

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Marina Lopes Machado

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Ilex
paraguariensis* e CAFEÍNA SOBRE O METABOLISMO E A DOENÇA
DE ALZHEIMER EM *Caenorhabditis elegans***

**Santa Maria, RS, Brasil
2020**

Marina Lopes Machado

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Ilex paraguariensis* e
CAFEÍNA SOBRE O METABOLISMO E A DOENÇA DE ALZHEIMER EM
*Caenorhabditis elegans***

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Prof. Dr. Félix Alexandre Antunes Soares

Santa Maria, RS
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Machado, Marina Lopes

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Ilex paraguariensis* E CAFEÍNA SOBRE O METABOLISMO E A DOENÇA DE ALZHEIMER EM *Caenorhabditis elegans* / Marina Lopes Machado.- 2020.

100 p.; 30 cm

Orientador: Félix Alexandre Antunes Soares
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2020

1. Erva-mate 2. Metabolismo de lipídeos 3. Doenças neurodegenerativas 4. Doença de Alzheimer 5. Produtos naturais I. Soares, Félix Alexandre Antunes II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, MARINA LOPES MACHADO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Marina Lopes Machado

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Ilex paraguariensis* e
CAFEÍNA SOBRE O METABOLISMO E A DOENÇA DE ALZHEIMER EM
*Caenorhabditis elegans***

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Aprovado em 25 de março de 2020:

Félix Alexandre Antunes Soares, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Carina Rodrigues Boeck, Dra. (UFN)

Mariele Feiffer Charão, Dra. (FEEVALE)

Nilda Vargas Barbosa, Dra. (UFSM)

Tatiana Emanuelli, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, criador do universo e responsável maior pela finalização dessa jornada que é o doutorado.

Agradeço aos meus pais Vera e Nilo e meu irmão Mariano, minha cunhada Natani e ao mais novo membro da família, Vicente. Muito obrigada por todo o amor, dedicação, carinho, exemplo, apoio, e o incentivo em todos os momentos, pois sem eles, jamais chegaria a lugar algum.

Agradeço aos meus sogros João Alberto e Mariângela, e minha cunhada Patrícia, que me acolheram como membro da família e foram muito importantes nesse processo.

Agradeço ao meu esposo e parceiro de vida Thiago, muito obrigada por todo o incentivo. Obrigada pelo apoio e dedicação sem limites, com certeza posso dizer que essa caminhada foi mais fácil com ele ao meu lado.

Ao meu orientador, professor Félix, um muito obrigado especial. Pois foi quem me acolheu no laboratório em 2011, e lá se vão quase 9 anos de parceria. Quem sempre acreditou em mim, mesmo quando eu não acreditei e me proporcionou uma evolução que eu nem imaginava. Obrigada pelo apoio e confiança sempre.

Agradeço a minha mãe científica Letícia pelo apoio e dedicação ao longo dessa trajetória, que mesmo longe sempre se manteve presente.

Agradeço aos colegas e amigos do *C. elegans* Aline, Dani 1, Dani 2, Fabiane, Larissa, Marcel, Thay, Tássia e Priscila, muito obrigada pelas conversas, pelo apoio, amizade, atenção, carinho e ajuda. Aos colegas e amigos do laboratório: Aline, Andrezza, Bárbara, Débora Farina, Débora Marques, Diane, Fernando, Flávia, Guilherme, Ingrid, Martin, Néilson, Pâmela, Rodrigo, Rômulo e Sílvia muito obrigada pela amizade, pelas risadas pelos ensinamentos, pela disposição em ajudar e pela atenção. Muito obrigada a todos pela oportunidade de poder conviver com pessoas tão diferentes. Aprendi muito com todos nos últimos anos, aprendi principalmente o significado de SOLIDARIEDADE.

Agradeço aos demais professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica), pela contribuição de alguma forma para a realização do meu trabalho e para a minha formação.

Agradeço ao CNPq e a CAPES pela bolsa de estudos e os recursos financeiros concedidos. Muito obrigada a todos.

Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar.

(Paulo Freire)

APRESENTAÇÃO

No item INTRODUÇÃO consta uma revisão sucinta da literatura sobre os temas trabalhados nesta tese.

O DESENVOLVIMENTO da tese está apresentado sob a forma de dois artigos, os quais se encontram alocados no item ARTIGOS CIENTÍFICOS.

A metodologia realizada, os resultados obtidos, discussão, conclusão e referências bibliográficas que fazem parte desta tese encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo.

O item DISCUSSÃO apresenta interpretações e comentários gerais sobre os trabalhos científicos aqui incluídos.

Os itens CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre a investigação desenvolvida.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se somente às citações que aparecem no item INTRODUÇÃO e DISCUSSÃO, uma vez que o artigo científico contém as suas próprias referências

RESUMO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Ilex paraguariensis* e CAFEÍNA SOBRE O METABOLISMO E A DOENÇA DE ALZHEIMER EM *Caenorhabditis elegans*

AUTORA: Marina Lopes Machado

ORIENTADOR: Prof. Dr. Félix Alexandre Antunes Soares

A *Ilex paraguariensis* é uma planta amplamente consumida na América do Sul, usada para preparar uma bebida semelhante ao chá, conhecida como *mate*, rica em cafeína e polifenóis, com múltiplas atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes, antiobesidade e neuroprotetora. No entanto, estudos sobre as propriedades biológicas de *Ilex paraguariensis* são restritos e seus efeitos sobre o sistema nervoso central não são bem elucidados. A cafeína é um agente termogênico que atua através do receptor de adenosina e seu consumo está relacionado a um menor risco de neuropatologias associadas à idade. A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada pela presença de placas amiloides no cérebro formada pela deposição de peptídeos β -amiloides insolúveis. Como várias plantas que possuem propriedades antioxidantes são conhecidas por serem neuroprotetoras, e também a cafeína possui propriedades termogênica e neuroprotetora, e o estresse oxidativo se correlaciona com a toxicidade do peptídeo β -amilóide, o presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos do tratamento crônico com extrato de *Ilex paraguariensis in vivo* no metabolismo lipídico e no modelo de toxicidade induzida por β A, e comparar os efeitos deste último com a cafeína usando *Caenorhabditis elegans*. A modulação do metabolismo da gordura dependente de *Ilex paraguariensis* em *C. elegans* foi investigada pela primeira vez. No geral, *Ilex paraguariensis* diminuiu o armazenamento de lipídeos e aumentou o gasto de energia corporal nos animais. Esses efeitos dependem do sistema purinérgico (ADOR-1) e do receptor nuclear hormonal (NHR-49), um regulador chave da oxidação da gordura. *Ilex paraguariensis* também aumentou positivamente a expressão da lipase de triglicerídeos dos adipócitos tipo 1 (ATGL-1), para modular o metabolismo da gordura. Após, foram analisados os efeitos neuroprotetores de *Ilex paraguariensis* e cafeína. *Ilex paraguariensis* e cafeína aumentaram a sobrevivência de *C. elegans* e parecem atuar diretamente como sequestrador de espécies reativas de oxigênio, também atrasaram a paralisia induzida pelo peptídeo β A e diminuíram a atividade da enzima AChE em *C. elegans*. Verificou-se que o efeito protetor de *Ilex paraguariensis* contra a paralisia induzida pelo peptídeo β A foi dependente do fator de choque térmico (HSF-1) e do fator de transcrição da família FOXO (DAF-16), que estão envolvidos respectivamente nos processos relacionados ao envelhecimento e na síntese de chaperonas – responsável pela homeostase proteica; enquanto o da cafeína dependia apenas da DAF-16. Os resultados foram melhores quando *C. elegans* foi tratado com *Ilex paraguariensis* do que com cafeína. Devido ao grande número de constituintes no extrato de *Ilex paraguariensis*, é difícil identificar o composto responsável pelos efeitos benéficos. Interações sinérgicas são importantes em fitomedicamentos, portanto os efeitos do extrato de *Ilex paraguariensis* podem ser menores quando um único composto é isolado e usado em baixas concentrações, como no caso da cafeína.

Palavras-chave: Produtos Naturais. Erva mate. Metabolismo de lipídeos. Consumo de oxigênio. Doenças Neurodegenerativas. Doença de Alzheimer. Beta amilóide.

ABSTRACT

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Ilex paraguariensis* e CAFEÍNA SOBRE O METABOLISMO E A DOENÇA DE ALZHEIMER EM *Caenorhabditis elegans*

AUTHOR: Marina Lopes Machado
ADVISOR: Félix Alexandre Antunes Soares

Ilex paraguariensis is a plant widely consumed in South America, used to prepare a tea-like beverage, called *mate*, rich in caffeine and polyphenols, with multiple biological activities including antioxidant, anti-obesity and neuroprotective properties. Nevertheless, studies about the *Ilex paraguariensis* biological properties are restricted, and its effects over the central nervous system are not well elucidated. Caffeine is a thermogenic agent that acts through the adenosine receptor, and its consumption is associated with a lower risk of age-associated neuropathologies. Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder characterized by the presence of amyloid plaques in the brain formed by the deposition of insoluble β -amyloid peptides. Since several plants that have antioxidant properties are known to be neuroprotective, and also caffeine have thermogenic and neuroprotective properties, and oxidative stress correlates with A β -toxicity, the present study aims to investigate the effects of chronic treatment with *Ilex paraguariensis* extract *in vivo* on lipid metabolism and A β -induced toxicity model, and compare the effects of this last one with caffeine using *Caenorhabditis elegans*. *Ilex paraguariensis*-dependent modulation of fat metabolism in *C. elegans* was first investigated. Overall, *Ilex paraguariensis* decreased fat storage and increased body energy expenditure of worms. These effects depend on the purinergic system (ADOR-1) and nuclear hormone receptor (NHR-49), a key regulator gene of fat oxidation. *Ilex paraguariensis* also upregulated the expression of adipocyte triglyceride lipase 1 (ATGL-1), to modulate fat metabolism. After, the neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* and caffeine were analyzed. *Ilex paraguariensis* and caffeine increased the *C. elegans* lifespan and appeared to act directly as a reactive oxygen species scavenger, also delayed A β -induced paralysis and decreased AChE activity in *C. elegans*. The protective effect of *Ilex paraguariensis* against A β -induced paralysis was found to be dependent on heat shock factor (HSF-1) and FOXO-family transcription factor (DAF-16), which are respectively involved in aging-related processes and chaperone synthesis – responsible for the protein homeostasis; while that of caffeine was dependent only on DAF-16. The results were overall better when *C. elegans* was treated with *Ilex paraguariensis* than with caffeine. Due to a large number of constituents in the *Ilex paraguariensis* extract, it is difficult to identify the precise compound responsible for the beneficial effects. Synergistic interactions are important in phytomedicines, therefore the effects of *Ilex paraguariensis* extract can be less when a single compound is isolated and used at low concentrations, as in the case of caffeine.

Keywords: Natural Products. *Yerba Mate*. Fat Metabolism. Oxygen Consumption. Neurodegenerative Diseases. Alzheimer's Disease. Amyloid Beta.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Taxas de excesso de peso em adultos nos países analisados pela OCDE...	15
Figura 2. A PPA clivada por enzimas secretases.....	45
Figura 3. Ação da cafeína sob a fosfodiesterase (PDE).....	51
Figura 4. <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto.....	52
Figura 5. Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	54
Figura 6. Via de sinalização semelhante à insulina.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β A	Beta-amilóide
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina, do inglês <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
DA	Doença de Alzheimer
DCNTs	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DH	Doença de Huntington
DP	Doença de Parkinson
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
EROs	Espécies reativas de oxigênio
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1, do inglês <i>insulin-like growth factor-1</i>
IL-6	Interleucina – 6
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PAI-1	Inibidor da Ativação do Plasminogênio-1, do inglês <i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PDE	Fosfodiesterase
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	Proteína Kinase A
PPA	Proteína Precursora do Amilóide
PPAR α	Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissoma, do inglês <i>peroxisome proliferator-activated receptor-α</i>
RBP4	Proteína de Ligação ao Retinol 4, do inglês <i>Retinol binding protein 4</i>
RNAi	RNA de Interferência
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa, do inglês <i>tumor necrosis factor-1</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 Objetivo Geral	14
1.1.2 Objetivos Específicos	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS	15
2.1.1 Sobrepeso e Obesidade	15
2.1.2 Doenças Neurodegenerativas	18
2.1.3 Obesidade e Doenças Neurodegenerativas	21
2.2 O ESTRESSE OXIDATIVO ASSOCIADO ÀS PATOLOGIAS	23
2.3 COMPOSTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	24
2.3.1 <i>Ilex paraguariensis</i>	25
2.4 O NEMATÓDEO <i>Caenorhabditis elegans</i>	29
2.4.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> e o metabolismo lipídico	31
2.4.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> e o envelhecimento	32
2.4.3 <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de toxicidade induzida pelo peptídeo β A	34
3. DESENVOLVIMENTO	37
3.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1	38
3.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2	59
4. DISCUSSÃO	74
5. CONCLUSÕES	79
5.1 CONCLUSÃO GERAL	79
5.2 CONCLUSÕES PARCIAIS	79
6. PERSPECTIVAS	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1. INTRODUÇÃO

A expectativa de vida tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, junto com o desenvolvimento econômico e a qualidade de vida (Edwards, 2011). Porém, o aumento da expectativa de vida é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, devido a estas estarem associadas a idade (Albert, 1996). Além disso, com a melhora do desenvolvimento econômico, os índices de sobrepeso e obesidade também tem aumentado, e estes estão associados com o maior risco de mortalidade (Peeters *et al.*, 2003).

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas por perda gradual e seletiva de neurônios do sistema nervoso central (SNC), formação de emaranhados neurofibrilares e degeneração no hipocampo (Ball, 1977; Ramsden *et al.*, 2005), podendo levar ao declínio das funções cerebrais, perda de memória, demência e morte. A doença de Alzheimer (DA) é a doença neurodegenerativa mais comum relacionada a idade, afeta cerca de 35,6 milhões de pessoas (Organization, 2012), e é clinicamente caracterizada pelo declínio gradual da memória e comprometimento de outras funções cognitivas como a comunicação, movimento e incapacidade de fala (Bondi *et al.*, 2002).

Além da DA, outra doença de proporções globais e de prevalência crescente é a obesidade (Shaw, 2014). No Brasil, o sobrepeso e a obesidade vêm aumentando em todas as faixas etárias, em ambos os sexos, e em todos os níveis de renda. Em 2014, mais de 1,9 bilhão de adultos da população mundial, estavam acima do peso, destes, mais de 600 milhões eram obesos (Shaw, 2014). Em 2019, 33% da população do mundo estava com sobrepeso ou obesidade, e estima-se que, se as tendências recentes continuarem, até 57,8% da população adulta do mundo estará acima do peso ou obesos até 2030 (Forse *et al.*, 2020) A obesidade é uma epidemia mundial de causa multifatorial resultante da interação de fatores genéticos e ambientais, que causa impactos na qualidade de vida. Já o sobrepeso é um alerta de que a ingestão energética excede as despesas de energia, e o indivíduo está a um passo de se tornar obeso.

A relação entre obesidade e doenças neurodegenerativas progressivas associadas a idade, como DA, já foi observada (Whitmer, 2007; Whitmer *et al.*, 2008; Fitzpatrick *et al.*, 2009). Evidências crescentes sugerem que a patogênese da DA não se restringe ao compartimento neuronal, mas inclui fortes interações com mecanismos imunológicos no cérebro, e os efeitos vasculares da obesidade parecem desempenhar um papel significativo no desenvolvimento dessas doenças (Heneka *et al.*, 2015). A inflamação periférica observada na obesidade, pode

afetar o cérebro em condições específicas, como no envelhecimento, levando à exacerbação da inflamação central. A neuroinflamação fornece um mecanismo central para doenças associadas ao envelhecimento (Pugazhenti *et al.*, 2017).

Tendo em vista a projeção futura para o crescente número de idosos e a frequência da DA nesta população, e também o crescente número de pessoas com sobrepeso ou obesidade, o estudo de terapias que compartilham mecanismos para prevenir, reduzir ou retardar essas doenças, ou os sintomas produzidos por essas doenças são positivos. Nesse contexto, há um grande interesse em compostos bioativos não nutritivos derivados de alimentos e bebidas na redução do risco de doenças não transmissíveis (Chandrasekara e Shahidi, 2018). As bebidas a base de ervas, consumidas como parte de uma dieta balanceada, podem melhorar o status antioxidante e melhorar o estado geral de saúde. Várias bebidas à base de ervas são consumidas globalmente (Hicks, 2009), e os compostos bioativos naturais presentes nessas bebidas proporcionam uma série de efeitos biológicos benéficos, tais como ação antioxidante, antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antialérgica, antitrombótica e vasodilatadora, bem como efeitos antimutagenicidade, anticarcinogenicidade e antienvhecimento (Chandrasekara e Shahidi, 2018).

Dentre estes produtos de origem vegetal, destaca-se a *Ilex paraguariensis*, também conhecida como erva-mate, uma espécie arbórea nativa da América do Sul, amplamente consumida no sul do Brasil sob a forma de chimarrão, na região centro-oeste na forma de tererê e no restante do país como chás ou infusões (De Andrade *et al.*, 2012). Diversos compostos presentes na *Ilex paraguariensis* possuem uma série de funções biológicas, tais como: estimulação do SNC (Ito *et al.*, 1997), atividade antioxidante (Filip *et al.*, 2001), ação anti-inflamatória e hipocolesterolêmica (Gnoatto *et al.*, 2005). O extrato também é considerado um potente inibidor de radicais livres (Schinella *et al.*, 2005), tanto *in vivo* (Mosimann *et al.*, 2006) quanto *in vitro* (Gugliucci, 1996).

As metilxantinas, cafeína e teobromina são importantes compostos bioativos presente em *Ilex paraguariensis* (Reginato *et al.*, 1999), sendo a cafeína, presente em maior quantidade (Bastos, D. H. M. *et al.*, 2007). Sua significância biológica é atribuída ao fato de serem alcaloides de purina, uma vez que as bases de purina são os principais componentes de nucleoproteínas e desempenham importante papel em organismos vivos (Cunha, 2001; Fredholm *et al.*, 2005).

A cafeína é conhecida por ser a droga mais popular do mundo (Weinberg e Bealer, 2001), diversos estudos mostram que o consumo de cafeína está associado com menor risco de doenças associadas à neuropatologias, como a DA (Maia e De Mendonca, 2002; Eskelinen e

Kivipelto, 2010), doença de Parkinson (DP) (Costa *et al.*, 2010) e demência (Eskelinen e Kivipelto, 2010). Além disso, a administração de cafeína está associada com a reversão do comprometimento cognitivo e redução dos níveis do peptídeo β -amilóide (β A) insolúvel em cérebro de camundongos modelo para DA (Arendash *et al.*, 2009).

Considerando que a obesidade e a DA são problemas de saúde pública, e os estudos relacionando a cafeína, um dos principais componentes bioativos de *Ilex paraguariensis*, como neuroprotetor, buscamos investigar os efeitos do extrato de *Ilex paraguariensis* no metabolismo de lipídios de *Caenorhabditis elegans*, e também seu possível efeito frente a toxicidade do peptídeo β A. Ainda, comparamos o possível efeito neuroprotetor do extrato de *Ilex paraguariensis* com a cafeína isolada.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos do extrato de *Ilex paraguariensis in vivo* sobre o metabolismo lipídico bem como sobre a toxicidade induzida pelo peptídeo β A, utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Investigar o efeito do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* em *C. elegans* sobre comportamentos relacionados a homeostase energética, níveis lipídicos, consumo de oxigênio, atividade antioxidante e determinar as possíveis vias envolvidas;
- Investigar os possíveis efeitos protetores do extrato hidroalcolico de *Ilex paraguariensis* e de um de seus principais constituintes, a cafeína, em um modelo de toxicidade induzida pelo peptídeo β A no nematoide *C. elegans*.
- Determinar os mecanismos de IPHE e cafeína envolvidos na proteção frente a toxicidade do peptídeo β A.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS

A população mundial está envelhecendo. As melhorias nas condições de vida e de saúde no século passado, graças aos progressos políticos, econômicos, sociais e na saúde, contribuíram para as pessoas viverem mais e com uma vida mais saudável (Organization, 1998; Salud e Organization, 2002). No entanto, o envelhecimento populacional também resultou em um maior número de pessoas com doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs).

A Organização Pan-Americana de Saúde – OPAS (2005) caracteriza as DCNTs como doenças de etiologia incerta, com múltiplos fatores de risco, longos períodos de latência, curso prolongado, origem não infecciosa e que não estão associados a deficiências e incapacidades funcionais. Entre as mais importantes estão o câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, hipertensão, obesidade, assim como a DA e outras demências. As DCNTs são o resultado de uma combinação de fatores genéticos, fisiológicos, ambientais e comportamentais, e são responsáveis pela maior causa de morte no mundo. Cerca de 15 milhões de pessoas entre 30 e 70 anos morrem a cada ano por complicações das DCNTs (Who, 2015), no Brasil, as DCNTs são responsáveis por 72 % das causas de morte (Malta e Silva Jr, 2014). Dentro dos países, essas mortes afetam desproporcionalmente os mais pobres.

