorhabditis elegans* Model of b-Amyloid Peptide Toxicity. **Genetics Society of America**, v. 54, p. 857–866, doi:10.1534/genetics.110.120436, 2010.

DRAKE, J.; LINK, C. D. e BUTTERFIELD, D. A. Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. **Neurobiology of Aging**. v. 24, n. 3, p. 415–420. Jun, 2003.

ESKELINEN, E.L. e SAFTIG, P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1793, n. 4, p. 664–673, doi:10.1016/j.bbamcr.2008.07.014, 2009.

ESPINOLA, E. B. *et al.* Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 55, n. 3, p. 223–229, 1997.

FABER, P. W. *et al.* Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 96, n. 1, p. 179–84, 1999.

FABER, P. W. et al. Glutamine/proline-rich PQE-1 proteins protect *Caenorhabditis elegans* neurons from huntingtin polyglutamine neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 99, n. 26, p. 17131–17136, doi:10.1073/pnas.262544899, 2002.

FERRI, C. P. et al. Global prevalence of dementia : a Delphi consensus study. **The Lancet**, v. 366, p 2112-2117. Dez, 2005.

FINKEL, T. e HOLBROOK, N. J. Antioxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**. v. 408, n. 6809, p. 239-247. Nov, 2000.

FONTE, V. et al. Interaction of intracellular β -amyloid peptide with chaperone proteins. **PNAS**. v. 99, n. 14, p. 9439-9444. Jul, 2002.

FONTE, V. et al. Suppression of in vivo β -amyloid peptide toxicity by overexpression of the HSP-16.2 small chaperone protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 2, p. 784–91, doi:10.1074/jbc.M703339200, 2008.

GALAL, A. M.; WALKER, L. A. e KHAN, I. A. Induction of GST and related events by dietary phytochemicals: sources, chemistry, and possible contribution to chemoprevention. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v. 14, n. 24, p. 2802-2821, 2015.

GIL-MOHAPEL, J. M. e REGO, A. C. Doença de Huntington : Uma Revisão dos Aspectos Fisiopatológicos. **Revista de Neurociências**. v. 19, n. 4, p. 724–734. Mar, 2011.

GLICKMAN, M. H. e CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiological Reviews**. v. 82, n. 2, p. 373-428. Abr, 2002.

GUTIERREZ-ZEPEDA, A. et al. Soy isoflavone glycitein protects against beta amyloid-induced toxicity and oxidative stress in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **BMC Neuroscience**, v. 6, n. 54, p. 1-9. doi:10.1186/1471-2202-6-54, 2005.

HAIGIS, M. C. e YANKNER, B. A. The aging stress response. **Molecular Cell**. v. 40, n. 2, p. 333–344, doi:10.1016/j.molcel.2010.10.002. Out, 2010.

HAMILTON, D. et al. A novel missense mutation in the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit gene causes both decrease enzymatic activity and glutathione production. **Blood Journal**, v. 102, p. 725-730, 2003.

HAN, K. et al. Chronic caffeine treatment reverses memory impairment and expression of brain BDNF and TrkB in the PS1/APP double transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Molecular Medicine Reports**. v. 8, n. 3, p. 737-740. Set, 2013.

HASSAN, W. M. et al. AIP-1 ameliorates beta-amyloid peptide toxicity in a *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. **Human molecular genetics**, v. 18, n. 15, p. 2739–2747, doi:10.1093/hmg/ddp209, 2009.

HIGGINS, L. G. e HAYES, J. D. Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. **Drug Metabolism Reviews**. v. 43, n. 2, p. 92-137. Mai, 2011.

ITOH, K. et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 236, n. 2, p. 313-22, 1997.

JIA, K.; HART, A. C. e LEVINE, B. Autophagy Genes Protect Against Disease Caused by Polyglutamine Expansion Proteins in *Caenorhabditis elegans*. **Autophagy**, v. 3, n. 1, p. 21–25, doi:10.4161/auto.3528, 2014.

JOHNSON, J. a et al. The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1147, p. 61–9, doi:10.1196/annals.1427.036, 2008.

KELSEY, N. A.; WILKINS, H. M. e LINSEMAN, D. a. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. **Molecules**. v. 15, n. 11, p. 7792–7814, doi:10.3390/molecules15117792. Out, 2010.