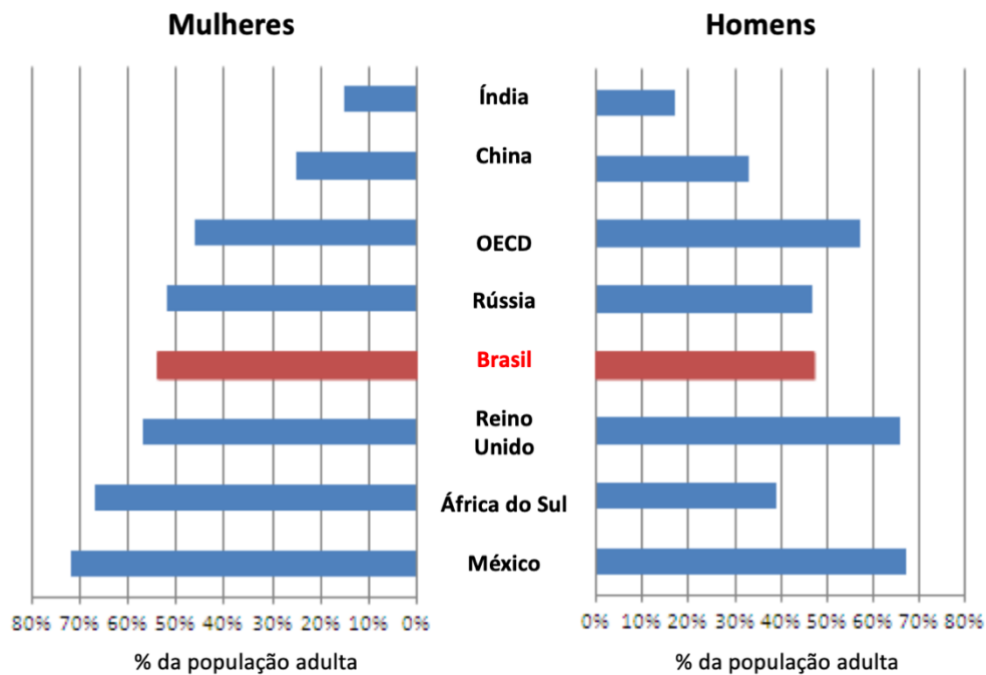
As DCNTs podem incluir muitas doenças que abrangem uma ampla categoria de condições evitáveis e inevitáveis de saúde, causadas por fatores externos, como a luz solar, a nutrição, poluição, estilo de vida; e também fatores intrínsecos como genética e sexo (Malta *et al.*, 2006; Wagner e Brath, 2012; Malta e Szwarcwald, 2017). Uma maneira importante de prevenir ou controlar as DCNTs, quando possível, é reduzir os fatores de risco associados a essas doenças, como dieta, sedentarismo e dependência química (Malta *et al.*, 2006). Quando já instaurada a DCNTs, tratamentos medicamentosos se fazem necessários.

2.1.1 Sobrepeso e Obesidade

A obesidade tem se tornado um problema social de grande ascensão entre a população, sendo considerada uma epidemia mundial (Friedrich, 2002), e nos últimos anos têm chamado atenção de instituições públicas de saúde, uma vez que afeta quase um terço de toda a população. No Brasil, mais da metade da população adulta está acima do peso (Rtveladze *et al.*, 2013) (Figura 1). De acordo com a OMS, o quadro de sobrepeso e obesidade são

definidos quando há um acúmulo anormal ou excessivo de gordura no organismo, ou seja, quando a ingestão energética, principalmente armazenada como triglicerídeos, excede as despesas de energia (Spiegelman e Flier, 2001).

Figura 1 - Taxas de excesso de peso em adultos nos países analisados pela OCDE em 2010



Fonte: Adaptado de Organisation for Economic Co-operation and Development. Disponível em: <<https://www.oecd.org/health/health-systems/thirdlancetseriesonchronicdiseasesbrazil-keyfacts.htm>>. Acesso em: 3 jan. 2020.

A urbanização e industrialização ocorrida no neste século impulsionou uma transição nutricional para uma dieta mais ocidentalizada, caracterizada pela alta ingestão de carboidratos e açúcares refinados, carnes, leite e derivados com grande densidade energética, e a redução do consumo de frutas, cereais, verduras e legumes, a qual, aliada à diminuição progressiva da atividade física, converge para o aumento no número de casos de obesidade em todo o mundo (Monteiro *et al.*, 2000; Popkin *et al.*, 2012). Ainda, com a crescente industrialização, as facilidades de transporte e o trabalho mecanizado também contribuem para o sedentarismo, levando as pessoas a gastarem cada vez menos energia, tornando as necessidades calóricas menores (Hruby e Hu, 2015).

A obesidade é uma doença complexa, influenciada não apenas pela dieta, mas também pela genética, gênero, idade e atividade física (Brockmann e Bevova, 2002). A obesidade está comumente associada à algumas doenças metabólicas, à hipertensão, ao diabetes tipo II e à

resistência insulínica (Pi-Sunyer, 2004). Além disso, outra consequência do aumento do tecido adiposo é o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos adipócitos, que quando em excesso, pode gerar estresse oxidativo sistêmico (Furukawa *et al.*, 2004).

O tecido adiposo não é somente um reservatório de energia, mas também exerce um papel fundamental na integração do metabolismo sistêmico, do sistema endócrino e da regulação da homeostasia (Guzik *et al.*, 2006). As células do tecido adiposo, denominadas adipócitos, estocam energia na forma de triglicerídeos e podem mobilizar essas reservas para ser utilizada durante períodos de privação energética (Large *et al.*, 2004). Além disso, os adipócitos produzem uma variedade de moléculas biologicamente ativas, as adipocinas (Furukawa *et al.*, 2004), como a adiponectina, a resistina, a leptina, a angiotensina, o inibidor da ativação do plasminogênio-1 (PAI-1), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina - 6 (IL-6), a proteína de ligação ao retinol 4 (RBP4), entre outros (Ouchi *et al.*, 2011). Elas medeiam a regulação de vários órgãos e tecidos, como o músculo esquelético, o sistema cardiovascular e o pâncreas (Fang *et al.*, 2014; Romacho *et al.*, 2014). Em condições de excesso de tecido adiposo, ocorre uma condição inflamatória crônica de baixo grau (Yudkin *et al.*, 1999; Bullo *et al.*, 2003), gerando uma produção desregulada das adipocinas. Uma vez que a maioria das adipocinas estimula respostas pró-inflamatórias, elas contribuem assim para o desenvolvimento de diversas complicações relacionadas à obesidade (Goldfarb, 2005; Ouchi *et al.*, 2011). Algumas destas adipocinas também estão envolvidas na resistência à sinalização da insulina (Antuna-Puente *et al.*, 2008).

A insulina é um hormônio anabólico, secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas após as refeições, em resposta ao aumento da concentração dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos, com o objetivo de captar a glicose circulante para vários tecidos periféricos, incluindo músculo esquelético, fígado e tecido adiposo. Os efeitos biológicos da insulina iniciam-se após a ativação do seu receptor, e incluem a síntese de glicogênio, ácidos graxos e proteínas, a ativação da transcrição de genes específicos, modulação do crescimento e diferenciação celular (Wilcox, 2005).

A resistência à insulina é uma condição genética ou adquirida, na qual concentrações fisiológicas de insulina provocam uma resposta menor na captação de glicose pelos tecidos periféricos. Como consequência, torna-se necessária uma maior produção de insulina pelo pâncreas para a manutenção da glicemia, aumentando desta forma os níveis circulantes de insulina e, portanto, a resistência à insulina acompanha em muitos casos a hiperinsulinemia (Saltiel e Kahn, 2001; Wilcox, 2005). A resistência à insulina é um fator de risco para diversas comorbidades, tais como hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus tipo 2 e

dislipidemias. Recentemente, a obesidade tem sido relacionada também a algumas demências como a DA (Mittal *et al.*, 2016).

2.1.2 Doenças Neurodegenerativas

O envelhecimento é caracterizado por um declínio gradual e irreversível das funções orgânicas, que gera diversas modificações em todo o organismo, levando a uma redução progressiva da sua capacidade funcional (Nahas, 2006). Os processos do envelhecimento afetam o SNC através de alterações morfológicas, histológicas e nos sistemas de neurotransmissores. As doenças neurodegenerativas são patologias crônicas comumente relacionadas à idade, caracterizadas pela destruição progressiva e irreversível de certos neurônios, o que leva à um déficit progressivo de funções do SNC.

Doença neurodegenerativa é um termo genérico para uma série de doenças que afetam os neurônios do cérebro humano. Estima-se que existam mais de 600 desordens neurodegenerativas, com diversas manifestações clínicas e patológicas, geralmente essas doenças são de difícil diagnóstico, muitas vezes realizado apenas *post-mortem* (Przedborski *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005). As doenças neurodegenerativas mais comuns são a DA, a DP, a doença de Huntington (DH) e a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) (Przedborski *et al.*, 2003).

As diferentes doenças neurodegenerativas afetam diferentes regiões do cérebro, por exemplo, a DA afeta o córtex cerebral, a DH e a DP levam à destruição dos gânglios da base, e a ELA afeta o sistema motor (Hung *et al.*, 2010; Pievani *et al.*, 2014; Oddone e Imbriani, 2015). Dentre os mecanismos celulares e moleculares que estão envolvidos nessas doenças, destacam-se a agregação de proteínas malformadas, como α -sinucleína na DP, o peptídeo β A na DA, e a huntingtina na DH, além de inflamação e estresse oxidativo que estão presentes em todas essas doenças (Ross e Poirier, 2004)

O aumento da expectativa de vida e conseqüentemente o progressivo envelhecimento da população facilitam o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas (Albert, 1996). À medida que a população mundial envelhece, o número de indivíduos em risco para demência também aumenta. Estima-se que 35,6 milhões de pessoas viviam com demência em 2010, e esses números quase dobram a cada 20 anos, podendo chegar a 65,7 milhões de pessoas em 2030 (Prince *et al.*, 2013), sendo a DA, a doença neurodegenerativa mais comum que causa demência.

2.1.2.1 Doença de Alzheimer

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva e crônica, sendo a forma mais comum de demência em pessoas de idade, e compreende cerca de 60 a 80% dos casos de demência nessa população (Alzheimer's, 2015). Os sintomas da DA costumam aparecer após os 65 anos de idade, e envolvem deterioração cognitiva e da memória de curto prazo, além de uma variedade de sintomas neuropsiquiátricos e alterações comportamentais e motoras que se agravam ao longo do tempo. A DA é normalmente associada à mutações nos genes da Proteína Precursora do Amilóide (PPA) e das Presenilinas 1 e 2 (Revett *et al.*, 2013).

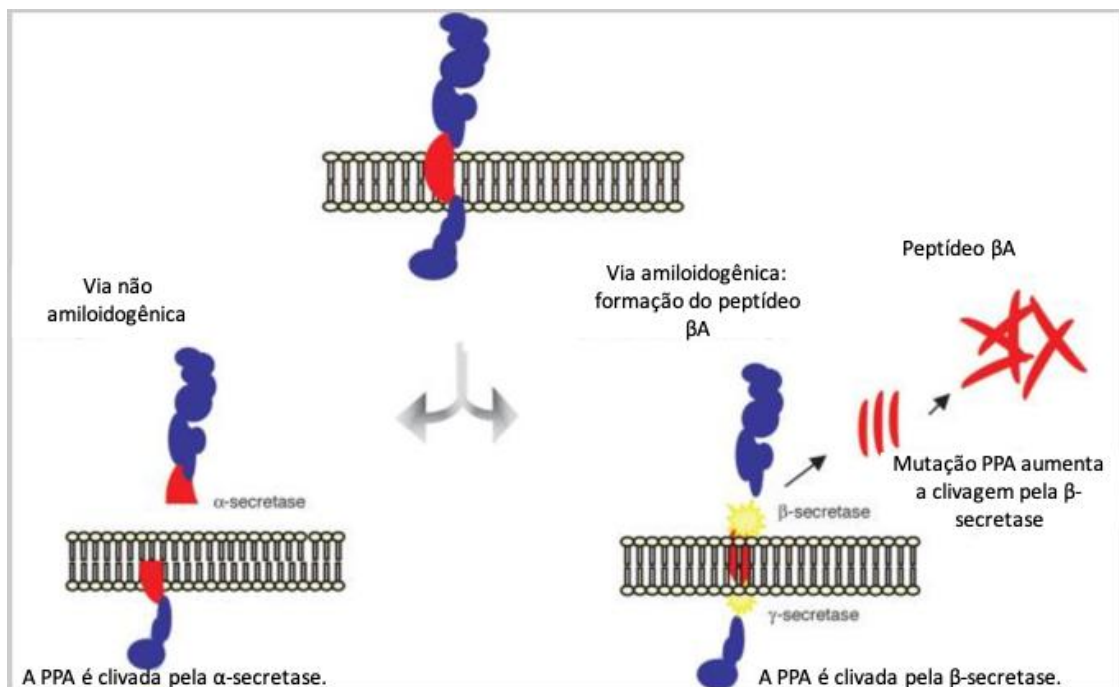
As características clínicas e neuropatológicas da DA foram primeiramente descritas na Alemanha, pelo psiquiatra alemão Alois Alzheimer (Alzheimer, 1907), que tratou um paciente de 51 anos, no hospital de Frankfurt com perda progressiva de memória, delírios e alucinações. No exame *post-mortem*, Alzheimer identificou placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares no cérebro do paciente, as características neuropatológicas da DA. Mesmo após anos de estudo, a etiologia da DA ainda é desconhecida, mas é provável que seja o resultado de fatores genéticos e ambientais (Aisen *et al.*, 2011), e que raramente ocorre antes dos 50 anos de idade.

As características neuropatológicas da DA incluem placas amiloides extracelulares difusas e neuríticas em campos terminais do neocórtex, constituídas principalmente pelo peptídeo β A insolúvel derivado da PPA; emaranhados neurofibrilares intraneuronais da proteína tau nas estruturas do lobo temporal medial (Lublin e Gandy, 2010), morte neuronal e maior formação de radicais livres no cérebro (Benzi e Moretti, 1995; Markesbery, 1997) (Querfurth e Laferla, 2010). Em células normais, a tau é uma proteína envolvida na montagem e estabilização de microtúbulos das células neuronais, entretanto na DA ocorre uma hiperfosforilação dessa proteína que passa a se agregar em filamentos helicoidais emparelhados e sua capacidade de estabilização dos microtúbulos é perdida. Isso pode causar uma falha no transporte neuronal de organelas e vesículas, que eventualmente leva à morte celular (Mandelkow e Mandelkow, 1998; Mi e Johnson, 2006).

Os peptídeos β A são produzidos normalmente pelo metabolismo celular, sendo provenientes da clivagem da PPA na via não amiloidogênica pela α -secretase e posteriormente pela γ -secretase, gerando peptídeos sem importância patológica, e cujas funções ainda não estão bem elucidadas (Revett *et al.*, 2013). A PPA é uma proteína transmembrana presente em grande quantidade no SNC, sua função fisiológica parece estar relacionada a uma variedade de funções, incluindo adesão celular, regulação das interações

célula/célula ou célula/matriz e mediação do crescimento de neuritos (Clippingdale *et al.*, 2001; Selkoe, 2001). Em indivíduos portadores da DA, a PPA é clivada preferencialmente pela β -secretase, e em seguida pela γ -secretase na via amiloidogênica, gerando os peptídeos β A tóxicos (Revett *et al.*, 2013) (Figura 2). O acúmulo de β A se dá pelo desequilíbrio entre a produção e recaptação do mesmo, levando à agregação dos peptídeos, e este excesso torna-se o fator de início da DA (Selkoe, 2001). A importância do peptídeo β A na patologia da DA foi destacada pelo fato de que vários compostos que inibem a formação desse peptídeo são estudados em testes clínicos como possíveis terapias para a DA (Dasilva *et al.*, 2010).

Figura 2 - A PPA clivada por enzimas secretases.



Fonte: Adaptado de Paula *et al.* (2009)

O metabolismo energético cerebral também se encontra alterado nos estágios iniciais do comprometimento cognitivo causado pela DA, isso ocorre devido à uma deficiência na utilização da glicose pelos tecidos do cérebro. O processo de resistência à insulina celular no cérebro de pacientes com DA está cada vez mais evidente, incluindo naqueles sem diabetes sistêmica e, por esta razão, alguns autores têm se referido a DA como “diabetes tipo 3” (Steen *et al.*, 2005; De La Monte e Wands, 2008). A diabetes mellitus tipo 3 corresponde a uma resistência crônica à insulina limitada somente ao cérebro, portanto ela pode se sobrepor ao diabetes tipo 1 ou 2. O diabetes tipo 3 representa um dos principais mecanismos patogênicos da neurodegeneração da DA (Rivera *et al.*, 2005; Steen *et al.*, 2005).

Por ser um transtorno multifatorial e complexo, os detalhes da etiologia da DA ainda não são compreendidos em um nível adequado para a descoberta de fármacos efetivos para sua cura. Sabendo que a deficiência colinérgica está presente no cérebro de pacientes com DA (Hampel *et al.*, 2019), os inibidores da enzima acetilcolinesterase, que clivam a acetilcolina na sinapse colinérgica, são a abordagem terapêutica mais consistente (Bullock, 2002). De acordo com o protocolo clínico e as diretrizes terapêuticas para a DA do Brasil (Brasil, 2013), o tratamento atual é constituído da administração dos fármacos anticolinesterásicos, como Donezepil, Galantamina e Rivastigmina, que tem como objetivo apenas a redução da velocidade de progressão da doença e a melhora da memória e atenção. Esses fármacos causam efeitos colaterais colinérgicos como náusea, vômito, diarreia, dor abdominal bradicardia e insônia (Jann, 1998).

Ainda, a DA favorece o vazamento de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial e a produção de radicais livres no cérebro (Benzi e Moretti, 1995), combinações de antioxidantes naturais são bons candidatos como adjuvantes no tratamentos contra a DA. Eles oferecem uma variedade de mecanismos para reduzir os metabólitos do oxigênio nos tecidos, e podem alterar vias de sinalização, modular fatores de transcrição, e também desempenham funções-chave na redução dos danos celulares causados pelas EROs nos tecidos.

2.1.3 Obesidade e Doenças Neurodegenerativas

Diabetes e obesidade estão entre os fatores de risco para a DA, que é a forma mais comum de demência. Estudos identificaram vários mecanismos sobrepostos em ambas as doenças, incluindo estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e inflamação crônica (Pugazhenthii *et al.*, 2017). Um estudo que mediu o diâmetro abdominal sagital dos participantes observou que indivíduos com o maior diâmetro tinham um risco quase três vezes maior de desenvolver demência, quando comparados com aqueles com o menor diâmetro (Whitmer *et al.*, 2008). Outro estudo observou que uma relação cintura-quadril maior está associada à diminuição do volume do hipocampo (Jagust *et al.*, 2005). Além disso, a ligação entre obesidade na meia-idade e o risco futuro de demência tem sido relatada por vários estudos (Whitmer *et al.*, 2005; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Hassing *et al.*, 2009; Hassing *et al.*, 2010; Anstey *et al.*, 2011). Já um estudo de projeção de coorte baseado em uma população australiana mostrou que a demência na velhice poderia ser reduzida em 10% até 2050 se a obesidade na meia-idade diminuísse 20% (Nepal *et al.*, 2014). A inflamação crônica de baixo

grau associada à obesidade na meia-idade fornece um vínculo mecanicista ao declínio cognitivo progressivo por meio de interligações com a inflamação central.

A dieta rica em gordura é uma das principais causas de sobrepeso e obesidade. Níveis cronicamente elevados de ácidos graxos livres circulantes causam muitos efeitos deletérios, incluindo inflamação de baixo grau, que desempenha um papel importante na resistência à insulina (Avogaro, 2006; Fain, 2006). Estudos que examinam as vias inflamatórias na obesidade descobriram diversos eventos inflamatórios em comum na diabetes e obesidade (Lee *et al.*, 2013; Snodgrass *et al.*, 2013). Embora os ácidos graxos esterificados passem pela barreira hematoencefálica em capacidade limitada (Purdon *et al.*, 1997), a captação de ácidos graxos pelo cérebro e o subsequente acúmulo de ácidos graxos foram observados em indivíduos com síndrome metabólica (Karmi *et al.*, 2010). Além disso, embora o cérebro seja um órgão protegido das doenças imunológicas, os danos à barreira hematoencefálica observados com o envelhecimento, e também por uma dieta rica em gordura, podem favorecer a infiltração de mediadores inflamatórios do sistema imune, aumentando a inflamação central (Davidson *et al.*, 2012; Freeman e Granholm, 2012; Tucsek *et al.*, 2014; Pugazhenthii *et al.*, 2017)

Estudos mostram que uma dieta rica em gordura pode promover a patogênese da DA, enquanto uma dieta com ácido docosahexaenóico (DHA), um ácido graxo do tipo omega-3, tem efeitos protetores contra a DA (Cole *et al.*, 2010). O mecanismo envolvido parece ser através da ativação do sistema imunológico, porque os ácidos graxos saturados induzem uma resposta inflamatória através da proteína do receptor *toll-like 4* (TLR4) no hipotálamo, que leva a geração de citocinas pró-inflamatórias nos astrócitos (Milanski *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2012). A perda de função do TLR4 protege contra a obesidade induzida pela dieta. Além disso, a proteína tau foi encontrada em níveis elevados em camundongos diabéticos e também portadores da DA, independentemente do status metabólico periférico, indicando uma ligação molecular entre essas doenças (Takalo *et al.*, 2014). Ademais, ácidos graxos livres estimulam a polimerização da proteína tau e do peptídeo β A insolúvel *in vitro* (Wilson e Binder, 1997). Esses estudos sugerem fortemente que os ácidos graxos saturados podem influenciar a neuroinflamação, seja diretamente ao atravessar a barreira hematoencefálica, ou indiretamente através da infiltração de mediadores inflamatórios do sistema imune. Este poderia ser um dos mecanismos pelos quais a obesidade causa disfunção cognitiva.

A perda de peso e o controle agressivo da glicose não são estratégias intervencionistas ideais para os idosos diabéticos ou obesos (Kirkman *et al.*, 2012). Eles precisam ser iniciados na meia idade e não na velhice. O conhecimento adquirido em estudos que examinam as vias

neurodegenerativas crônicas associadas à obesidade, podem levar ao desenvolvimento de agentes terapêuticos que atrasam o declínio cognitivo e melhoram a qualidade de vida desses indivíduos.

2.2 O ESTRESSE OXIDATIVO ASSOCIADO ÀS PATOLOGIAS

O metabolismo celular produz fisiologicamente radicais livres, moléculas contendo um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais externos, o que confere um considerável grau de reatividade aos radicais livres. As mitocôndrias são a maior fonte endógena de radicais livres nos eucariotos (Hekimi *et al.*, 2011), gerando EROs como subprodutos da respiração celular. As EROs no organismo também podem ser formadas através de algumas atividades enzimáticas (xantina oxidase e ciclooxigenases, por exemplo) e também como sistema de defesa em células fagocíticas e de transdução de sinal (Halliwell, 1994; Park *et al.*, 2004; Finkel, 2011). Dentre as EROs, as principais são o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil ($OH\cdot$), o oxigênio singleto (1O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Halliwell e Gutteridge, 1999). Geralmente, as espécies reativas podem ser neutralizadas por antioxidantes enzimáticos (como superóxido dismutase e catalase) e não enzimáticos (como glutathione e vitamina C) (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2000; Santamaria *et al.*, 2003). A formação de EROs, em concentrações fisiológicas, é necessária para a função celular normal, mas em quantidades excessivas, pode levar ao estresse oxidativo (Nordberg e Arner, 2001).

O estresse oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a sua neutralização pelos sistemas antioxidantes, ou pela redução da capacidade de reparo dos danos gerados em componentes celulares, que podem incluir proteínas, lipídios e DNA (Halliwell e Gutteridge, 1999). O estresse oxidativo é gerado em uma série de doenças como obesidade, aterosclerose, câncer e desordens neurodegenerativas, levando a uma gama de prejuízos aos componentes celulares, como: peroxidação dos lipídeos de membrana, oxidação de receptores hormonais e enzimas (Magder, 2006; Leonarduzzi *et al.*, 2010), e oxidações de bases do DNA que podem culminar em processos mutagênicos e tumorais (Svilar *et al.*, 2011).

Dessa forma, o estresse oxidativo causa danos celulares em uma diversidade de anormalidades clínicas, incluindo aquelas relacionadas ao SNC (Hayashi, 2009), ao excesso de tecido adiposo (Furukawa *et al.*, 2004), câncer (Afanas'ev, 2014), doenças cardiovasculares (Ho *et al.*, 2013), entre outras. O dano oxidativo pode ser sistêmico, ou pode ocorrer apenas no local de origem, sendo o cérebro um órgão particularmente suscetível ao dano oxidativo.

Isso se deve, entre outras causas, ao seu alto consumo de oxigênio e à sua concentração relativamente baixa de antioxidantes e concentração elevada de metais de transição, como o ferro, e de ácidos graxos poli-insaturados, propiciando a ocorrência de peroxidação lipídica (Reiter, 1995; Halliwell, 2006). Há evidências de que compostos que atuam removendo radicais livres ou evitando a sua formação são capazes de prevenir ou retardar o dano oxidativo secundário às doenças (Neha *et al.*, 2019).

2.3 COMPOSTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Nutracêutico é um termo utilizado para nomear compostos bioativos presentes nos alimentos que desempenham papel significativo na modificação e manutenção da função fisiológica normal que mantém os seres humanos saudáveis (Das *et al.*, 2012). Os nutracêuticos podem ser divididos em produtos à base de plantas, suplementos alimentares e alimentos funcionais (Joshi, 2003), esses compostos nutracêuticos têm propriedades antioxidantes e outras propriedades que promovem a saúde. A legislação brasileira não prevê a categoria nutracêuticos. No Brasil a ANVISA enquadra substâncias e alimentos com propriedades nutracêuticas em uma das seguintes categorias: Substâncias bioativas, Alimentos funcionais, Suplementos alimentares, os quais entram dentro da legislação brasileira de alimentos, e ainda fitoterápicos, que entram dentro da legislação brasileira de medicamentos. Os polifenóis são enquadrados como substâncias bioativas (Lima, 2002), e a cafeína também (Brasil, 2018).

Nos últimos anos existe um crescente interesse no mercado nutracêutico em todo o mundo, a principal razão para o crescimento desse mercado é o novo estilo de vida adotado pelas pessoas, que mudaram os hábitos alimentares básicos. Vários estudos mostram que a alta ingestão de compostos bioativos está associada com uma redução no risco de uma variedade de doenças crônicas (Joshi, 2003; Van Breda e De Kok, 2018). Uma vez que a produção de EROs e outros radicais livres que resultam em estresse oxidativo estão envolvidos em diversas doenças crônicas (Willcox *et al.*, 2004), a capacidade antioxidante dos nutracêuticos parece ser de relevante importância. Há também estudos indicando a ação neuroprotetora de plantas e substâncias que possuem atividade antioxidante, tais como a Ginkgo biloba, a cafeína e algumas vitaminas (Rosler *et al.*, 1998; Eskelinen e Kivipelto, 2010; Cao *et al.*, 2013; Panahi *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2019).

Devido a variedade de espécies vegetais e à presença de diferentes compostos com atividades biológicas em seus extratos, aumenta o número de substâncias com atividades

nutracêuticas. Dentre os principais compostos com atividades biológicas presentes nos extratos, podemos citar as vitaminas, como a vitamina C, vitamina E e carotenoides, que possuem atividade antioxidante, e atuam na prevenção de reações oxidativas que levam a diversas doenças crônicas (Pham-Huy *et al.*, 2008); polifenóis, que possuem atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, cardioprotetoras e desempenham um papel na prevenção de doenças neurodegenerativas e diabetes mellitus (Scalbert *et al.*, 2005); e as metilxantinas, que exercem múltiplas funções fisiológicas, incluindo no sistema nervoso, respiratório e cardíaco, além de também possuir propriedades antioxidantes (Carrageta *et al.*, 2018).

Assim, existe uma diversidade de compostos bioativos não nutritivos derivados de alimentos e bebidas que podem funcionar como coadjuvantes em tratamentos para muitas patologias. Diversas doenças podem ser tratadas de forma mais eficiente a partir de novos e potentes fármacos de origem vegetal (Simões, 2001).

2.3.1 *Ilex paraguariensis*

Ilex paraguariensis (St. Hill. Aquifoliaceae), é uma espécie arbórea nativa da América do Sul, também conhecida como erva-mate, e cresce naturalmente em países como a Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil. Suas partes aéreas são usadas para a preparação de uma bebida de sabor amargo e peculiar, feita pela infusão ou decocção de suas folhas, regionalmente conhecida como chimarrão ou tererê em Português, ou mate em espanhol (De Andrade *et al.*, 2012). Além das formas tradicionais de consumo, a erva-mate também é consumida na forma de chá-mate, uma bebida que tem se popularizado a cada ano, principalmente pelos benefícios à saúde que são veiculados pela mídia (Bastos e Torres, 2003).

O extrato de *Ilex paraguariensis* possui alguns minerais como fósforo, ferro e cálcio (Graham, 1984) e vitaminas como E, C, tiamina, niacina, riboflavina, ácido pantotênico e betacaroteno (Bixby *et al.*, 2005). Compostos bioativos também estão presentes, como flavonoides, taninos, saponinas e metilxantinas (Pang *et al.*, 2008), nesta última classe de compostos, estão a cafeína, teobromina e a teofilina (Reginato *et al.*, 1999), sendo a cafeína presente em maior quantidade (Bastos *et al.*, 2007). Dentre as saponinas, podemos citar as gliconas, ácido ursólico e ácido oleanólico (Schinella *et al.*, 2000). Dentre os compostos fenólicos, encontram-se derivados cafeoilquínicos, como o ácido clorogênico. Também estão presentes os flavonóides rutina, quercetina, diglicosídeo de luteolina, taninos e a cafeoilglicose (Filip *et al.*, 2001; Bracesco *et al.*, 2003).

Sua composição varia conforme a região em que a planta é cultivada, tipo de solo, água, fertilizantes, processo industrial e condições de estocagem. Além disso, a viabilidade dos componentes presentes em *Ilex paraguariensis* também depende da solubilidade dos compostos envolvidos, de como é preparado (tempo de extração e temperatura) e ingerido (Giulian *et al.*, 2007).

A erva-mate é reconhecida mundialmente por seu valor nutricional e medicinal, e atualmente está incluída em importantes farmacopeias como a Martindale e a British Herbal Pharmacopeias (Wisher, 2012; Pharmacopoeia, 2016). Em relação à toxicidade, um estudo realizado com ratos e coelhos não encontrou efeitos tóxicos para as espécies estudadas (De Andrade *et al.*, 2012), por fim, estudos em diversos modelos invertebrados como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Saccharomyces cerevisiae* também não encontraram efeitos tóxicos (Bracesco *et al.*, 2003; Bracesco *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2014; Niraula *et al.*, 2018).

Diferentes efeitos foram descritos para *Ilex paraguariensis*, como estimulação do SNC (Ito *et al.*, 1997), atividade antioxidante (Filip *et al.*, 2001; Berte *et al.*, 2011; Bracesco *et al.*, 2011; Cuelho *et al.*, 2018), ação anti-inflamatória (Luz *et al.*, 2016), antiobesidade (Arcari *et al.*, 2013; Gambero e Ribeiro, 2015; Choi *et al.*, 2017), hipocolesterolêmica (Gnoatto *et al.*, 2005) e neuroprotetora (Prediger *et al.*, 2008; Branco Cdos *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2015; Ludka *et al.*, 2016). Os efeitos antioxidantes e neuroprotetores foram demonstrados tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em diferentes modelos como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e mamíferos, além de em seres humanos (Heck e De Mejia, 2007; Bracesco *et al.*, 2011; Riachi e De Maria, 2017; Gan *et al.*, 2018). Diversos efeitos neuromoduladores também foram observados, incluindo efeito antiparkinsoniano em camundongo (Milioli *et al.*, 2007), efeitos anticonvulsivantes e neuroprotetores em crises induzidas por pentilenotetrazol em ratos (Branco Cdos *et al.*, 2013), efeito antidepressivo (Reis Ede *et al.*, 2014; Ludka *et al.*, 2016) e melhora da memória e aprendizado em ratos (Prediger *et al.*, 2008).

2.3.1.1 Cafeína

Cafeína, a substância mais popular do mundo (Weinberg e Bealer, 2004), é um alcaloide do grupo das xantinas, identificado como 1,3,7-trimetilxantina. Esse alcaloide é encontrado em grande quantidade nas sementes de café, chocolate e nas folhas verdes, e é a metilxantina encontrada em maior concentração em *Ilex paraguariensis*, cerca de 1% a 2% do peso seco (Ito *et al.*, 1997; Heck e De Mejia, 2007). A concentração de cafeína consumida em 1 xícara

de chá-mate é de aproximadamente 78 mg (em aproximadamente 150 mL). Comparado ao café, o consumo de cafeína é muito semelhante, cerca de 85 mg por xícara. No entanto, a taxa habitual de consumo de *mate* preparada no método tradicional pode apresentar uma ingestão de até cerca de 500 mL, resultando em 260 mg ou mais de cafeína (Mazzafera, 1997).

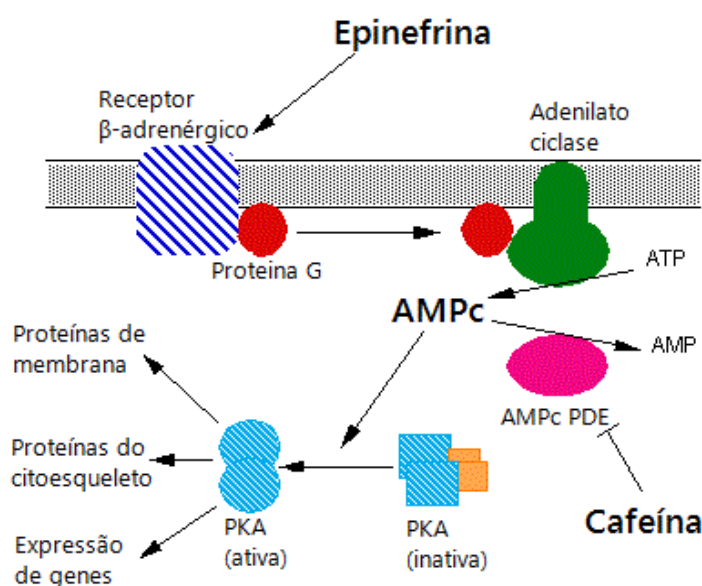
A cafeína é o psicoestimulante mais consumido do mundo, estima-se que seja consumida por mais de 80% da população (Barone e Roberts, 1996; Heckman *et al.*, 2010). A absorção da cafeína ocorre rapidamente em humanos, atingindo o pico médio de concentração plasmática até 45 minutos após a ingestão (Durlac *et al.*, 2002), com uma meia vida plasmática de aproximadamente 3 a 7 horas (Graham, 2001). Após a absorção, a cafeína sofre metabolismo de primeira passagem pouco significativo (Devoe *et al.*, 1993), por ser uma molécula hidrofóbica, a cafeína tem passagem facilitada por todas as membranas biológicas, não havendo restrição de acesso ao SNC pela barreira hematoencefálica (Chou, 1992).

A significância biológica da cafeína é atribuída ao fato desta ser um alcaloide de purina, uma vez que as bases de purina são os principais componentes de nucleoproteínas e desempenham importante papel em organismos vivos. A ação farmacológica da cafeína pode ser mediada por diversos mecanismos, como antagonismo dos receptores de adenosina A1 e A2A no SNC (Nehlig *et al.*, 1992a; Fredholm, B. B. *et al.*, 1999) e inibição de fosfodiesterases, liberação de cálcio intracelular e bloqueio dos receptores GABA subtipo GABA_A (Nehlig *et al.*, 1992b). Entretanto, em doses consumidas normalmente, o antagonismo dos receptores A1 e A2A é o principal mecanismo de ação da cafeína (Fredholm, Bertil B. *et al.*, 1999), o qual exerce ações inibitórias e excitatórias, respectivamente, sobre a transmissão sináptica (Cunha, 2001)

Além do SNC, o receptor do tipo A1 também é encontrado no tecido adiposo humano branco e marrom (Linden, 1991), e está envolvido no controle da obesidade. O receptor tipo A1 é uma proteína transmembrana ligada a proteína G e tem como principal alvo a enzima adenilato ciclase (Linden, 1991). A ligação da adenosina ao receptor A1 leva a inibição da adenilato ciclase e a diminuição dos níveis de AMP cíclico (AMPC) no tecido adiposo, e portanto, inibe a lipólise (Challiss *et al.*, 1992). Desse modo, receptores de adenosina são alvos farmacológicos para controle da obesidade e diabetes (Gharibi *et al.*, 2012). Um estudo realizado com adipócitos de ratos Zucker (fa/fa), uma linhagem de ratos obesos, mostrou que quando incubados com 8-fenilteofilina, um antagonista do receptor de adenosina tipo A1, a produção de AMPC foi suficiente para aumentar a lipólise nas células obesas (Lanoue e Martin, 1994). A cafeína por sua vez, bloqueia os receptores de adenosina tipo A1, e aumenta os níveis de AMPC, e, portanto, aumenta a lipólise (Panchal *et al.*, 2012).

Outro mecanismo de ação da cafeína envolvendo o metabolismo energético é a inibição direta da enzima fosfodiesterase (PDE), que previne a quebra intracelular de AMPc. O AMPc disponível ativa a proteína kinase A (PKA) (figura 3), que fosforila substratos específicos, como a lipase sensível a hormônio, enzima que ativada, é responsável pelo aumento da lipólise (Nehlig *et al.*, 1992b). Estudos demonstram que a cafeína aumenta a quantidade de energia disponível, sob a forma de ácidos graxos livres circulantes através de lipólise de triacilgliceróis (Acheson *et al.*, 1980; Acheson *et al.*, 2004). Estes fatos reforçam a importância do receptor de adenosina do tipo A1 no controle da obesidade e, portanto, deve ser considerado como um potencial alvo terapêutico para o tratamento da obesidade.

Figura 3 – Ação da Cafeína sob a fosfodiesterase (PDE)



Fonte: Adaptado de <<http://flipper.diff.org/apptagsaccount/pathways/364>>. Acesso em: 20 jan. 2020.

Além de seus efeitos no metabolismo energético, estudos com cafeína demonstraram efeitos neuroprotetores em modelos experimentais de hipóxia e isquemia (De Mendonca *et al.*, 2000). O consumo de cafeína está associado a um menor risco para doenças neurodegenerativas associadas a idade, como DA (Maia e De Mendonca, 2002; Eskelinen e Kivipelto, 2010), DP (Costa *et al.*, 2010) e demência. Além disso, existe uma relação inversa entre o consumo de cafeína e o comprometimento da memória associado ao envelhecimento e à DA (Eskelinen *et al.*, 2009; Eskelinen e Kivipelto, 2010; Gelber *et al.*, 2011; Chu *et al.*, 2012; Carman *et al.*, 2014). O efeito benéfico da cafeína sobre a memória também foi

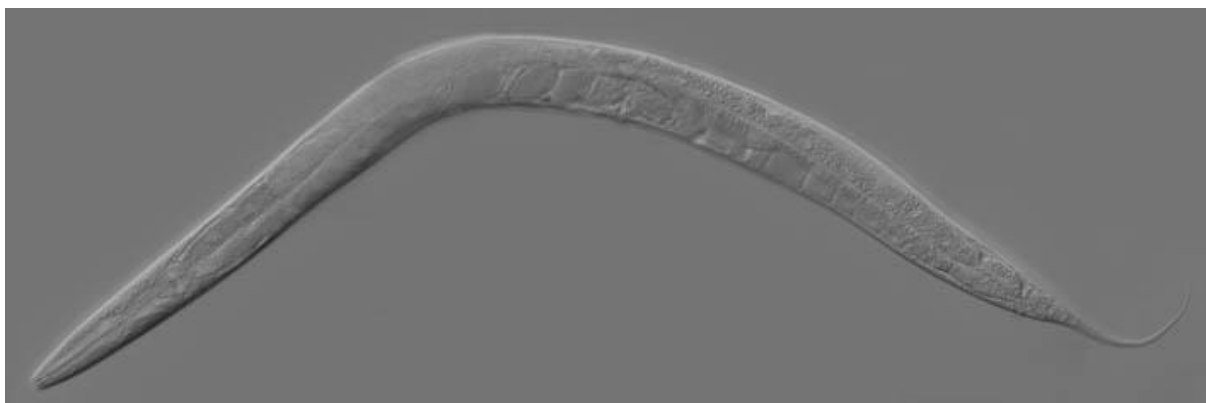
observado em roedores idosos (Arendash *et al.*, 2009; Leite *et al.*, 2011; Vila-Luna *et al.*, 2012). A administração de cafeína tem sido relacionada a reversão do comprometimento cognitivo e menores níveis de β A cerebral em camundongos modelo para a DA (Arendash *et al.*, 2009).

Na DA, o receptor de adenosina tipo A1 encontra-se acumulado em estruturas neurodegenerativas. Um estudo com linhagem celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano mostrou que o uso de agonistas para receptor A1 causou um aumento na produção de PPA e da fosforilação e translocação da tau (Angulo *et al.*, 2003). Em camundongos, antagonistas dos receptores de adenosina, incluindo a cafeína, preveniram o acúmulo do peptídeo β A no cérebro (Gahr *et al.*, 2013; Cupino e Zabel, 2014). Portanto, os receptores de adenosina são possíveis alvos na terapia da DA. Estudos no modelo *C. elegans* mostraram que a cafeína atrasa o envelhecimento e protege os animais contra doenças associadas a idade (Dostal *et al.*, 2010; Lublin *et al.*, 2011; Sutphin *et al.*, 2012; Bridi *et al.*, 2015).

2.4 O NEMATÓDEO *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans foi introduzido pela primeira vez por Sydney Brenner em 1963, como um modelo para estudar o desenvolvimento e neurobiologia (Brenner, 1974), hoje em dia é um organismo utilizado para análises genéticas, neurotoxicidade, toxicologia e para estudos relacionados ao metabolismo e envelhecimento (Leung *et al.*, 2008). *C. elegans* (figura 4) é um nematódeo de vida livre, pequeno (± 1 mm) que habita solos úmidos e usa bactérias como fonte de alimento.

Figura 4 – *Caenorhabditis elegans* adulto



Fonte: OpenWetWare. Disponível em: <https://openwetware.org/wiki/BISC219/F11:_Worm_Info>. Acesso em: 10 fev. 2020.

Em condições controladas de temperatura (22°C), *C. elegans* se desenvolve de ovos a adultos em cerca de 2,5 dias. Normalmente, após a eclosão do ovo, as larvas passam por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) até o estágio adulto jovem e posteriormente adulto que produz ovos (Riddle *et al.*, 1997b), como mostra a figura 5. Em situações extremas de temperatura ou falta de alimento, o desenvolvimento larval é interrompido no estágio L2 com formação da larva dauer, um estágio de diapausa, cujo crescimento é retomado quando se encontram novamente em um ambiente favorável (Riddle *et al.*, 1997b).

Figura 5 - Ciclo de vida de *C. elegans*



Fonte: Adaptado de Worm Atlas. Disponível em:

<<https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/IMAGES/introfig6leg.htm>>. Acesso em: 5 mar. 2020.

O hermafrodita adulto é anatomicamente simples, com 959 células somáticas que formam diferentes órgãos e tecidos (Sulston *et al.*, 1983), seu genoma é composto de aproximadamente 20 mil genes (Hodgkin, 2005), e suas vias metabólicas e biossintéticas são altamente conservados em relação aos mamíferos (Riddle *et al.*, 1997b; Nass e Blakely, 2003). Cerca de 60-80% dos genes humanos possui um ortólogo no genoma de *C. elegans* (Kaletta e Hengartner, 2006). Também, através de construções transgênicas é possível estudar

os mecanismos envolvidos na citotoxicidade de diversas doenças humanas que não existem um gene ortólogo em *C. elegans*.