KENNEDY, D. O. et al. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with *Panax ginseng*. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 79, n. 3, p. 401–11, doi:10.1016/j.pbb.2004.07.014, 2004.

KIRKWOOD, T. B. L. The most pressing problem of our age. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 326, n. 7402, p. 1297–1299, doi:10.1136/bmj.326.7402.1297. Jun, 2003.

KLIONSKY, D. J. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. Pt 1, p. 7–18, 2005.

KORCZYN, A. D. The amyloid cascade hypothesis. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, v. 4, n. 3, p. 176-8, maio 2008.

LABBADIA, J. e MORIMOTO, R. I. Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. **Trends in Biochemical Science**. v. 38, n. 8, p. 378-385, 2013.

LAURENT, C. et al. Beneficial effects of caffeine in a transgenic modelo of Alzheimer's disease-like tau pathology. **Neurobiology of Aging**. v. 35, n. 9, p. 2079-2090. Mar, 2014.

LEITE, R. P. et al. Protective effect of Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) pre-treatment on cadmium-induced damages in adult Wistar testis. **Biological trace element research**, v. 141, n. 1-3, p. 262–274, doi:10.1007/s12011-010-8729-7, 2011.

LINK, C. D. Expression of human β -amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 92, p. 9368–9372. Set, 1995.

LINK, C. D. et al. Gene expression analysis in transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. **Neurobiology of Aging**. v. 24, p. 397-413, 2003.

LUBLIN, a L. e LINK, C. D. Alzheimer's disease drug discovery: in vivo screening using *Caenorhabditis elegans* as a model for β -amyloid peptide-induced toxicity. **Drug discovery today: Technologies**. v. 10, n. 1, p. 115–119, doi:10.1016/j.ddtec.2012.02.002, 2013.

MA, Q. Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological and toxicological implications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 125, p. 376–393, 2010.

MARKESBERRY, W. R.; MONTINE, T. J. e LOVELL, M. A. Oxidative alterations in neurodegenerative diseases. In: MATTSON, M. P. **Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders**. Ed. Humana Press, 2001. p. 21-51.

MARKAKI, M.; TAVERNARAKIS, N. Modeling human diseases in *Caenorhabditis elegans*. **Biotechnology Journal**, v. 5, n. 12, p. 1261-1276, ez 2010.

MARTINEZ-VICENTE M., SOVAK G. & CUERVO A.M. Protein degradation and aging. **Experimental Gerontology**. v. 40, n. 8-9, p. 622-633, 2005

MARTORELL, P. et al. A cocoa peptide protects *Caenorhabditis elegans* from oxidative stress and β -amyloid peptide toxicity. **PloS one**, v. 8, n. 5, doi. e63283, doi:10.1371/journal.pone.0063283, 2013.

MATTEI, R. et al. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 60, p. 111–116. Fev, 1998.

MATTSON, M. P.; CHAN, S. I. C. L. e DUAN, W. Modification of Brain Aging and Neurodegenerative Disorders by Genes, Diet, and Behavior. **Physiological Reviews**. v. 82. p. 637–672. Jul, 2002.

McCORD, J.M. Superoxide dismutase: rationale for use in reperfusion injury and inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 2, p. 307-310, 1986

MI, K. e JOHNSON, G. The Role of Tau Phosphorylation in the Pathogenesis of Alzheimers Disease. **Current Alzheimer Research**, v. 3, n. 5, p. 449–463, doi:10.2174/156720506779025279, 2006.

MORLEY, J. F. et al. The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 99, n. 16, p. 10417–10422, doi:10.1073/pnas.152161099, 2002.

MORRIS J. Z., TISSENBAUM H. A. e RUVKUN G. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**. v. 382, p. 536-539, 1996

MUÑOZ-LOBATO, F. et al. Protective role of DNJ-27/ERdj5 in *Caenorhabditis elegans* models of human neurodegenerative diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 2, p. 217–35, doi:10.1089/ars.2012.5051, 2014.

MUNOZ-SANJUAN, I. e BATES, G. P. The importance of integrating basic and clinical research toward the development of new therapies for Huntington disease. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 121, p. 476-483, 2011.

MYERS, R. H. et al. De novo expansion of a (CAG)_n repeat in sporadic Huntington's disease. **Nature Genetics**. v. 5, n. 2, p. 168-173, 1993.