C. elegans possui um sistema nervoso simples com 302 neurônios no adulto hermafrodita, mas altamente especializado na transmissão de informações (White *et al.*, 1986), e possui o sistema de neurotransmissores conservado, incluindo o colinérgico, dopaminérgico, glutamatérgico, serotoninérgico e gabaérgico (Riddle *et al.*, 1997a; Bargmann e Kaplan, 1998). Ainda, mutantes genéticos e vermes *knockouts* podem ser facilmente gerados e estão disponíveis para a pesquisa (Fire *et al.*, 1998; Wicks *et al.*, 2001), como por exemplo o gene *ador-1*(ox489), ortólogo ao receptor de adenosina (Consortium, 1998), onde através da estirpe EG6870, que possui perda de função do gene *ador-1*, possibilita estudos envolvendo o sistema purinérgico em *C. elegans*. Estes elementos, aliado ao fácil cultivo e manutenção, tornam *C. elegans* um atrativo modelo para estudos relacionados ao metabolismo.

Através do corpo transparente de *C. elegans* é possível a visualizar o nível celular por meio de técnicas não invasivas, o que torna possível a visualização da anatomia, vias de sinalização, estruturas celulares e de transcritos marcados com proteínas fluorescentes em tempo real. *C. elegans* é um organismo de fácil manipulação genética, através da construção de estirpes transgênicas com deleção ou superexpressão de genes de interesse (Praitis *et al.*, 2001; Frokjaer-Jensen *et al.*, 2008; Kaymak *et al.*, 2016), ou também através do silenciamento de genes via RNA de interferência (RNAi) (Fire *et al.*, 1998). Ainda, milhares de animais mutantes já foram produzidos e estão disponíveis para a comunidade científica no Centro de Genética de *Caenorhabditis elegans* (<https://cgc.umn.edu>) e as sequências gênicas estão depositadas no banco de dados online chamado *WormBase* (<https://wormbase.org>). Tomadas em conjunto, estudos com o nematódeo *C. elegans* tem valor preditivo e servem para acelerar pesquisas e seguir para intervenções terapêuticas.

2.4.1 *Caenorhabditis elegans* e o metabolismo lipídico

O metabolismo lipídico de *C. elegans* compreende todo o conjunto de reações químicas que permite o animal reproduzir, desenvolver e manter sua estrutura. , O sistema nervoso de *C. elegans* regula o conteúdo lipídico através da modulação da alimentação e da atividade metabólica, e os lipídios são as principais moléculas de armazenamento energético. Os principais lipídeos encontrados em *C. elegans* são predominantemente triglicerídeos, e em menor quantidade fosfolipídios e esfingolipídios, que são formados a partir de ácidos graxos absorvidos diretamente da bactéria (Braeckman *et al.*, 2009). Muitas proteínas envolvidas em

sintetizar, armazenar, oxidar e transportar lipídeos são altamente preservados entre *C. elegans* e mamíferos (Jones e Ashrafi, 2009).

As vias metabólicas do açúcar e da gordura são conservadas em *C. elegans* (Ashrafi *et al.*, 2003). Sob condições aeróbicas, o açúcar é convertido em piruvato na glicólise, e pequenas quantidades de ATP são geradas. O piruvato produzido é translocado para as mitocôndrias, e convertido em acetil-CoA (Braeckman *et al.*, 2009). Já a oxidação dos ácidos graxos para a produção de ATP ocorre nas mitocôndrias e peroxissomos via enzimas da β -oxidação, e também resulta na formação de acetil-CoA (Zhang *et al.*, 2010). Todo o acetil-CoA gerado serve como substrato para o ciclo do ácido tricarboxílico, e para a cadeia transportadora de elétrons, que alimentam a cadeia respiratória mitocondrial (Ashrafi, 2007).

A regulação do metabolismo lipídico em *C. elegans* envolve uma complexa rede de genes com funções na percepção de alimento, sinalização neuroendócrina, captação, transporte, armazenamento e utilização de gorduras (Ashrafi, 2007). *C. elegans* não possui tecido de armazenamento especializado, portanto, o excesso energético é armazenado em gotículas de gordura nas células dos enterócitos, hipoderme e gônada (Ashrafi, 2007). Devido sua transparência, essas reservas de gordura podem ser facilmente visualizadas nos animais intactos através da utilização de corantes específicos.

Ortólogos de *C. elegans* estão disponíveis para a maioria dos genes envolvidos no metabolismo lipídico. Como exemplo, podemos citar o gene que codifica o receptor nuclear hormonal, o *nhr-49*, que controla o metabolismo energético no nematódeo através da expressão de enzimas da β -oxidação (Van Gilst *et al.*, 2005). NHR-49 mostra homologia funcional aos receptores ativados por proliferador de peroxissoma de mamíferos (PPAR α) – que são um grupo de proteínas receptoras nucleares que funcionam como fatores de transcrição que regulam a expressão de diversos genes envolvidos na regulação da diferenciação celular, desenvolvimento e metabolismo (carboidratos, lipídios, proteínas) (Chawla *et al.*, 2001). Esse receptor é um alvo importante para tratamentos de doenças metabólicas, incluindo diabetes e obesidade. Portanto, *C. elegans* mutantes para o receptor NHR-49 possibilitam o estudo do metabolismo energético através da redução da expressão de enzimas da β -oxidação.

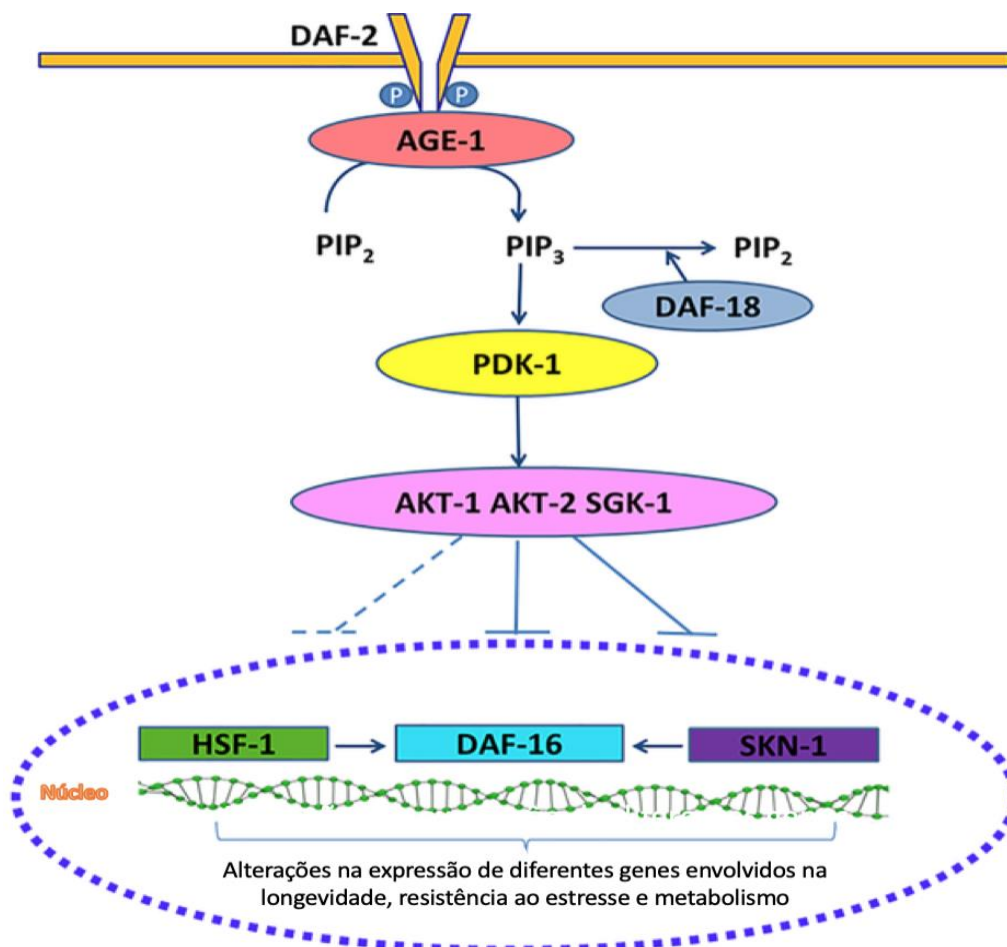
2.4.2 *Caenorhabditis elegans* e o envelhecimento

Nos últimos anos, *C. elegans* tem sido utilizado como um importante modelo para estudo de doenças humanas, uma vez que este organismo, apesar de pequeno, compartilha muitas

características biológicas com os seres humanos (Markaki e Tavernarakis, 2010; Ghosh *et al.*, 2017). No decorrer de sua vida de cerca de 3 semanas, *C. elegans* exibe alterações que são associadas ao envelhecimento, como degeneração tecidual, redução do movimento e interrupção da reprodução (Mack *et al.*, 2019). O músculo exibe um declínio relacionado à idade que se assemelha à sarcopenia humana (Herndon *et al.*, 2002), e a neurodegeneração causa perda de habilidades cognitivas e comportamentais no verme envelhecido (Link, 1995; Lakso *et al.*, 2003; Dostal e Link, 2010). O estudo desse processo de envelhecimento em *C. elegans* auxilia para a compreensão do envelhecimento humano (Kenyon, 2010).

Muitas vias de sinalização subjacentes ao prolongamento da longevidade, apoptose e comportamentos complexos são conservadas entre vermes e mamíferos (Khan *et al.*, 2019). A mais notável é a via de sinalização da insulina / fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (Figura 6), que conecta os níveis de nutrientes ao metabolismo, crescimento, desenvolvimento, longevidade e comportamento (Murphy e Hu, 2013).

Figura 6 – Via de sinalização semelhante à insulina (IIS)



Fonte: Adaptado de Ayuda-Duran *et al.* (2019).

Em *C. elegans*, a via IGF-1 é regulada por ligantes peptídicos do tipo insulina, que se ligam ao receptor DAF-2 e promovem a ativação de uma cascata de sinalização de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), que culmina na fosforilação e inativação do fator de transcrição ortólogo da FoxO, o DAF-16, que permanece no citoplasma (Ogg *et al.*, 1997). A inibição desta via por um aumento da atividade do DAF-18, estresse ou atividade reduzida do DAF-2, leva à desfosforilação e ativação de DAF-16/FOXO e consequente translocação nuclear, onde ocorre a alterações da expressão de vários genes. O DAF-16/FOXO interage com outros fatores de transcrição, como HSF-1 e SKN-1. Esses fatores de transcrição, por sua vez, também regulam a expressão de muitos genes que promovem a longevidade, tolerância ao estresse e homeostase proteica (Hsu *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2003; Antebi, 2007; Tullet *et al.*, 2008; Lapierre e Hansen, 2012).

Embora o DAF-16 seja a principal produção transcricional da via de sinalização semelhante à insulina, outros fatores de transcrição que regulam a expressão do gene *daf-16*, também são regulados pela mesma via. O fator de transcrição SKN-1 de *C. elegans*, ortólogo ao NRF2 em mamíferos, é um componente importante da resposta orgânica ao estresse oxidativo. SKN-1 é necessário para a extensão da vida útil de *C. elegans* em resposta à redução da sinalização da via tipo insulina, mas independente de DAF-16/FOXO (Blackwell *et al.*, 2015). O SKN-1 também regula genes importantes envolvidos na homeostase e metabolismo de proteínas (An *et al.*, 2005; Kahn *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011).

Ademais, o fator de transcrição de choque térmico HSF-1, que controla a homeostase proteica e a expressão gênica em resposta ao estresse (Morley e Morimoto, 2004), prolonga a vida útil de *C. elegans* em colaboração com DAF-16 (Hsu *et al.*, 2003). Isso ocorre porque o HSF-1 e o DAF-16 juntos ativam a expressão de genes específicos, incluindo genes que codificam pequenas proteínas de choque térmico, as HSPs, que por sua vez promovem a longevidade (Hsu *et al.*, 2003). As HSPs são chaperonas moleculares que auxiliam no dobramento de proteínas recém-formados e no redobramento ou degradação de proteínas mal dobradas ou agregadas (Murshid *et al.*, 2013), portanto essas proteínas auxiliam na detoxificação no processo normal de envelhecimento e também em doenças associadas ao envelhecimento. Coletivamente, esses fatores de transcrição convergem na via de sinalização tipo insulina para modular o envelhecimento e a longevidade em *C. elegans*.

2.4.3 *Caenorhabditis elegans* como modelo de toxicidade induzida pelo peptídeo β A

O *C. elegans* também pode ser utilizado para delinear mecanismos moleculares de

neurodegeneração (Dimitriadi e Hart, 2010). Embora seja improvável que os modelos de invertebrados possam realmente mimetizar patologias de doenças neurodegenerativas, estirpes transgênicas para modelar alguns aspectos das doenças, permitem que os mecanismos envolvidos na citotoxicidade dessas doenças possam ser facilmente estudados. Atualmente existem modelos para algumas doenças neurodegenerativas humanas em *C. elegans*, como para a DA, DH, DP, ELA e para a Atrofia Muscular Espinhal (Dimitriadi e Hart, 2010).

Dentre os modelos citados acima existe um bem descrito em *C. elegans*, proposto por Link em 1995, que é através da utilização da estirpe CL2006, a qual contém o transgene Punc-54 :: A β ₁₋₄₂. Este modelo expressa o peptídeo humano A β ₁₋₄₂ sob o controle de um promotor constitutivo no músculo, derivado de um gene de miosina expresso no músculo da parede do corpo (unc-54) (Link, 1995). A estirpe CL2006 mostra um fenótipo de paralisia, progressiva e relacionada a idade, na região posterior do corpo dos animais, além de uma maior produção de EROs (Link *et al.*, 2003; Smith e Luo, 2003). Uma vez que esta estirpe apresenta o peptídeo β A na parede do músculo, e não nos neurônios como seria o caso da DA, é possível estudar a toxicidade induzida pelo peptídeo β A através da avaliação do fenótipo de paralisia. Portanto, esse modelo é bastante utilizado na pesquisa, principalmente em estudos relacionando o potencial farmacológico de substâncias em retardar o aparecimento desse fenótipo (Arya *et al.*, 2009; Regitz e Wenzel, 2014; Boasquivis *et al.*, 2018) e reduzir a formação das EROs.

Muitas vias conservadas entre mamíferos e *C. elegans* estão envolvidas na patogenia do peptídeo β A, entre elas podemos citar a via semelhante à insulina, o fator de transcrição de choque térmico HSF-1 e também as HSPs. Cohen e colaboradores (2006) demonstraram que *C. elegans* nocaute para DAF-2, o receptor de insulina/IGF-1, apresentaram reduzida toxicidade do peptídeo β A de maneira dependente dos fatores de transcrição DAF-16 e HSF-1. Também, a expressão do peptídeo β A em *C. elegans* leva a indução de proteínas HSPs, que estão envolvidas na homeostase proteica (Fonte *et al.*, 2008). A indução das HSPs é regulada pelos fatores de transcrição HSF-1 e DAF-16 (Morley e Morimoto, 2004; Seo *et al.*, 2013).

O envolvimento das HSPs na homeostase proteica de *C. elegans* que expressam peptídeos β A é bastante estudado (Fonte *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010; Boasquivis *et al.*, 2018; Zamberlan *et al.*, 2018). Já se sabe que a expressão do peptídeo β A em *C. elegans* induz a expressão de HSPs (Link *et al.*, 2003), além disso, Fonte e colaboradores (2002) demonstraram que a proteína de choque térmico HSP-16.2 está co-precipitada com os peptídeos β A, e a superexpressão de HSP-16.2 atenua o fenótipo de paralisia em *C. elegans* (Fonte *et al.*, 2008). Portanto, é possível observar que a expressão desses peptídeos tóxicos

ativa uma série de eventos que acarretam na degradação ou remodelamento desses peptídeos, suprimindo sua toxicidade e consequente paralisia (Fonte *et al.*, 2008).

O estresse oxidativo também está associado com a expressão de peptídeos β A em *C. elegans*. Animais que expressam o peptídeo β A possuem maiores níveis de EROs do que animais tipo selvagem, e esse aumento é dependente da idade (Smith e Luo, 2003). O dano celular resultante do excesso de EROs é uma das principais consequências da toxicidade induzida pelo peptídeo β A (Butterfield *et al.*, 1999).

3. DESENVOLVIMENTO

O desenvolvimento que faz parte desta tese está apresentado sob a forma de dois artigos científicos. Os itens Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos.

O artigo 1 foi publicado na revista Plos One e encontra-se no formato da mesma.

O artigo 2 foi publicado na revista Nutritional Neuroscience e encontra-se no formato da mesma.

3.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1

***Ilex paraguariensis* modulates fat metabolism in *Caenorhabditis elegans* through purinergic system (ADOR-1) and nuclear hormone receptor (NHR-49) pathways**

Marina Lopes Machado, Leticia Priscilla Arantes, Priscila Gubert, Daniele Coradini Zamberlan, Thayanara Cruz da Silva, Tássia Limana da Silveira, Aline Boligon, Félix Alexandre Antunes Soares.

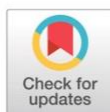
RESEARCH ARTICLE

Ilex paraguariensis modulates fat metabolism in *Caenorhabditis elegans* through purinergic system (ADOR-1) and nuclear hormone receptor (NHR-49) pathways

Marina Lopes Machado¹, Leticia Priscilla Arantes¹, Priscila Gubert², Daniele Coradini Zamberlan¹, Thayanara Cruz da Silva¹, Tássia Limana da Silveira¹, Aline Boligon³, Félix Alexandre Antunes Soares^{1*}

1 Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, **2** Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Reitor Edgard Santos, Universidade Federal do Oeste da Bahia, Barreiras, Bahia, Brazil, **3** Departamento da Farmácia Industrial, Laboratório de Pesquisa Fitoquímica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

* felix@ufsm.br


 OPEN ACCESS

Citation: Machado ML, Arantes LP, Gubert P, Zamberlan DC, da Silva TC, da Silveira TL, et al. (2018) *Ilex paraguariensis* modulates fat metabolism in *Caenorhabditis elegans* through purinergic system (ADOR-1) and nuclear hormone receptor (NHR-49) pathways. PLoS ONE 13(9): e0204023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204023>

Editor: Myon-Hee Lee, East Carolina University, UNITED STATES

Received: February 6, 2018

Accepted: September 1, 2018

Published: September 25, 2018

Copyright: © 2018 Machado et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The financial support for this study was provided by "Programa de Apoio a Núcleos Emergentes" (PRONEM) [grant number 16/25510000248-7] to FAAS and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROEX) [Process: 23038.005848/2018-

Abstract

Ilex paraguariensis is a well-known plant that is widely consumed in South America, primarily as a drink called *mate*. *Mate* is described to have stimulant and medicinal properties. Considering the potential anti-lipid effects of *I. paraguariensis* infusion, we used an extract of this plant as a possible modulator of fat storage to control lipid metabolism in worms. Herein, the *I. paraguariensis*-dependent modulation of fat metabolism in *Caenorhabditis elegans* was investigated. *C. elegans* were treated with *I. paraguariensis* aqueous extract (1 mg/ml) from L1 larvae stage until adulthood, to simulate the primary form of consumption. Expression of adipocyte triglyceride lipase 1 (ATGL-1) and heat shock protein 16.2, lipid accumulation through C1-BODIPY-C12 (BODIPY) lipid staining, behavioral parameters, body length, total body energy expenditure and overall survival were analyzed. Total body energy expenditure was determined by the oxygen consumption rate in N2, nuclear hormone receptor knockout, *nhr-49(nr2041)*, and adenosine receptor knockout, *ador-1(ox489)* strains. *Ilex paraguariensis* extract increased ATGL-1 expression 20.06% and decreased intestinal BODIPY fat staining 63.36%, compared with the respective control group, without affecting bacterial growth and energetic balance, while *nhr-49(nr2041)* and *ador-1(ox489)* strains blocked the worm fat loss. In addition, *I. paraguariensis* increased the oxygen consumption in N2 worms, but not in mutant strains, increased N2 worm survival following juglone exposure, and did not alter *hsp-16.2* expression. We demonstrate for the first time that *I. paraguariensis* can decrease fat storage and increase body energy expenditure in worms. These effects depend on the purinergic system (ADOR-1) and NHR-49 pathways. *Ilex paraguariensis* upregulated the expression of ATGL-1 to modulate fat metabolism. Furthermore, our data corroborates with other

31, grant number 0737/2018]. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

studies that demonstrate that *C. elegans* is a useful tool for studies of fat metabolism and energy consumption.

1. Introduction

A number of plants are used as complementary or alternative medicines in regular diets worldwide [1]. *Ilex paraguariensis* St. Hil. Var. *paraguariensis* (Aquifoliaceae), the *yerba mate*, is widely used in southern Brazil, northern Argentina, Paraguay, and Uruguay [2] as a drink called *chimarrão*, *tererê*, or *mate*. Its consumption has been popular for centuries because of its stimulant and medicinal properties [3]. The effects of the consumption of *I. paraguariensis* include central nervous system stimulation [4], increased antioxidant defense [5], antioxidant properties *in vitro* [6], and thermogenic properties [7].

The prevalence of obesity is increasing worldwide, and has drawn the attention of public health institutions, as it is commonly associated with various metabolic disorders such as hypertension, dyslipidemia, type II diabetes, and insulin resistance [8]. In 2011–2012, 34.9% of adults aged 20 years and over were obese in the United States of America [9], indicating the urgent need for new treatments. Many methods are used to treat obesity, most of which are pharmaceuticals, which can cause collateral effects, like psychiatric disorders, heart attack, and stroke [10], and are often associated with rebound weight gain and potential drug abuse [11]. In this context, natural extracts are potential alternatives to pharmaceuticals and should be investigated for new anti-obesity treatments or for nutraceutical prevention for obesity, as they often cause less adverse effects and are easily added to the diet [12].

Previous studies have reported that the main compound found in aqueous extracts of *I. paraguariensis* are methylxanthines. The primary methylxanthine is caffeine [13, 14], which is a thermogenic agent that acts through the adenosine receptor [15] to increase metabolic rates [16–18], induce fat oxidation [19–21], stimulate respiratory centers [16], and increase resting energy expenditure [22].

Herein, we studied the modulation of fatty acid metabolism by *I. paraguariensis* extract *in vivo* using *Caenorhabditis elegans* as an animal model. This nematode has been described as a widely accepted and used model organism for studies of a variety of biological processes and diseases that can be defined on a molecular basis, e.g., obesity and fat metabolism, because many proteins involved in the synthesis, oxidation, and transport of lipids are highly conserved between *C. elegans* and mammals [23].

In *C. elegans*, adenosine receptor ortholog (ADOR-1), nuclear hormone receptor (NHR-49), and adipose triglyceride lipase (ATGL-1) can be studied to evaluate the purinergic system [24], the regulation of β -oxidation [25] rate-limiting genes, and fat mobilization from stored triglycerides (TAGs) [26], respectively. This study aimed to investigate whether these pathways are involved in *I. paraguariensis* modulation of fat metabolism in *C. elegans*.

2. Materials and methods

2.1. Chemical, apparatus and general procedures of analytical grade

Methanol, formic acid, gallic acid, chlorogenic acid and caffeic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Quercetin, theobromine, caffeine, rutin, catechin, epigallocatechin and kaempferol were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu

LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector and LC solution 1.22 SP1 software.

2.2. Plant material and aqueous extract preparation

Minced leaves of *Ilex paraguariensis* from *Ervateira Seiva-Pura*[®] used in this study were purchased from local market in Santa Maria, Rio Grande do Sul (Brazil). The extraction was carried out by pouring 100 mL of boiled distilled water on plant sample [27]. After extraction at room temperature (10 min), the aqueous extract was filtered using a sterilization filter with 0.22µm pore size.

2.3. Quantification of compounds by HPLC-DAD

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C18 column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5µm diameter particles. The mobile phase was water containing 1% formic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was: 15% of B until 10 min and changed to obtain 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 20% and 10% B at 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80 min, respectively, following the method described by Abbas et al. (2014) with slight modifications [28]. *Ilex paraguariensis* aqueous extract was analyzed at a concentration of 20 mg/ML. The presence of ten compounds was investigated: Gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, catechin, epigallocatechin, quercetin, rutin, kaempferol, caffeine and theobromine. Identification of these compounds was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those of the commercial standards. The flow rate was 0.7 ml/min, injection volume 40 µL and the wavelength were 257 nm for gallic acid, 270 nm for theobromine, 280 nm for catechin, epigallocatechin and caffeine, 327 nm for caffeic and chlorogenic acids, and 366 nm for quercetin, rutin and kaempferol (Table 1). All the samples and mobile phase were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.030–0.250 mg/ml for kaempferol, quercetin, catechin, epigallocatechin, rutin, caffeine and theobromine; and 0.045–0.300 mg/ml for gallic, caffeic and chlorogenic acids. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 600 nm).

Table 1. Composition of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts.

Compounds	<i>Ilex paraguariensis</i>		LOD	LOQ
	mg/g	%	µg/mL	µg/mL
Gallic acid	1.27 ± 0.01 ^a	0.12	0.015	0.049
Catechin	2.98 ± 0.03 ^b	0.29	0.032	0.105
Chlorogenic acid	3.71 ± 0.01 ^b	0.37	0.008	0.027
Caffeic acid	9.15 ± 0.02 ^c	0.91	0.021	0.070
Caffeine	8.86 ± 0.01 ^d	0.88	0.029	0.095
Theobromine	3.65 ± 0.01 ^b	0.36	0.007	0.023
Epigallocatechin	6.01 ± 0.03 ^c	0.60	0.016	0.052
Rutin	7.43 ± 0.02 ^f	0.74	0.026	0.086
Quercetin	3.12 ± 0.01 ^b	0.31	0.035	0.115
Kaempferol	5.95 ± 0.03 ^e	0.59	0.019	0.063

Results are expressed as the mean ± standard deviation (SD) of three determinations.

Averages followed by different letters differ by Tukey test at $p < 0.05$.

LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204023.t001>

Calibration curve for gallic acid: $Y = 13057x + 1285.4$ ($r = 0.9998$); catechin: $Y = 12728x + 1197.5$ ($r = 0.9995$); epigallocatechin: $Y = 11893 + 1357.2$ ($r = 0.9995$); chlorogenic acid: $Y = 12659x + 1287.8$ ($r = 0.9993$); caffeic acid: $Y = 11962x + 1326.2$ ($r = 0.9997$); caffeine: $Y = 13276x + 1297.6$ ($r = 0.9999$); theobromine: $Y = 12473x + 1175.8$ ($r = 0.9996$); rutin: $Y = 13805 + 1195.7$ ($r = 0.9999$); quercetin: $Y = 13627x + 1362.1$ ($r = 0.9999$) and kaempferol: $Y = 12583x + 1274.8$ ($r = 0.9997$). The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves. LOD and LOQ were calculated as 3.3 and 10 σ/S , respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve [29].

2.4. *C. elegans* strains

Wild-type *C. elegans* strain N2 wild-type (var. Bristol), STE68 *nhr-49(nr2041)*, VS20 (*hjlIs67[atgl-1p::atgl-1::gfp + mec-7::RFP]*) and CL2070 *dvIs70 Is[hsp-16.2::gfp; rol-6(su1006)]* were provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center (University of Minnesota, USA). EG6870 strain, *ador-1(ox489)*, was kindly supplied from Dr. Erik Jorgensen laboratory (University of Utah, USA). This strain has a deletion from 1kb upstream and the first three exons of the *ador-1* gene, and was outcrossed six times. All strains were maintained at 20°C.

2.5. Growth conditions and *Ilex paraguariensis* treatment

Treatment plates were prepared diluting *Ilex paraguariensis* aqueous extract in distilled autoclaved water and spreading it with *Escherichia coli* OP50 as food source to the surface of dry nematode grow media (NGM) agar plates [30] to final concentrations of 0, 0.25, 0.5 and 1 mg/mL. Control plates were prepared with water and bacteria at the same proportions. Plates were incubated overnight at 37°C to allow bacteria growth. Synchronized L1 worms were cultured onto treatment plates in the presence or absence of aqueous extract and allowed to develop until the young adult stage at 20°C.

2.6. Bacterial growth curve

E. coli OP50 growth was evaluated over 4 h in the presence or absence of *Ilex paraguariensis* at 0.25, 0.5 or 1 mg/mL. The optical density was measured with a spectrophotometer at 600 nm. Growth curves were normalized with the control group at time zero [31].

2.7. ATGL-1::GFP expression

To determine ATGL-1::GFP expression, young-adults worms from VS20 strain were immobilized with 10 mM sodium azide for image acquisition (Fig 1), and photographed under 60 \times objective on a confocal microscope (Fluoview FV101, Olympus, Tokyo, Japan). Images were processed with the Olympus Image Browser. GFP fluorescence quantification and analyses of images were conducted with ImageJ software by determining average pixel intensity per animal.

2.8. C1-BODIPY-C12 staining

C1-BODIPY-C12 conjugated fatty acids (BODIPY) lipid staining was carried out as previously described [32]. C1-BODIPY-C12 was applied to the surface of NGM plates (10 mL agar) seeded with *E. coli* OP50 and 0 or 1 mg/mL of *Ilex paraguariensis* to a 50 nM final concentration (Fig 2 or S1 Fig). Synchronized wild-type (N2), *nhr-49(nr2041)*, and *ador-1(ox489)* L1-stage worms were transferred to these plates and allowed to develop until adulthood.

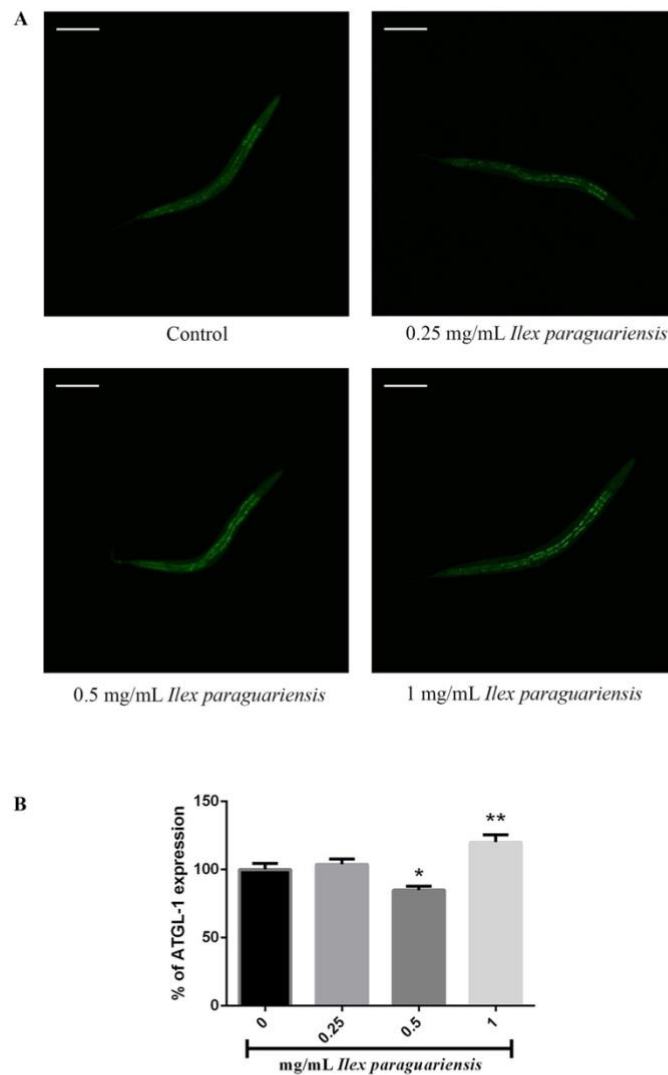


Fig 1. *Ilex paraguariensis* effects on ATGL-1::GFP expression in *Caenorhabditis elegans* VS20 strain. (A) Visualization of ATGL-1::GFP expression and (B) measurement of ATGL-1::GFP expression on young-adult *Caenorhabditis elegans*. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, statistically significant compared with the untreated group by One-Way ANOVA followed by Bonferroni post-test (mean, standard error of the mean [SEM], $n = 30$ worms per group). The experiments were performed in triplicate.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204023.g001>

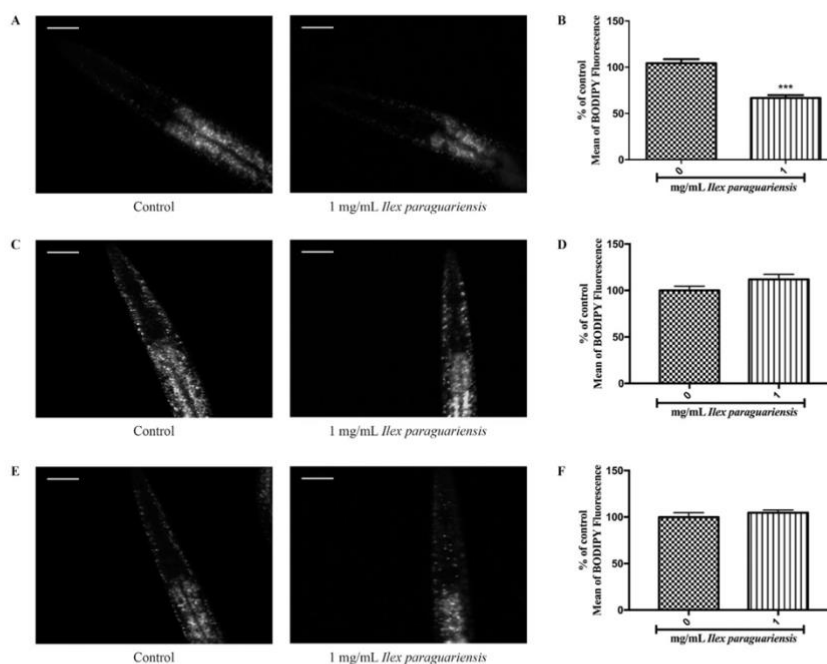


Fig 2. BODIPY fluorescence decrease induced by *Ilex paraguariensis* exposition in *Caenorhabditis elegans* wild-type (N2). Visualization of lipid droplets evidenced by BODIPY labeling in (A) wild-type young adults, (B) *nhr-49(nr2041)*, and (C) *ador-1(ox489)* and fluorescence quantification in (D) wild-type young adults, (E) *nhr-49(nr2041)*, and (F) *ador-1(ox489)*. *** $p < 0.001$, statistically significant compared with the untreated group by Student's *t*-test (mean, SEM, $n = 60$ worms per group). The experiment was performed in triplicate.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204023.g002>

Young-adult worms were mounted on agar pads and immobilized with 10 mM sodium azide for image acquisition using identical settings and appropriate filters with a Zeiss Axiovert II microscope (Thornwood, NY, USA) fitted with a CCD camera. Fluorescence quantification and analyses of images were conducted with ImageJ software by determining average pixel intensity of the two first intestinal pairs of cells per animal.

2.9. Pharynx pumping rate

Pharyngeal bulb contractions were measured in young adult worms on their treatment plates. The number of pharynx pumps in a 10s-interval, in triplicate [33], was assessed with a microscope (Fig 3A).

2.10. Defecation assay

Defecation frequencies were performed by observing young adult worms in their plates of treatment [34] with a microscope. The defecation cycle length was defined as the duration between the pubic steps (posterior body muscle contraction) of two consecutive defecations (Fig 3B).

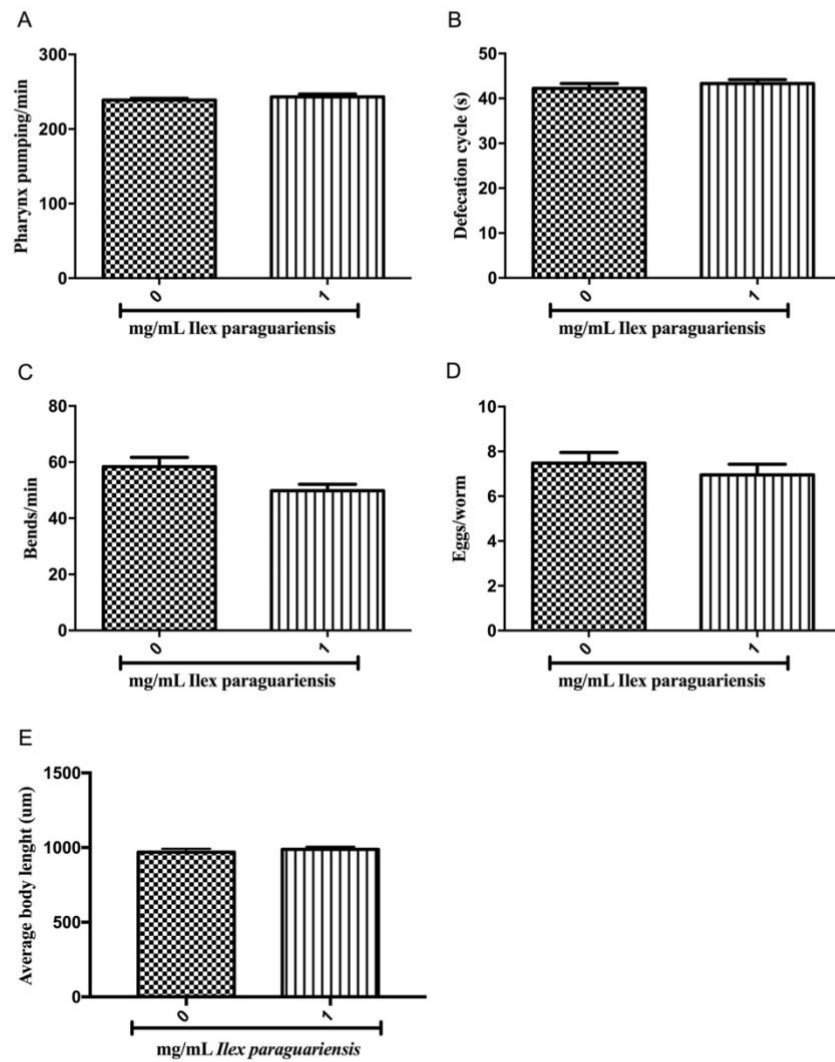


Fig 3. *Caenorhabditis elegans* wild-type behavior following *Ilex paraguariensis* treatment. Effect of *I. paraguariensis* on (A) pharyngeal pumping rate, (B) defecation cycle length, (C) body bends in wild-type young adults, (D) egg production and (E) body length in wild-type young-adults. No statistically significant difference was found by Student's *t*-test (mean, SEM, $n = 30$ worms per group). The experiments were performed in triplicate.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204023.g003>

2.11. Body bends frequency

After treatment, young adult worms were randomly transferred to food-free NGM plates and allowed to freely move for 3 min to adaptation. The number of times each worm changes the direction of the body was scored with a microscope during a 20s-interval in triplicate [24] (Fig 3C).

2.12. Egg-production

To assess the number of eggs inside the uterus, young-adult worms were individually picked into a drop of bleaching solution (1% NaOCl, 0.25 M NaOH). The worms' cuticles were disrupted and released eggs were counted with a microscope [35] (Fig 3D).

2.13. Developmental evaluation

To evaluate the development of wild-type animals following *Ilex paraguariensis* treatment, images of worms from each group were acquired (Fluoview FV101, Olympus, Tokyo, Japan). Images were processed with the Olympus Image Browser and body length was measured along the animal axis using ImageJ software (Fig 3E).

2.14. Oxygen consumption

Oxygen consumption rate was measured with a Hansatech Oxymeter (Pentney, Norfolk, UK) with a Clark-type electrode. The electrode chamber was washed and stabilized for 30 min with 1 mL air-saturated M9 buffer before analysis. Approximately 2,000 young-adult worms of wild-type (N2), *nhr-49(nr2041)*, and *ador-1(ox489)* were transferred to a cuvette with 1 mL of M9, and oxygen consumption was measured for 2–15 min at 20°C to obtain oxygen consumption rates [36] (Fig 4).

2.15. Oxidative stress resistance assays

Young-adult worms of wild-type (N2), *nhr-49(nr2041)*, and *ador-1(ox489)* were exposed to 100 μ M of juglone, also called 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (IUPAC), a generator of reactive oxygen species (ROS) [37], this concentration is supposed to kill approximately 50% of the nematodes (LD50), after 1 hour exposure [38]. Juglone was prepared in EtOH (1% final concentration). After 1 hour at 20°C, 100 nematodes per treatment with *Ilex paraguariensis* were assessed with a Nikon E200 microscope (Tokyo, Japan). Animals that reacted to a mechanical stimulus were scored as alive, and non-responding animals were considered to be dead (Fig 5). Analyses were carried out in five independent assays. Results are shown as percentage of alive animals.

2.16. Fluorescence measurement of *hsp-16.2p::GFP*

Fluorescence measurement of *hsp-16.2p::GFP* was measured at emission 535 nm and excitation 485 nm with 200 worms at young-adult stage [39], using SpectraMax[®] i3x microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Analyses were carried out in triplicate and repeated independently five times (Fig 6A).

2.17. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)

The relative abundance of small heat shock protein (sHSP) *hsp-16.2* mRNA was measured in the N2 wild-type strain by quantitative real-time PCR (qPCR) following a described method with some modifications [40]. The animals were washed with M9 buffer into Eppendorf tubes,

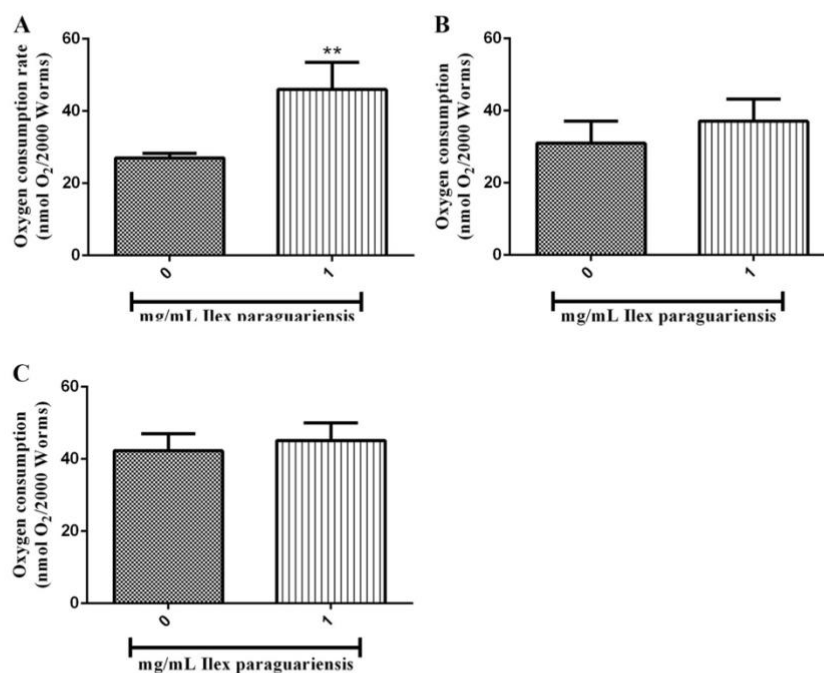


Fig 4. Measurement of oxygen consumption rate in *C. elegans* treated with *I. paraguariensis* extract. Oxygen consumption rates in young-adult worms. (A) Wild type, (B) *nhr-49(nr2041)*, and (C) *ador-1(ox489)*. ** $p < 0.01$, statistically significant compared with the untreated group by Student's *t*-test (mean, SEM, $n = 7$). The experiments were performed seven times.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204023.g004>

resuspended in Trizol reagent (Invitrogen) and allowed to settle on ice. The worm pellet was followed by chloroform extraction and isopropanol precipitation. Total RNA isolation was performed accordingly to the manufacturer's suggested protocol.