NOLLEN, E. A. A. et al. Genome-wide RNA interference screen identifies previously undescribed regulators of polyglutamine aggregation. **PNAS**. v. 101, n. 17, p. 6403-6408. Abr, 2004.

OHKUMO, T. et al. Use of RNAi in *C. elegans*. **Methods in Molecular Biology**. v. 442, p. 129-137, 2008.

OLIVEIRA, D. M. et al. *Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis* protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cell line against rotenone-induced cytotoxicity. **Human & experimental toxicology**, v. 30, n. 9, p. 1382–1391, doi:10.1177/09603271110389837, 2010.

ONO, K. et al. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**. v. 87, p. 172-181, 2003.

O'ROURKE, E.J. et al. *C. elegans* major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles. **Cell Metabolism**. v. 10, p. 430– 435, 2009.

OSBURN, W.O.; KENSLER, T.W. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. **Mutation research**, v. 659, n. 1-2, p 31-9, 2008.

OTOBONE, F. J. et al. Effect of Lyophilized Extracts from Guaraná Seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart .) Ducke] on Behavioral Profiles in Rats. **Phytotherapy Research**. v. 21, p. 531–535, doi:10.1002/ptr. Abr, 2007.

PAULA, V. J. R. et al. Neurobiological pathways to Alzheimer's disease Amyloid- β , Tau protein or both? **Dementia & Neuropsychologia**, v. 3, n. 3, p. 188-194. Set, 2009.

PIETSCH, K. et al. Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*. **Biogerontology**. v. 12, n. 4, p. 329-347. Abr, 2011.

PORTELLA, R. D. L. et al. Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. **Lipids in health and disease**, v. 12, n. 12, p. 1-12 doi:10.1186/1476-511X-12-12, 2013.

PRICE et al. The value of transgenic models for the study of neurodegenerative diseases. **Annals of the New York Academy of Science**. v. 920, n. 179-191. 2000.

PRZEDBORSKI, S.; VILA, M. e JACKSON-LEWIS, V. Neurodegeneration: What is it and where are we? **The Journal of Clinical Investigation**. v. 111, n. 1, p. 3-10, doi:10.1172/JCI200317522., Jan, 2003.

RAMASAMY, R. et al. Advanced glycation products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. **Glycobiology**. v. 15, n. 7, p. 16R-28R. Mar, 2005.

RATNAM, D.V. et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p. 189-207, 2006.

RAVI, M. T. S. e YUNKER, R. Studies on the nature of anti-platelet aggregatory factors in the seeds of the Amazonian herb Guarana (*Paullinia cupana*). **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**. v. 78, p. 96-101. 2008.

REGITZ, C.; DUBLING, L. M. e WENZEL, U. Amyloid-beta ($A\beta$ 1-42)-induced paralysis in *Caenorhabditis elegans* is inhibited by the polyphenol quercetin through activation of protein degradation pathways. **Molecular nutrition & food research**. v. 00, p. 1-10, doi:10.1002/mnfr.201400014, 2014.

REINKE, V. Functional exploration of the *C. elegans* genome using DNA microarrays. **Nature Genetics**. v. 32, p. 541-546, 2002.

REVETT, T. J. et al. Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. **Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN**, v. 38, n. 1, p. 6-23, jan 2013.

RIDDLE D.L., et al. Section I - The Biological Model. In: _____ **C. elegans II - 2nd edition**. New York. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1997.

ROSSI, L. et al. Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease. **Neurochemical Research**. v. 33, n. 12, p. 2390-2400. Dez, 2008.

SANGHA, J. S. et al. Liuwei Dihuang (LWDH), a traditional Chinese medicinal formula, protects against β -amyloid toxicity in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **PloS one**, v. 7, n. 8, doi. e43990, doi:10.1371/journal.pone.0043990, 2012.

SHAO, J. e DIAMOND, M. I. Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. **Human molecular genetics**, v. 16, n. 2, p. R115–R123, doi:10.1093/hmg/ddm213. Jul, 2007.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SMITH, J. V. e LUO, Y. Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by Ginkgo biloba extract EGb 761. **Journal of Alzheimer's Disease**. v. 5, n. 4, p. 287-300. Ago, 2003.