Total RNA samples were treated with DNase I (Promega) to eliminate DNA contamination. Reverse transcription (RT) of approximately 1 μ g total RNA was performed with random primer, dNTPs and M-MLV reverse transcriptase enzyme (Invitrogen), according to the manufacturer's suggested protocol. The following gene-specific primers were used: *Actin* (Forward-5'-GTGTGACGACGAGGTTGCCGCTCTTGTGTAGAC-3' and Reverse-5'-GGTAAGGATCTTCATGAGGTAATCAGTAAGATCAC-3'), and *hsp-16.2* (Forward-5'-CTGCAGAATCTCTCCATCTGAGTC-3' and Reverse-5'-AGATTCGAAGCAACTGCACC-3') in 10 μ l PCR mixture containing 5- μ l cDNAs (1:100), 1 X PCR Buffer, 0.1 mM dNTPs, 0.2 μ M of each primer, 3 mM MgCl₂, 0.1 X SYBR Green I (Molecular Probes) and 0.5 U Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen).

The qPCR conditions were: 94 °C for 5 min followed by 40 cycles of 15 s at 94 °C, 15 s at 60 °C and 40 s at 72 °C for extension in a Thermocycler StepOne Plus (Applied Biosystems). After amplification, samples were heated from 60 to 95 °C at a 0.3 °C/s temperature gradient to construct the denaturing curve of the amplified products. All samples were analyzed in

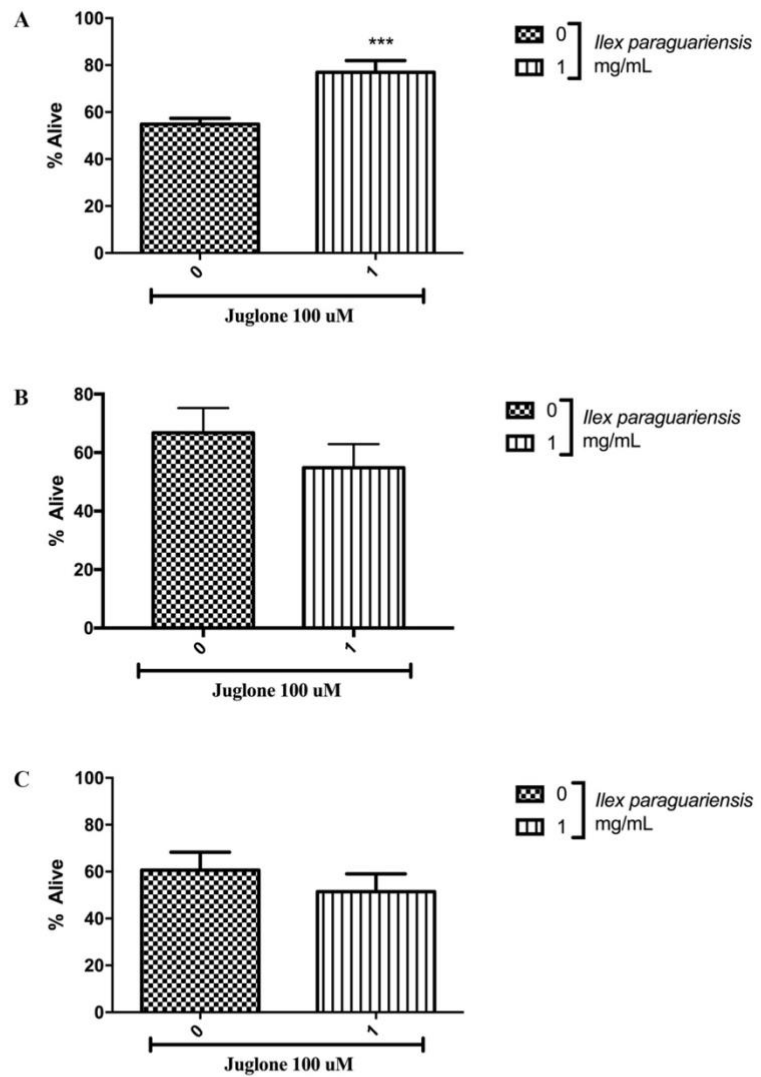


Fig 5. *I. paraguariensis* on resistance to oxidative stress. Survival of young-adult worms exposed to 100 μ M juglone for 1 h. (A) Wild type, (B) *nhr-49(nr2041)*, and (C) *ador-1(ox489)*. Data are expressed as percentage of worms alive. ** $p < 0.01$, statistically significant compared with the untreated group by Student's *t*-test (mean, SEM, $n =$ approximately 500 worms per group).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204023.g005>

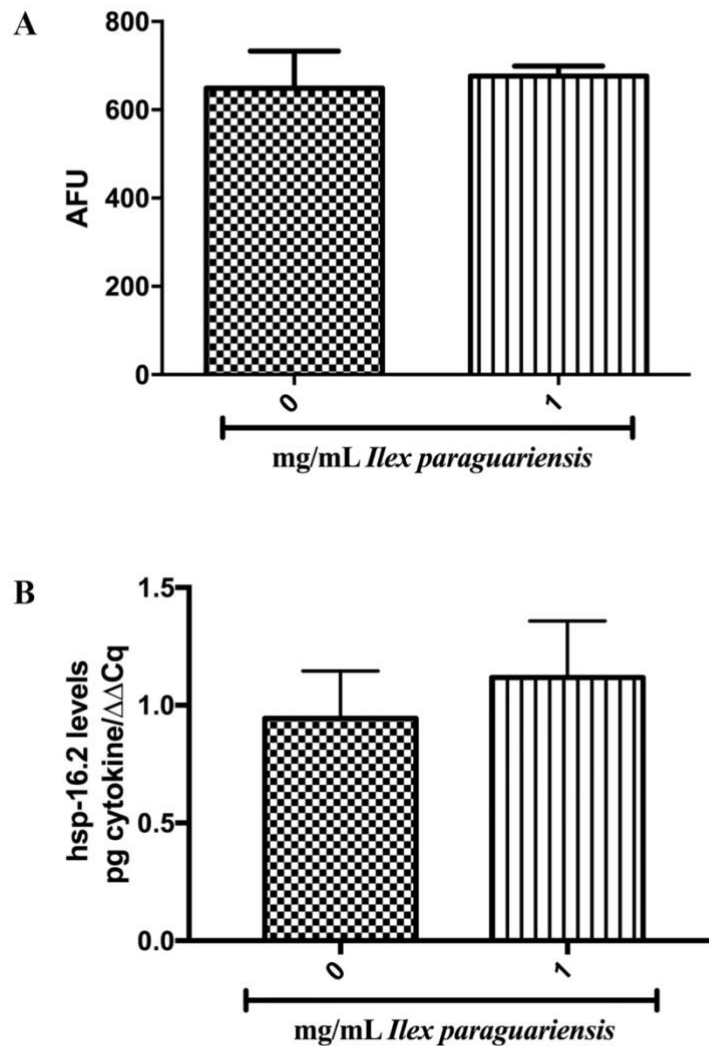


Fig 6. *I. paraguariensis* on *hsp-16.2p::GFP* and *hsp-16.2* transgene expression. (A) Fluorescence expression of *hsp-16.2p::GFP* worms. Data are expressed as arbitrary fluorescence units (AFU). (B) *hsp-16.2* mRNA levels using a $\Delta\Delta Cq$ method in wild-type (N2). Student's *t*-test, $p < 0.05$. The experiments were performed five times on different days.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204023.g006>

triplicate with a non-template control also included. SYBR Green fluorescence (Molecular probes) was analyzed by StepOne Plus Software version 2.0 (Applied Biosystems) and Cq value (ΔCq) for each sample was calculated and reported using the $\Delta\Delta Cq$ method [41]. Briefly, for each well, a ΔCq value was obtained by the difference in Cq values (ΔCq) between the target

gene and the reference gene. The ΔC_q mean value obtained from the control group of each gene was used to calculate the $\Delta\Delta C_q$ of the respective gene ($2^{-\Delta\Delta C_q}$) (Fig 6B).

2.18. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). The statistical differences between conditions were determined by a Student's T-test, while the statistical differences between different concentrations of *Ilex paraguariensis* were determined by a one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test. Values are represented as means \pm SEM, results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. High performance liquid chromatography analysis of *I. paraguariensis* the bioactive compounds

High performance liquid chromatography fingerprinting of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts revealed the presence of gallic acid ($t_R = 9.97$ min; peak 1), catechin ($t_R = 15.03$ min; peak 2), chlorogenic acid ($t_R = 21.38$ min; peak 3), caffeic acid ($t_R = 24.19$ min; peak 4), caffeine ($t_R = 27.48$ min; peak 5), theobromine ($t_R = 32.65$ min; peak 6), epigallocatechin ($t_R = 35.11$ min; peak 7), rutin ($t_R = 39.45$ min; peak 8), quercetin ($t_R = 49.27$ min; peak 9), and kaempferol ($t_R = 54.67$ min; peak 10) (Table 1).

3.2. Antimicrobial effect of *Ilex paraguariensis*

Since dead bacteria can provide differences in micronutrients and be responsible for some differences in the range of fat stores in *C. elegans* [42, 43], the antimicrobial activity of *I. paraguariensis* extract against *Escherichia coli* OP50 was tested. No differences were observed in bacterial growth in the presence of 0.25, 0.5, or 1 mg/mL of *I. paraguariensis* (data not shown).

3.3. Effects of *Ilex paraguariensis* on ATGL-1 expression and *C. elegans* fat storage

We determined a concentration of *I. paraguariensis* extract that increased the expression of ATGL-1 fused with green fluorescent protein (ATGL-1::GFP). We observed that 1 mg/mL of *I. paraguariensis* extract increased the expression of ATGL-1::GFP (20.06%) in the VS20 strain (Fig 1, $p < 0.05$). No differences were observed between 0.25 mg/mL and control groups, but 0.5 mg/mL decreased the expression of ATGL-1::GFP (15.19%). Moreover, BODIPY, a proxy for the measurement of fat in *C. elegans*, was used to evaluate structures in gut epithelial and hypodermal cells. *Ilex paraguariensis* treatment decreased (37.57%) the fluorescence levels of N2 wild-type worms compared with the control group (Fig 2A and 2D, $p < 0.001$), however, when the *nhr-49(nr2041)* and *ador-1(ox489)* strains were treated, no differences were observed in the fluorescence levels compared with control group (Fig 2B, 2C, 2E and 2F).

3.4. Developmental and behavior of *I. paraguariensis*-treated worms

Treatment with *I. paraguariensis* extract did not affect the pharynx-pumping rate and defecation cycle length of adult wild-type worms. Both parameters were similar to control groups (Fig 3A and 3B). The rate of movement was assessed through the frequency of body bends, and no difference was observed (Fig 3C). Egg production was also assessed in young-adult worms following extract treatment and there was no difference between control and treated

worms (Fig 3D). Moreover, there was no difference in body length between control and treated worms (Fig 3E).

3.5. Oxygen consumption in *C. elegans*

The oxygen consumption rate was compared between untreated and treated worms with 1 mg/mL of *I. paraguariensis* of wild-type (N2), *nhr-49(nr2041)*, and *ador-1(ox489)* strains to infer body energy expenditure. In the N2-treated group, the oxygen consumption rate was increased by 70.16% compared with control animals (Fig 4A, $p < 0.05$). By contrast, when the *nhr-49(nr2041)* and *ador-1(ox489)* strains were treated, no differences were observed in oxygen consumption rate compared with the control group (Fig 4B and 4C).

3.6. Effect of *I. paraguariensis* on resistance to oxidative stress

We analyzed if *I. paraguariensis* extract could reduce the oxidative damage caused by juglone, which generates reactive oxygen species (ROS) [37]. The 1-h exposure of young adult N2 wild-type worms to 100 mM of juglone killed 45.16% of worms, and pretreatment with 1 mg/mL of *I. paraguariensis* extract increased worm survival following juglone exposure by 22.12% (Fig 5A, $p < 0.001$), however, when the *nhr-49(nr2041)* and *ador-1(ox489)* strains were treated, no differences were observed in worm survival compared with control group (Fig 5B and 5C). Following this, we determined the expression of *hsp-16.2p* in CL2070 worms and the relative abundance of *hsp-16.2* mRNA in N2 wild-type worms. The treatment with 1mg/mL of *I. paraguariensis* extract did not alter *hsp-16.2p* expression in CL2070 worms, neither the *hsp-16.2* mRNA levels in N2 worms (Fig 6).

4. Discussion

The main findings of this study indicate that treatment with 1 mg/mL of *I. paraguariensis* extract increased worm survival following oxidative stress, reduced fat storage, increased *atgl-1(nr2041)* expression and oxygen consumption in N2 wild-type. Taken together, our results clearly indicate that *I. paraguariensis* extract can protect against oxidative stress and modulate fat metabolism by increasing *atgl-1(nr2041)* expression and oxygen consumption rate in *C. elegans*. Possible pathways include expression of the *nhr-49* gene, a gene linked to β -oxidation and *ador-1*, a gene that encodes an ortholog of the human adenosine receptor. The effects on fat metabolism appear to be unrelated with any behavioral procedure tested here, but are important for survival, furthermore, the expression of HSPs seems to be unrelated to the effects on metabolism or survival.

The concentrations of *I. paraguariensis* used here did not present antimicrobial activity, thus did not affect the *E. coli* growth [42, 43]. Moreover, the animals were observed through the larval stages using a microscope, and all animals achieve the young adult stage at the same time, and the same length, so it does not alter the development time.

The metabolism of fatty storage is regulated by the synthesis and degradation of fat, mainly TAG, the storage form of carbohydrate and fat, depicting a highly concentrated form of energy [44]. The TAG storage and mobilization are general biological process of cells, defined as lipogenesis and lipolysis, respectively. The lipogenesis process includes fatty acid synthesis and subsequent TAG synthesis, and occurs when the total available energy is not immediately needed for metabolic processes, so, the energy contained in Acetyl-CoA is efficiently stored for a long time as fat [45]. In contrast, lipolysis encompasses the catabolism of TAG stored into lipid droplets, to mobilize stored energy [45].

Since the intestine is a major fat storage organ in *C. elegans* [46], and TAGs are the major lipids stored in the organism, we determined a concentration of *I. paraguariensis* extract that

would modulate key factors of fat metabolism without suppressing bacterial growth. To mobilize fat stored, TAGs must be hydrolyzed, and this reaction requires two major enzymes, the adipose triglyceride lipase (ATGL), and the hormone sensitive lipase (HSL) [47]. Here, we evaluated the expression of *atgl-1(nr2041)*, the major lipase for fat mobilization from TAGs stored in *C. elegans* [26]. We found that 1 mg/mL of *I. paraguariensis* extract increased *atgl-1(nr2041)* expression (Fig 1). This result indicates that the extract, at 1 mg/mL, can act in fat metabolism of *C. elegans*, increasing fat mobilization from storage.

Remarkably, 0.5mg/mL of *I. paraguariensis* extract decreased *atgl-1(nr2041)* expression (Fig 1) of *C. elegans*. This effect appears to be caused by a biphasic effect of *I. paraguariensis* extract. This kind of effect is well established in pharmacology studies as the U-shaped plot [48]. So considering the *I. paraguariensis* extract action at the *atgl-1(nr2041)* expression—lower concentration has no effect in *atgl-1(nr2041)* expression, while our medium concentration reduced the expression and our higher concentration tested here increased the *atgl-1(nr2041)* expression—it could be interpreted as an "U-shaped plot".

Since *C. elegans* can convert excess energy into TAGs stored in lipid droplets and distributed throughout the body of the worm [49], we assessed fat storage through BODIPY-conjugated fatty acid staining. Despite being a simple procedure, it is reliable, inexpensive, does not require fixation [50, 51], and allowed us to investigate both intestinal and hypodermal lipid stores of live animals. We found that 1 mg/mL of *I. paraguariensis* decreased BODIPY fluorescence in N2 wild-type (Fig 2A and 2D). Therefore, 1 mg/mL of *I. paraguariensis* extract was the primary concentration tested, since it did not affect bacterial growth, increased ATGL-1::GFP expression, and decreased BODIPY fluorescence in N2 wild-type (Figs 1 and 2). The increased expression of *atgl-1(nr2041)* is consistent with the decrease in fat storage.

Afterwards, we speculate if the decrease in fat storage could be caused by a reduction in food intake [52], or an increase in the defecation cycle. Our results (Fig 3A and 3B) indicate that the decrease in fat storage was not related to pharyngeal pumping or the defecation cycle rate. Alternatively, body movements are also associated with changes in fat storage, the increase in movement may increase the usage of energetic reserves, leading to a decrease in fat storage [53]. In addition, increased egg production can also indirectly alter fat metabolism, because in oocyte production, polyunsaturated fatty acids are transported from the site of fat metabolism [54]. The results (Fig 3C and 3D) show that the decrease in fat storage was not related to body movements or egg production. Thus, the increase in fat mobilization or decrease in fat storage induced by *I. paraguariensis* seems to be unrelated to any of the changes in the behavioral parameters tested in this study.

We demonstrate here that *I. paraguariensis* extract increased the oxygen consumption rate of the N2 strain (Fig 4A), and increased β -oxidation (*nhr-49* modulation) promoting an acetyl-CoA availability for the mitochondrial tricarboxylic acid (TCA) cycle and other compounds that feed the electron transport chain [55]. In order to attend this demand for energy, *C. elegans* increases the mobilization of fatty acids (*atgl-1*) and decrease the fat storage. All of this effects could be associated with an increase in uncoupling proteins (UCPs) [56, 57], mitochondrial transporters present in the inner membrane of mitochondria responsible for thermogenesis [58], that occurs independently of behavioral alterations. This modulation caused by the extract in the oxygen consumption brings the modulations of fat oxidation and consequently a decrease in fat storage.

To test the involvement of fatty acid oxidation in the lipid-reducing effects of *I. paraguariensis* extract, we investigated the nuclear hormone receptor, *nhr-49*, a key regulator gene of fat oxidation in *C. elegans* [59]. *nhr-49* targets multiple enzymes involved in β -oxidation [25], and it was previously demonstrated that *nhr-49(nr2041)* animals have higher fat content [25]. The *I. paraguariensis* extract did not alter BODIPY fluorescence and neither the oxygen

consumption rate in *nhr-49(nr2041)* worms (Figs 2B and 4B). Therefore, the oxygen consumption increase and BODIPY fluorescence decrease in wild-type worms is related to the NHR-49 pathway.

Previous studies have reported that the main compounds identified in the aqueous extract of *I. paraguariensis* are methylxanthines, mainly caffeine [13, 14]. Caffeine is a well-known thermogenic agent related to increased metabolic rates (for a review of the effects of caffeine, see Harpaz, Tamir [60]). The primary action of caffeine and other methylxanthines occurs via antagonism of the adenosine receptor, resulting in phosphodiesterase inhibition and increased lipolysis [61]. Interaction of the adenosine system and caffeine has already been described [62], and the first knockout of purinergic receptors was recently generated [63]. To confirm that the purinergic system is involved in the effects induced by the extract, oxygen consumption and BODIPY fluorescence of the *ador-1* knockout strain were assessed. Similar to the experiment with *nhr-49(nr2041)*, *I. paraguariensis* did not alter BODIPY fluorescence and neither the oxygen consumption rate of the *ador-1(ox489)* (Figs 2C and 4C), indicating that the purinergic system is involved in the effects observed in N2 worms.

Increased oxygen consumption leads to an increase in ROS formation [64]. In general, plant extracts containing phenolic compounds exhibit intrinsic antioxidant activity or induce antioxidant pathways [65]. A previous study has already shown that *I. paraguariensis* extract reduced ROS levels and increased *C. elegans* survival [66]. Here, we exposed N2, *ador-1(ox489)* and *nhr-49(nr2041)* worms treated with 1 mg/mL *I. paraguariensis* to a chemical generator of ROS, juglone [37], to evaluate the potential antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*. The extract protected wild-type *C. elegans*, but not *ador-1(ox489)* neither *nhr-49(nr2041)* against the pro-oxidant effects of juglone (Fig 5).

Goh and cols have already demonstrated that NHR-49 is not only a regulator of lipid metabolism, but also it is required for the activation of a protective transcriptional response to oxidative stress [67]. Here we showed that *nhr-49(nr2041)* is required for juglone resistance. Since fat accumulation is correlated with systemic oxidative stress in humans and mice [68], we demonstrated that 1 mg/mL of *I. paraguariensis* extract can protect *C. elegans* wild-type against the production of ROS by juglone through NHR-49 pathway and purinergic system.

To test if HSPs, a group of low molecular weight polypeptides induced by environmental and physiological stress [69], are involved in the oxidative stress protection induced by *I. paraguariensis* extract, we assessed *hsp-16.2p* expression in CL2070 worms and relative abundance of *hsp-16.2* mRNA in N2 wild-type worms. We observed that *hsp-16.2* is not involved in the *I. paraguariensis* stress response (Fig 6). Here, we showed that *I. paraguariensis* extract has thermogenic properties and promotes fat oxidation and oxidative stress protection independent of *hsp-16.2* activation.

The *I. paraguariensis* extract has been linked to various biological activities, which have been mainly attributed to its large amount of bioactive compounds, including the methylxanthines caffeine and theobromine and the phenolic compounds caffeic acid, chlorogenic acid, and saponins [70]. The use of isolated compounds or active principle(s) from natural extracts is encouraged by some researchers [71, 72]; nevertheless, this may not be the most effective method in all cases. For example, Dulloo and colleagues have already shown in both *in vitro* and *in vivo* studies that the increase in thermogenic effects induced by green tea was lost when the same quantity of isolated caffeine present in the extract was tested [73, 74].

Synergistic interactions are important in phytomedicines, therefore, the effects of the *I. paraguariensis* extract on adipose tissue could be lost when a single active ingredient is isolated and used at low concentrations [75]. In some cases, isolated compounds of plant extracts can exert the same effect only at higher concentrations, which might be toxic to the organism [76].

Thus, the results mentioned above of *Ilex paraguariensis* extract could be lost when a single active ingredient is isolated at the same concentration found in the extract.

To the best of our knowledge, this is the first demonstration of a decrease in *C. elegans* fat storage following treatment with *I. paraguariensis* extract. Since *nhr-49* targets multiple enzymes involved in β -oxidation [25], this effect could be caused by an increase in the β -oxidation pathway through the *nhr-49* gene, inducing overexpression of *atgl-1* gene. *atgl-1* could increase the oxygen consumption rate in the respiratory chain, possibly due to an increase in TCA cycle products, independently of behavioral alterations related to energy expenditure. Additionally, these effects could also be associated with an increase in *hosl-1* (hormone-sensitive lipase orthologue) expression, since *hosl-1* overexpression is related with the decreased of fat accumulation in *C. elegans* [77, 78].

Furthermore, we clearly demonstrate that the purinergic system is involved in the increased oxygen consumption rate of *C. elegans*, and this effect was *ador-1*-dependent. In addition to metabolic effects, the extract also exhibited an antioxidant effect that protected *C. elegans* against the production of ROS, increasing the survival of worms exposed to juglone in an HSP-independent manner. These results suggest that *C. elegans* is a reasonable model for screening the effects of natural products on lipid metabolism.

Supporting information

S1 Fig. Representative images of lipid accumulation through C1-BODIPY-C12 lipid staining in (A) N2, (B) *nhr-49*, and (C) *ador-1* worms.
(TIF)

Acknowledgments

We thank the *Caenorhabditis* Genetics Stock Center for providing N2 (var. Bristol), STE68 *nhr-49(nr2041)*, VS20 (*hjl567[atgl-1p::atgl-1::gfp + mec-7::RFP]*) and CL2070 *dvIs70 Is[hsp-16.2::gfp; rol-6(su1006)]* strains, in addition we would like to thank Dr. Erik Jorgensen (University of Utah, USA) for use of the EG6870 strain. We are also thankful to "Programa de Apoio a Nucleos Emergentes" (PRONEM) [grant numbers 16/2551000248-7] and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROEX) [Process: 23038.005848/2018-31, grant: 0737/2018].

Author Contributions

Conceptualization: Marina Lopes Machado, Leticia Priscilla Arantes, Félix Alexandre Antunes Soares.

Data curation: Marina Lopes Machado, Leticia Priscilla Arantes, Priscila Gubert, Daniele Coradini Zamberlan, Thayanara Cruz da Silva, Tássia Limana da Silveira, Aline Boligon.

Formal analysis: Marina Lopes Machado, Leticia Priscilla Arantes, Priscila Gubert, Daniele Coradini Zamberlan, Thayanara Cruz da Silva, Tássia Limana da Silveira, Aline Boligon.

Funding acquisition: Félix Alexandre Antunes Soares.

Investigation: Marina Lopes Machado.

Methodology: Marina Lopes Machado, Leticia Priscilla Arantes, Priscila Gubert, Aline Boligon.

Project administration: Marina Lopes Machado.

Resources: Félix Alexandre Antunes Soares.

Supervision: Félix Alexandre Antunes Soares.

Writing – original draft: Marina Lopes Machado.

References

1. Debas HT, Laxminarayan R, Straus SE. Complementary and alternative medicine. 2006.
2. Mosimann AL, Wilhelm-Filho D, da Silva EL. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Biofactors*. 2006; 26(1):59–70. PMID: 16614483
3. Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *J Ethnopharmacol*. 2011; 136(3):378–84. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.032> PMID: 20599603 Epub 2010 Jun 26.
4. Gonzalez A, Ferreira F, Vazquez A, Moyna P, Paz EA. Biological screening of Uruguayan medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 1993; 39(3):217–20. PMID: 8258980
5. Schinella G, Troiani G, Dávila V, De Buschiazzo P, Tournier H. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000; 269(2):357–60. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2293> PMID: 10708556
6. Filip R, Lotito SB, Ferraro G, Fraga CG. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition research*. 2000; 20(10):1437–46.
7. Arcari DP, Bartchewsky W, dos Santos TW, Oliveira KA, Funck A, Pedrazzoli J, et al. Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2009; 17(12):2127–33. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.158> PMID: 19444227 Epub 2009 May 14.
8. Pi-Sunyer FX. The epidemiology of central fat distribution in relation to disease. *Nutr Rev*. 2004; 62(7 Pt 2):S120–6. PMID: 15387477
9. Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011–2012. *JAMA*. 2014; 311(8):806–14. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.732> PMID: 24570244
10. Kang JG, Park CY. Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. *Diabetes Metab J*. 2012; 36(1):13–25. <https://doi.org/10.4093/dmj.2012.36.1.13> PMID: 22363917 Epub 2012 Feb 17.
11. Abdollahi M, Afshar-Imani B. A review on obesity and weight loss measures. *Middle East Pharmacy*. 2003; 11(5):6–10.
12. Hasani-Ranjbar S, Nayebi N, Larjani B, Abdollahi M. A systematic review of the efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of obesity. *World J Gastroenterol*. 2009; 15(25):3073–85. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.3073> PMID: 19575486
13. Filip R, Lopez P, Coussio J, Ferraro G. Mate substitutes or adulterants: study of xanthine content. *Phytotherapy Research*. 1998; 12(2):129–31.
14. Filip R, Lopez P, Giberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia*. 2001; 72(7):774–8. PMID: 11677016
15. Jacobson KA. Introduction to adenosine receptors as therapeutic targets. *Adenosine Receptors in Health and Disease*: Springer; 2009. p. 1–24.
16. Haldi J, Bachmann G, Ensor C, Wynn W. The Effect of Various Amounts of Caffeine on the Gaseous Exchange and the Respiratory Quotient in Man Two Figures. *The Journal of Nutrition*. 1941; 21(3):307–20.
17. Higgins HL, Means JH. The effect of certain drugs on the respiration and gaseous metabolism in normal human subjects. *J Pharmacol Exp Ther*. 1915; 7:1–30.
18. Miller D, Stock M, Stuart J. Proceedings: The effects of caffeine and carnitine on the oxygen consumption of fed and fasted subjects. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 1974; 33(2):28A. PMID: 4456386
19. Dulloo AG, Geissler CA, Horton T, Collins A, Miller DS. Normal caffeine consumption: influence on thermogenesis and daily energy expenditure in lean and postobese human volunteers. *Am J Clin Nutr*. 1989; 49(1):44–50. <https://doi.org/10.1093/ajcn/49.1.44> PMID: 2912010
20. Astrup A, Toubro S, Cannon S, Hein P, Breum L, Madsen J. Caffeine: a double-blind, placebo-controlled study of its thermogenic, metabolic, and cardiovascular effects in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr*. 1990; 51(5):759–67. <https://doi.org/10.1093/ajcn/51.5.759> PMID: 2333832

21. Bracco D, Ferrara JM, Arnaud MJ, Jequier E, Schutz Y. Effects of caffeine on energy metabolism, heart rate, and methylxanthine metabolism in lean and obese women. *Am J Physiol*. 1995; 269(4 Pt 1): E671–8. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1995.269.4.E671> PMID: 7485480
22. Belza A, Toubro S, Astrup A. The effect of caffeine, green tea and tyrosine on thermogenesis and energy intake. *Eur J Clin Nutr*. 2009; 63(1):57–64. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602901> PMID: 17882140
23. Jones KT, Ashrafi K. *Caenorhabditis elegans* as an emerging model for studying the basic biology of obesity. *Dis Model Mech*. 2009; 2(5–6):224–9. <https://doi.org/10.1242/dmm.001933> PMID: 19407330
24. Tsalik EL, Hobert O. Functional mapping of neurons that control locomotory behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurobiol*. 2003; 56(2):178–97. <https://doi.org/10.1002/neu.10245> PMID: 12838583
25. Van Gilst MR, Hadjivassiliou H, Jolly A, Yamamoto KR. Nuclear hormone receptor NHR-49 controls fat consumption and fatty acid composition in *C. elegans*. *PLoS Biol*. 2005; 3(2):e53. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030053> PMID: 15719061
26. Narbonne P, Roy R. *Caenorhabditis elegans* dauers need LKB1/AMPK to ration lipid reserves and ensure long-term survival. *Nature*. 2009; 457(7226):210–4. <https://doi.org/10.1038/nature07536> PMID: 19052547 Epub 2008 Dec 3.
27. Gorjanovic S, Komes D, Pastor FT, Belscak-Cvitanovic A, Pezo L, Hecimovic I, et al. Antioxidant capacity of teas and herbal infusions: polarographic assessment. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012; 60(38):9573–80. <https://doi.org/10.1021/jf302375i> PMID: 22950743.
28. Abbas SR, Sabir SM, Ahmad SD, Boligon AA, Athayde ML. Phenolic profile, antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Food Chem*. 2014; 147:10–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.113> PMID: 24206679 Epub 2013 Sep 29.
29. Boligon AA, Kubica TF, Mario DN, de Brum TF, Piana M, Weiblen R, et al. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. *Acta Physiol Plant*. 2013; 35(7):2229–39. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1259-0>
30. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974; 77(1):71–94. PMID: 4366476
31. Bonomo Lde F, Silva DN, Boasquivis PF, Paiva FA, Guerra JF, Martins TA, et al. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) modulates oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by direct and indirect mechanisms. *PLoS one*. 2014; 9(3):e89933. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089933> PMID: 24594796
32. Mak HY, Nelson LS, Basson M, Johnson CD, Ruvkun G. Polygenic control of *Caenorhabditis elegans* fat storage. *Nat Genet*. 2006; 38(3):363–8. <https://doi.org/10.1038/ng1739> PMID: 16462744
33. Huang C, Xiong C, Kornfeld K. Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(21):8084–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400848101> PMID: 15141086
34. Migliori ML, Simonetta SH, Romanowski A, Golombek DA. Circadian rhythms in metabolic variables in *Caenorhabditis elegans*. *Physiol Behav*. 2011; 103(3–4):315–20. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.01.026> PMID: 21315097 Epub 2011 Feb 18.
35. Schafer WR, Kenyon CJ. A calcium-channel homologue required for adaptation to dopamine and serotonin in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1995; 375(6526):73–8. <https://doi.org/10.1038/375073a0> PMID: 7723846
36. Ranjan M, Gruber J, Ng LF, Halliwell B. Repression of the mitochondrial peroxiredoxin antioxidant system does not shorten life span but causes reduced fitness in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med*. 2013; 63:381–9. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.025> PMID: 23722165 Epub 2013 May 28.
37. Blum J, Fridovich I. Superoxide, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity in two free-living nematode species. *Arch Biochem Biophys*. 1983; 222(1):35–43. PMID: 6687666
38. Arantes L, Colle D, Machado M, Zamberlan D, Tassi C, da Cruz R, et al. Luehea divaricata Mart. anticholinesterase and antioxidant activity in a *Caenorhabditis elegans* model system. *Industrial Crops and Products*. 2014; 62:265–71.
39. Salgueiro WG, Goldani BS, Peres TV, Miranda-Vizuete A, Aschner M, da Rocha JBT, et al. Insights into the differential toxicological and antioxidant effects of 4-phenylchalcogenil-7-chloroquinolines in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med*. 2017; 110:133–41. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.020> PMID: 28571752.
40. Zamberlan DC, Arantes LP, Machado ML, Golombieski R, Soares FA. Diphenyl-diselenide suppresses amyloid-beta peptide in *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2014; 278:40–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.07.068> PMID: 25130558 Epub 2014 Aug 15.
41. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4):402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262> PMID: 11846609.

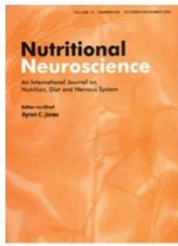
42. Brooks KK, Liang B, Watts JL. The influence of bacterial diet on fat storage in *C. elegans*. *PLoS one*. 2009; 4(10):e7545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007545> PMID: 19844570
43. Yilmaz LS, Walhout AJ. Worms, bacteria, and micronutrients: an elegant model of our diet. *Trends Genet*. 2014; 30(11):496–503. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.010> PMID: 25172020 Epub 2014 Aug 26.
44. Martin S, Parton RG. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7(5):373–8. <https://doi.org/10.1038/nrm1912> PMID: 16550215.
45. Frayn KN. *Metabolic regulation: a human perspective*. John Wiley & Sons; 2009.
46. O'Rourke EJ, Soukas AA, Carr CE, Ruvkun G. *C. elegans* major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles. *Cell metabolism*. 2009; 10(5):430–5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.10.002> PMID: 19883620
47. Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, Lass A, Fledelius C, Jacobsen P, et al. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J Biol Chem*. 2006; 281(52):40236–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608048200> PMID: 17074755.
48. Brunton LL. *Goodman and Gilman's manual of pharmacology and therapeutics*. McGraw-Hill New York; 2014.
49. Walther TC, Farese RV Jr. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annual review of biochemistry*. 2012; 81:687–714. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061009-102430> PMID: 22524315
50. Mullaney BC, Ashrafi K. *C. elegans* fat storage and metabolic regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1791(6):474–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2008.12.013> PMID: 19168149 Epub 2009 Jan 3.
51. Elle IC, Olsen LC, Pultz D, Rodkaer SV, Faergeman NJ. Something worth dyeing for: molecular tools for the dissection of lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett*. 2010; 584(11):2183–93. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.046> PMID: 20371247 Epub 2010 Apr 3.
52. Lakowski B, Hekimi S. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998; 95(22):13091–6.
53. Watts JL, Phillips E, Griffing KR, Browne J. Deficiencies in C20 polyunsaturated fatty acids cause behavioral and developmental defects in *Caenorhabditis elegans* fat-3 mutants. *Genetics*. 2003; 163(2):581–9. PMID: 12618397
54. Kubagawa HM, Watts JL, Corrigan C, Edmonds JW, Sztul E, Browne J, et al. Oocyte signals derived from polyunsaturated fatty acids control sperm recruitment in vivo. *Nat Cell Biol*. 2006; 8(10):1143–8. <https://doi.org/10.1038/ncb1476> PMID: 16998478
55. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Oxidation of Glucose and Fatty Acids to CO₂*. 2000.
56. Arcari DP, Bartchewsky W Jr., dos Santos TW, Oliveira KA, DeOliveira CC, Gotardo EM, et al. Anti-inflammatory effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2011; 335(2):110–5. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.01.003> PMID: 21238540.
57. Riedel A, Pignitter M, Hochkogler CM, Rohm B, Walker J, Bytof G, et al. Caffeine dose-dependently induces thermogenesis but restores ATP in HepG2 cells in culture. *Food Funct*. 2012; 3(9):955–64. <https://doi.org/10.1039/c2fo300053b> PMID: 22710994.
58. Argyropoulos G, Harper ME. Uncoupling proteins and thermoregulation. *J Appl Physiol* (1985). 2002; 92(5):2187–98. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00994.2001> PMID: 11960973.
59. Chamoli M, Singh A, Malik Y, Mukhopadhyay A. A novel kinase regulates dietary restriction-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. 2014; 13(4):641–55. <https://doi.org/10.1111/acer.12218> PMID: 24655420 Epub 2014 Mar 21.
60. Harpaz E, Tamir S, Weinstein A, Weinstein Y. The effect of caffeine on energy balance. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*. 2017; 28(1):1–10. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2016-0090> PMID: 27824614.
61. Nehlig A, Daval JL, Debry G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev*. 1992; 17(2):139–70. PMID: 1356551
62. Bridi JC, Barros AG, Sampaio LR, Ferreira JC, Antunes Soares FA, Romano-Silva MA. Lifespan Extension Induced by Caffeine in *Caenorhabditis elegans* is Partially Dependent on Adenosine Signaling. *Front Aging Neurosci*. 2015; 7:220-. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00220> PMID: 26696878 eCollection 2015.
63. WORMBASE. ADOR-1 (GENE) 2017 [cited 2017 10 may]. <http://www.wormbase.org/db/get?name=WBGene00011878;class=Gene>.

64. Waypa GB, Smith KA, Schumacker PT. O₂ sensing, mitochondria and ROS signaling: The fog is lifting. *Mol Aspects Med.* 2016; 47–48:76–89. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.01.002> PMID: 26776678
65. Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 1999; 47(10):3954–62. PMID: 10552749.
66. Lima ME, Colpo AC, Salgueiro WG, Sardinha GE, Avila DS, Folmer V. *Ilex paraguariensis* Extract Increases Lifespan and Protects Against the Toxic Effects Caused by Paraquat in *Caenorhabditis elegans*. *Int J Environ Res Public Health.* 2014; 11(10):10091–104. <https://doi.org/10.3390/ijerph111010091> PMID: 25264684
67. Goh GYS, Winter JJ, Bhanshali F, Doering KRS, Lai R, Lee K, et al. NHR-49/HNF4 integrates regulation of fatty acid metabolism with a protective transcriptional response to oxidative stress and fasting. *Aging Cell.* 2018; 17(3):e12743. <https://doi.org/10.1111/acer.12743> PMID: 29508513
68. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation.* 2004; 114(12):1752–. <https://doi.org/10.1172/JCI21625> PMID: 15599400
69. de Jong WW, Caspers GJ, Leunissen JA. Genealogy of the alpha-crystallin—small heat-shock protein superfamily. *Int J Biol Macromol.* 1998; 22(3–4):151–62. PMID: 9650070.
70. Bastos DHM, Oliveira Dd, Matsumoto R, Carvalho PdO, Ribeiro M. Yerba mate: pharmacological properties, research and biotechnology. *Med Aromat Plant Sci Biotechnol.* 2007; 1(1):37–46.
71. Rates SM. Plants as source of drugs. *Toxicol.* 2001; 39(5):603–13. PMID: 11072038
72. Wagner H. Leading structures of plant origin for drug development. *J Ethnopharmacol.* 1993; 38(2–3):105–12. PMID: 8510457
73. Dulloo AG, Duret C, Rohrer D, Girardier L, Mensi N, Fathi M, et al. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. *Am J Clin Nutr.* 1999; 70(6):1040–5. <https://doi.org/10.1093/ajcn/70.6.1040> PMID: 10584049
74. Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L, Chantre P, Vandermander J. Green tea and thermogenesis: interactions between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000; 24(2):252–8. PMID: 10702779
75. Williamson EM. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine.* 2001; 8(5):401–9. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00060> PMID: 11695885.
76. Gilbert B, Alves LF. Synergy in plant medicines. *Curr Med Chem.* 2003; 10(1):13–20. PMID: 12570718.
77. Sun Q, Yue Y, Shen P, Yang JJ, Park Y. Cranberry Product Decreases Fat Accumulation in *Caenorhabditis elegans*. *J Med Food.* 2016; 19(4):427–33. <https://doi.org/10.1089/jmf.2015.0133> PMID: 26991055
78. Shen P, Yue Y, Kim KH, Park Y. Piceatannol Reduces Fat Accumulation in *Caenorhabditis elegans*. *J Med Food.* 2017; 20(9):887–94. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.0179> PMID: 28514198

3.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2

Ilex paraguariensis* extract provides increased resistance against oxidative stress and protection against Amyloid beta-induced toxicity compared to caffeine in *Caenorhabditis elegans

Marina Lopes Machado, Leticia Priscilla Arantes, Tássia Limana da Silveira, Daniele Coradini Zamberlan, Larissa Marafiga Cordeiro, Fabiane Baptista Bicca Obetine, Aline Franzen da Silva, Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Felix Alexandre Antunes Soares & Riva de Paula Oliveira



Nutritional Neuroscience

An International Journal on Nutrition, Diet and Nervous System



ISSN: 1028-415X (Print) 1476-8305 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/ynns20>

Ilex paraguariensis extract provides increased resistance against oxidative stress and protection against Amyloid beta-induced toxicity compared to caffeine in *Caenorhabditis elegans*

Marina Lopes Machado, Leticia Priscilla Arantes, Tássia Limana da Silveira, Daniele Coradini Zamberlan, Larissa Marafiga Cordeiro, Fabiane Baptista Bicca Obetine, Aline Franzen da Silva, Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Felix Alexandre Antunes Soares & Riva de Paula Oliveira

To cite this article: Marina Lopes Machado, Leticia Priscilla Arantes, Tássia Limana da Silveira, Daniele Coradini Zamberlan, Larissa Marafiga Cordeiro, Fabiane Baptista Bicca Obetine, Aline Franzen da Silva, Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Felix Alexandre Antunes Soares & Riva de Paula Oliveira (2019): *Ilex paraguariensis* extract provides increased resistance against oxidative stress and protection against Amyloid beta-induced toxicity compared to caffeine in *Caenorhabditis elegans*, *Nutritional Neuroscience*, DOI: [10.1080/1028415X.2019.1671694](https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1671694)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1671694>



View supplementary material [↗](#)



Published online: 09 Oct 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ynns20>



Ilex paraguariensis extract provides increased resistance against oxidative stress and protection against Amyloid beta-induced toxicity compared to caffeine in *Caenorhabditis elegans*

Marina Lopes Machado ^a, Leticia Priscilla Arantes^a, Tássia Limana da Silveira^a, Daniele Coradini Zamberlan ^a, Larissa Marafga Cordeiro^a, Fabiane Baptista Bicca Obetine ^a, Aline Franzen da Silva^a, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^b, Felix Alexandre Antunes Soares ^a and Riva de Paula Oliveira^c

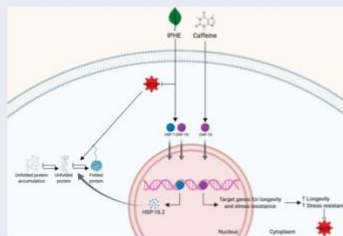
^aCentro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil; ^bDepartamento de Morfologia, Laboratório de Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil; ^cDepartamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

ABSTRACT

Ilex paraguariensis is a plant from South America, used to prepare a tea-like beverage rich in caffeine and polyphenols with antioxidant properties. Caffeine consumption is associated with a lower risk of age-associated neuropathologies, besides several extracts that have antioxidant properties are known to be neuroprotective, and oxidative stress strongly correlates with A β -toxicity. This study aims to investigate the neuroprotective effects of the *Ilex paraguariensis* hydroalcoholic extract (IPHE) and to evaluate if caffeine agent present in IPHE exerts neuroprotective effects in an amyloid beta-peptide (A β)-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. The wild-type and CL2006 worms were treated with IPHE (2 and 4 mg/mL) or caffeine (200 and 400 μ M) since larval stage 1 (L1) until they achieved the required age for each assay. IPHE and caffeine increased the lifespan and appeared to act directly by reactive oxygen species (ROS) scavenger in both wild-type and CL2006 worms, also conferred resistance against oxidative stress in wild-type animals. Furthermore, both treatments delayed A β -induced paralysis and decreased AChE activity in CL2006. The protective effect of IPHE against A β -induced paralysis was found to be dependent on heat shock factor *hsf-1* and FOXO-family transcription factor *daf-16*, which are respectively involved in aging-related processes and chaperone synthesis, while that of caffeine was dependent only on *daf-16*. Mechanistically, IPHE and caffeine decreased the levels of A β mRNA in the CL2006 worms; however, only IPHE induced expression of the heat shock chaperonin *hsp-16.2*, involved in protein homeostasis. The results were overall better when treated with IPHE than with caffeine.