SOUKAS A.A., et al. Rictor/TORC2 regulates fat metabolism, feeding, growth, and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **Genes and Development**. v. 23, p. 496–511, 2009.

SOUKAS, A. A., CARR, C. E. e RUVKUN, G. Genetic regulation of *Caenorhabditis elegans* lysosome related organelle function. **PLoS genetics**, v. 9, n. 10, p. e1003908, doi:10.1371/journal.pgen.1003908, 2013.

SOUSA, S.A. et al. Determinação de taninos e metilxantinas no guaraná em pó (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n.6, p.866–870, 2010.

SOTO, C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. **Nature Reviews – Neuroscience**. v. 4, n.1, p. 49-60. 2003.

SPORN, M. B. AND K. T. LIBY. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. **Nature Clinical Practice Oncology**, v. 2, n.10, p. 518-25, 2005.

STEFANI, M. e DOBSON, C. M. Protein aggregation and aggregate toxicity : new insights into protein folding , misfolding diseases and biological evolution. **Journal of Molecular Medicine**. v. 81, p. 678–699, doi:10.1007/s00109-003-0464-5. Ago, 2003.

SU, H. e WANG, X. The ubiquitin-proteasome system in cardiac proteinopathy: a quality control perspective. **Cardiovascular research**, v. 85, n. 2, p. 253–62, doi:10.1093/cvr/cvp287, 2010.

SURCO-LAOS, F. et al. Effects of O-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*. **Food & Function**, v. 2, n. 8, p. 445–456, doi:10.1039/c1fo10049a, 2011.

TRUSHINA, E. e MIELKE, M. M. Recent advances in the application of metabolomics to Alzheimer’s Disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, n. 8, p. 1232–1239, doi:10.1016/j.bbadis.2013.06.014. Jun, 2014.

UTTARA, B. et al. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 65–74, doi:10.2174/157015909787602823, 2009.

VOISINE, C. et al. Identification of Potential Therapeutic Drugs for Huntington’s Disease using *Caenorhabditis elegans*. **Plos One**. n. 6, doi:10.1371/journal.pone.0000504. Jun, 2007.

WHITE, J. G. et al. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Philosophical Transactions – The Royal Society – Series B – Biological Sciences**. v. 314, n. 1165, p. 1-340. Londres. Nov, 1986.

WU, Y. et al. Amyloid- β -Induced Pathological Behaviors Are Suppressed by Ginkgo biloba Extract EGb 761 and Ginkgolides in Transgenic *Caenorhabditis elegans*. **Neurobiology of Disease**, v. 26, n. 50, p. 13102–13113, doi:10.1523/JNEUROSCI.3448-06.2006, 2006.

WU, Y. et al. Heat shock treatment reduces beta amyloid toxicity in vivo by diminishing oligomers. **Neurobiology of Aging**. v. 31, p. 1055-1058. 2010.

XIAO, L. et al. Salidroside protects *Caenorhabditis elegans* neurons from polyglutamine-mediated toxicity by reducing oxidative stress. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 7757–7769, doi:10.3390/molecules19067757, 2014.

XIONG, L. G. et al. Black tea increased survival of *Caenorhabditis elegans* under stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 19, n. 46, p. 11163-11169. Nov, 2014.

YAMAGUTI-SASAKI, E. et al. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, p. 1950–1963, 2007.

YIN, H. et al. Resveratrol-loaded nanoparticles reduce oxidative stress induced by radiation or amyloid-beta in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v. 10, n. 8, p. 1536-1544. Ago, 2014.

ZHANG, H. et al. Inhibition of polyglutamine-mediated proteotoxicity by *Astragalus membranaceus* polysaccharide through the DAF-16/FOXO transcription factor in *Caenorhabditis elegans*. **The Biochemical journal**, v. 441, n. 1, p. 417–24, doi:10.1042/BJ20110621, 2012.

ZHANG, L. F. et al. Coffee and caffeine potentiate the anti-amyloidogenic activity of melatonin via inhibition of A β oligomerization and modulation of the Tau-mediated pathway in N2a / APP cells. **Drugs Design, Development and Therapy**. n. 9, p. 241–272, 2015.

ZHANG, L. et al. Significant longevity-extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 46, n. 3, p. 414-421. Nov, 2008.