KEYWORDS



Neurodegenerative diseases; Alzheimer's disease; proteostasis; reactive oxygen species; amyloid beta; natural extract; A β -toxicity



1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common age-related type of dementia characterized by the accumulation of abnormal aggregates of the amyloid beta peptide (A β)

and tau proteins, resulting in progressive neurodegeneration [1,2]; furthermore, a persistent cholinergic deficiency due to the degeneration or atrophy of cholinergic neurons is present in the brain [3]. Oxidative stress is considered to

CONTACT Riva de Paula Oliveira  rivaoliveira@cb.ufrn.br  Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN 59078-970, Brazil

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1671694>.

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

be an important factor contributing to the pathogenesis of AD since it may augment the production and aggregation of A β and facilitate the phosphorylation and polymerization of tau, thus forming a vicious cycle that promotes its initiation and progression [4,5].

Globally, caffeine is known to be the most popular drug [6] and its consumption is associated with a lower risk of age-associated neuropathologies including AD [7,8], Parkinson disease (PD) [9] and dementia [8]. Moreover, the administration of caffeine has been associated with the reversion of cognitive impairment and lower levels of A β in the brains of AD model mice [10].

Ilex paraguariensis St. Hil. var. *paraguariensis* (*mate*) is an excellent source of caffeine. It is a tree belonging to the Aquifoliaceae family, native of South America, and consumed in several South American countries in the form of an aqueous infusion of green, dried, and crumbled leaves [11,12]. This beverage has been used as a source of purine alkaloids like caffeine, theobromine, and theophylline, as well as phenolic compounds like rutin, which play an essential role in the manifestation of its pharmacological properties and health benefits [13–15].

Several studies have already demonstrated that consumption of *Ilex paraguariensis* confers antioxidant [12,14,16], anti-inflammatory [17], anti-obesity [18–21] and neuroprotective effects [22–25]. The antioxidant and neuroprotective effects have been demonstrated both *in vitro* and *in vivo* in different models like *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, and mammals including humans [13–15,26]. Reports regarding the neuromodulatory effects of *I. paraguariensis* are available, which include those on the antiparkinsonian effects in mice [27] anticonvulsant and neuroprotective effects on pentylenetetrazol-induced seizures in rats [24], antidepressant-like effect [22,28] and improving memory and learning in rats [25]. Furthermore, a study on lung adenocarcinoma-bearing mice showed that the main neuroprotective effect of *I. paraguariensis* was observed due to reduction of the proinflammatory cytokine IL-6 [29].

In *C. elegans*, chronic treatment with *I. paraguariensis* extract increased its survival under conditions of oxidative stress [21,30], which was associated with reduced levels of reactive oxygen species (ROS) [30]. Furthermore, Bortoli, Alves [31] have demonstrated that chronic treatment with *I. paraguariensis* increases the acetylcholinesterase (AChE) activity in an A β -toxicity model. However, the relationship of *I. paraguariensis* with the phenotypes associated with A β -accumulation remains unclear.

In addition to HSF-1, a transcriptional regulator of heat-shock proteins (HSPs), that regulates the responses to stress resistance, longevity, and protein homeostasis, another conserved transcription factor, DAF-16, a FOXO-ortholog, is found in *C. elegans* to influences its

stress resistance and aging in response to the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) signaling [32,33]. HSPs are molecular chaperones that assist folding of newly synthesized polypeptides and refolding of denatured proteins [34], which is mediated by HSF-1. HSP-16.2 is a small chaperone protein, and its overexpression is associated with the suppression of A β -toxicity [35,36]. A β -toxicity in *C. elegans* was found to reduce when its aging was slowed by decreasing the extent of DAF-16 signaling [37].

Since a number of natural products that have antioxidant properties are known to be neuroprotective and that oxidative stress strongly correlates with A β -toxicity [38,39], we examined the protective effects of an *Ilex paraguariensis* hydroalcoholic extract (IPHE) and its relationship with the caffeine content in an A β peptide-induced toxicity model of CL2006 worms.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Ethanol, 5-fluorouracil-2'-deoxyribose (FUdR) and 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (Juglone) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and 2',7'-Dichlorodihydro-fluorescein diacetate (H₂DCF-DA) was purchased from Invitrogen (Eugene, Oregon, USA).

2.2. *C. elegans* strains

Wild-type N2 and CL2006 CL2006 *dvIs2*[pCL12(*unc-54*: human A β _{1–42}) + *pRF4*] were the strains used for this study. All strains were provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center (University of Minnesota, USA) and maintained at 20°C. Synchronous L1 populations of all strains were obtained by using a bleaching solution (1% NaOCl, 0.25 M NaOH) to treat the adult gravid worms of all strains except CL2006, which were obtained by egg laying.

2.3. Plant material and extract preparation

The aerial parts of *I. paraguariensis* from Santa Maria, RS, Brazil (29°43'05.3"S 53°43'46.2"W) were collected in September 2014. The collected plants were identified by Dr. Renato Zuchia and a voucher specimen (SMDB 15.449) was deposited at the Botany Department Herbarium of the Federal University of Santa Maria (UFMS), Santa Maria, RS, Brazil. Preparation of IPHE was carried out as described by Cuelho et al. [16]. Briefly, extraction was performed by maceration of the dried leaves of *I. paraguariensis* with EtOH:H₂O (40:60, v/v) at room temperature. The extract was concentrated under reduced pressure at 45°C, following lyophilization. Results of the

phytochemical characterization of IPHE were as follows: total phenolic content: 26.540 ± 526.6 mg of gallic acid equivalents/100 g, flavonoid content: 9718 mg catechin equivalents/100 g, tannin content: 15.87 g catechin equivalents/100 g, gallic acid equivalents: 19.26 mg/g and caffeine: 4.17 mg/g [16].

2.4. Maintenance and treatment

The IPHE and caffeine (Sigma) were diluted in sterile distilled water and filtered using a sterilization filter. The solutions were spread separately on agar plates of dry nematode growth media (NGM) [40] containing IPHE and caffeine at final concentrations of 2 or 4 mg/mL and 200 or 400 μ M, respectively (Table 1). The plates were seeded with *Escherichia coli* OP50 or HT115 strains. HT115 was used for feeding RNA interference (RNAi), with a *daf-16* or *hsf-1* dsRNA-expressing plasmid or vector-only as a control. The control plates were prepared using water and bacteria in the same proportions. The synchronized larval stage 1 (L1) worms were cultured onto the plates either in the presence or absence of the treatment solutions and, depending on the experiment, allowed to develop at 20°C until they achieved the required age.

2.5. Feeding RNA interference

RNAi was conducted using the feeding method described previously, with empty pL4440 as the control [41]. Briefly, single colonies of the HT115 bacteria containing cloned L4440 plasmids were cultured in Luria-Bertani (LB) medium containing 60 μ g/mL ampicillin. On the following day, the cultures were diluted in LB and grown to an OD_{600} of 0.6–0.8. This culture was used to seed plates containing 100 μ g/mL ampicillin and 1 mM isopropylthiogalactoside (IPTG) and left to dry at room temperature for 2 days. The synchronized CL2006 L1 larvae were then placed on *E. coli* HT115 cells expressing *daf-16*, *hsf-1*, or control RNAi at 16°C until they reached the young adult stage.

2.6. Measurement of reactive oxygen species

ROS generation was quantified according to a modified protocol using 2',7'-dichlorodihydro-fluorescein

diacetate ($H_2DCF-DA$) [42]. The synchronized L1 wild-type and CL2006 animals were either treated with IPHE or caffeine, or left untreated for 48 h. They were then washed off the plates with M9 buffer. The animals were transferred to microfuge tubes containing 50 μ M of juglone or vehicle ethanol (1% final concentration) and incubated under conditions of agitation for 1 h at 20°C. They were washed with M9 buffer and 20 animals from each group were transferred in triplicates into the wells of a 96-well black plate containing 20 μ M $H_2DCF-DA$ per well. The fluorescence intensity was measured after incubation for 4 h using a SpectraMax® i3x microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at 37°C with 485 nm excitation and 535 nm emission wavelengths. Four experiments were performed in triplicates and the mean fluorescence values were calculated.

2.7. Oxidative stress assay

The oxidative stress assay was conducted using juglone, a superoxide generator [43]. To perform the oxidative stress assay, approximately 50 wild-type or CL2006 worms that were either untreated or treated with IPHE or caffeine for 48 h were transferred into an M9 buffer containing 150 μ M of juglone or vehicle ethanol (1% final concentration). Their viability was assessed after 7.5 h. Animals that did not react to a mechanical stimulus were considered to be dead. Analyses were carried out by performing three independent assays. The results have been represented as their percentage of survival.

2.8. Lifespan assays

Fifty synchronized wild-type or CL2006 L4 worms were transferred from their control or treatment plates to control or treatment plates containing 12 μ g/mL 5-fluorouracil-2'-deoxyribose (FUdR) to prevent the development of progeny. The dead worms were counted every 2 days and the missing, exploding, protruding, or bagging worms were classified as censored. We considered the time point at the L4 stage as day 0. Three experiments were performed in triplicates for all conditions.

2.9. Quantification of paralysis kinetics

The extent of paralysis in the nematodes of transgenic worms CL2006 was measured according to Regitz, Dußling [44] with some modifications. The CL2006 strain is known to constitutively express cytoplasmic human $A\beta_{1-42}$ in their body wall muscle cells, resulting in an

Table 1. Caffeine concentration per treatment.

Treatment	Caffeine concentration (mg/mL)
2 mg/mL IPHE	0.008
4 mg/mL IPHE	0.017
200 μ M Caffeine	0.039
400 μ M Caffeine	0.078

age-dependent paralysis phenotype [45]. The synchronized populations of transgenic worms were prepared by egg laying and maintained in the treatment plates with *E. coli* OP50 or HT115 expressing dsRNA of the corresponding target gene for 72 h at 20°C. The percentage of paralyzed worms was measured per hour by visual analysis at 35°C. The animals were scored as paralyzed when they failed to move even after tapping with a platinum wire. The experiments were performed at least thrice using 30 worms per experiment.

2.10. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)

The relative abundance of small heat shock protein (sHSP) *hsp-16.2* mRNA and A β mRNA was measured in the CL2006 strain by quantitative real-time PCR (qPCR) following a method as described by [21]. Briefly, the animals were washed off from the plates using M9 buffer, resuspended in the TRIzol reagent (Invitrogen), and allowed to settle on ice. Formation of the worm pellet was followed by chloroform extraction and isopropanol precipitation. Total RNA isolation was performed according to Invitrogen's instructions.

Total RNA samples were treated with DNase I (Promega) to eliminate DNA contamination. Reverse transcription (RT) of approximately 2 μ g of total RNA was performed using random primers, dNTPs, and the M-MLV reverse transcriptase enzyme (Invitrogen), according to the protocol suggested by the manufacturer. Quantitative real-time PCR was performed using gene-specific primers (Table 2) in 10 μ l PCR mixture containing 5 μ l cDNAs (1:100), 1 \times PCR Buffer, 0.1 mM dNTPs, 0.2 μ M of each primer, 3 mM MgCl₂, 0.1 \times SYBR Green I (Molecular Probes) and 0.5 U Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen).

The conditions for performing qPCR were as follows: 94°C for 5 min followed by 40 cycles of 15 s at 94°C, 15 s at 60°C and 40 s at 72°C for extension in a Thermocycler StepOne Plus (Applied Biosystems). After amplification, the samples were heated from 60 to 95°C with a temperature gradient of 0.3 °C/s to construct a denaturing curve of the amplified products. All samples were analyzed in triplicates and a non-template control was also included.

Table 2. Primers used in RT-PCR.

Genes	Primers
Actin	(Forward) 5'-GTGTGACGACGAGGTTGCCGCTCTTGTGTAGAC-3' (Reverse) 5'-GGTAAGGATCTTCATGAGTAATCAGTAAGATCAC-3'
A β	(Forward) 5'-CAGAATCCGACATGACTCAGGATATGAAG-3' (Reverse) 5'-CCCACCATGAGTCCAATGATTGC-3'
Hsp-16.2	(Forward) 5'-CTGCAGAATCTCTCCATCTGAGTTC-3' (Reverse) 5'-AGATTCGAAGCAACTGCACC-3'

SYBR Green-based fluorescence was analyzed using the StepOne Plus Software version 2.0 (Applied Biosystems) and the Cq value (Δ Cq) for each sample was calculated and reported using the $\Delta\Delta$ Cq method [46]. Briefly, for each well, a Δ Cq value was obtained by calculating the difference in the Cq values (Δ Cq) of the target gene and the reference gene, actin. The Δ Cq mean value obtained from each gene in the control group was used to calculate the $\Delta\Delta$ Cq of the respective genes ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) (Figure 5).

2.11. Acetylcholinesterase activity

AChE activity assay was performed in transgenic worms CL2006 at young adult stage. Control and treated CL2006 animals were sonicated in M9 buffer on ice and then centrifuged. The supernatants were collected and used for AChE activity measurements according to a previously described method [47,48], with some adaptations to microplates. Briefly, a 20 μ l of the worm extract was mixed with 1 mM 5,5-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 0.8 mM acetylthiocholine iodide (ASChI) and 70 mM TFK, pH 7.5. The rate of change in absorbance was measured at 405 nm, at 30-s intervals for 20 min using a SpectraMax[®] i3x microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Kinetic measurements were recorded and later converted to total cholinesterase activity using the extinction coefficient for the colored product, 5-thio-2-nitrobenzoic acid (II) [47]. The experiments were performed thrice using 8,000 worms per experiment. The protein concentration of the nematode homogenates were measured by the method of Bradford [49].

2.12. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) and SAS JMP Statistical Discovery version 10.0 (NC, USA). All experiments were independently replicated; the results were plotted as the mean \pm S.E.M. of at least three individual experiments. One-way ANOVA followed by the Bonferroni's posttest was used to compare the results between three or more groups. The survival curves were plotted by the log-rank (Mantel-Cox) test. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Treatments with IPHE and caffeine reduced ROS levels under standard and stress conditions

We evaluated whether the same effect of IPHE is observed on wild-type and CL2006 animals. The animals

were treated with 2 and 4 mg/mL of IPHE, which contained 0.008 and 0.017 mg/mL of caffeine, respectively. We also treated the animals with 0.039 and 0.078 mg/mL of pure caffeine, which corresponded to concentrations of 200 and 400 μ M, respectively (Table 1).

First, we evaluated the effect of IPHE treatment on ROS production. Under standard conditions, the levels of ROS in wild-type animals treated with 2 and 4 mg/mL of IPHE were reduced by 33.2 and 44.6%, respectively compared to those of the untreated animals (Figure 1(A)). Under similar conditions, 200 and 400 μ M of caffeine treatment reduced ROS production by 23.3 and 58.9%, respectively (Figure 1(A)). No significant difference was observed between the levels of ROS in animals after IPHE and caffeine treatment. We also evaluated the extent of ROS production under conditions of stress induced by juglone. Statistical analysis revealed that, under stress conditions, caffeine treatment was more effective in reducing the levels of ROS compared to the

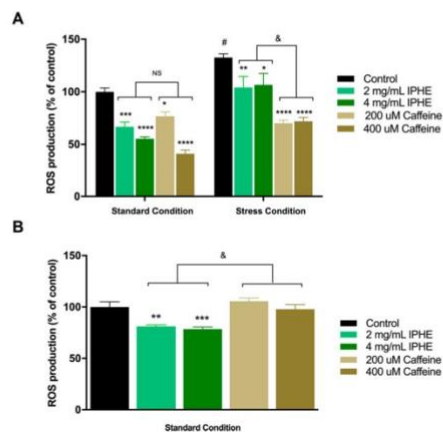


Figure 1. Effect of *Ilex paraguariensis* hydroalcoholic extract (IPHE) and caffeine on intracellular ROS accumulation in *C. elegans*. (A) Wild type animals were treated from L1 until young adult stage with either IPHE or caffeine. Worms were exposed or not to 100 μ M of Juglone for 1 h and then ROS production was measured through H_2DCF -DA probe. The data are expressed as percent of control. The experiments were performed four times at different days, in triplicate. * $p < 0.0259$, ** $p = 0.0036$, *** $p = 0.00003$, **** $p < 0.0001$ comparing to respective untreated control, # $p < 0.0001$ comparing to untreated control under standard condition and $\delta p < 0.004$ comparing IPHE with caffeine treatment by One-way ANOVA followed by Bonferroni Multiple Comparison. (B) CL2006 worms were pre-treated from L1 to young adult stage with either IPHE or caffeine. ROS production was measured through H_2DCF -DA probe. ** $p = 0.0016$, $p = 0.00004$ comparing to respective untreated control and $\delta p < 0.02$ comparing IPHE with caffeine treatment by One-way ANOVA followed by Bonferroni Multiple Comparison.

IPHE treatment. The ROS levels were reduced by 62.5 and 60.7% after treatment with 200 and 400 μ M of caffeine, and by 28.6 and 26.0% when treated with 2 and 4 mg/mL IPHE, respectively (Figure 1(A)).

Next, we evaluated the effect of IPHE and caffeine treatments on ROS production in the CL2006 strain under standard conditions. The CL2006 worms treated with 2 and 4 mg/mL of IPHE reduced the ROS levels by 19.0 and 21.6%, respectively. On the other hand, caffeine treatment did not have any effect on the ROS production in CL2006 (Figure 1(B)).

3.2. IPHE and caffeine treatments increased survival under stress and standard conditions

In order to analyze whether IPHE and caffeine demonstrated protective effects under conditions of oxidative stress, the wild-type strains were pre-treated with 2 or 4 mg/mL of IPHE and 200 or 400 μ M of caffeine for 48 h and then exposed to 150 μ M of juglone. After 7.5 h, 72.6 and 56.7% of the worms treated with 2 and 4 mg/mL IPHE, respectively were found to be alive. Similarly, 37.1 and 52.5% of the worms treated with 200 and 400 μ M caffeine, respectively, were alive (Figure 2). The protective effect of treatment with 2 mg/mL of IPHE was significantly better than that with 200 μ M of caffeine.

Additionally, the IPHE and caffeine treatments significantly increased the survival of wild-type and CL2006 animals under standard conditions at all tested concentrations (Figure 3(A,B)). Particularly, the mean lifespan of wild-type worms was extended by 8.4 and 13.7% upon treatment with 2 and 4 mg/mL IPHE, and by 25.9 and 31.2% after 200 and 400 μ M of caffeine treatment, respectively (Figure 3(A)). Statistical evaluation of the results revealed that the percentages of lifespan extension after caffeine treatments at both concentrations were

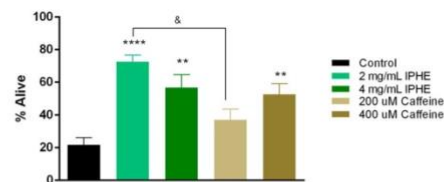


Figure 2. Effects of *Ilex paraguariensis* hydroalcoholic extract (IPHE) and caffeine on oxidative stress resistance. Wild type worms treated from L1 until young adult stage with either IPHE or caffeine. Worms were exposed to 150 μ M of Juglone in M9 buffer and the survival fraction was evaluated after 7 h. The experiments were performed in triplicate. ** $p < 0.0078$, **** $p < 0.0001$ comparing to respective untreated control, $\delta p < 0.0001$ comparing 2 mg/mL IPHE with 200 μ M caffeine treatment by One-way ANOVA followed by Bonferroni Multiple Comparison.

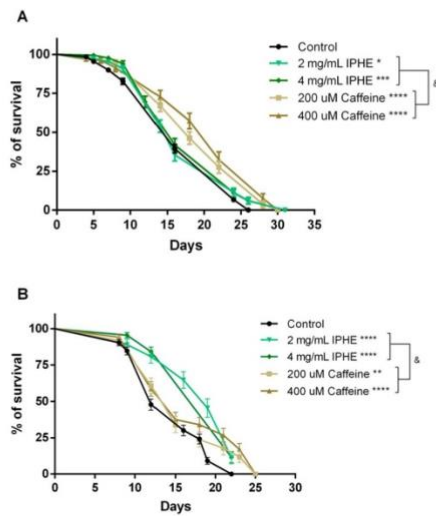


Figure 3. Effects of *Ilex paraguariensis* hydroalcoholic extract (IPHE) and caffeine on lifespan. Survival curves of (A) wild type and (B) CL2006 strain. Animals were treated for whole life with either IPHE or caffeine. The survival assay was analyzed every 2 or 3 days. The data are expressed as percent of control. The experiments were performed four times at different days, in triplicate. * $p = 0.0352$, ** $p = 0.0421$, *** $p = 0.0002$, **** $p < 0.0001$ comparing to respective untreated control and $\delta p < 0.0140$ comparing IPHE with caffeine treatment by by Long Rank (Mantel-Cox) Test.

higher than those of the IPHE treatments. The mean lifespan of CL2006 was extended by 29.6 and 31.4% respectively after treatment with 2 and 4 mg/mL of IPHE and by 10 and 14.7% after treatment with 200 and 400 μM of caffeine, respectively (Figure 3(B) and Table 3).

3.3. IPHE and caffeine treatments delayed progression of paralysis induced by the A β peptide in CL2006 worms

Next, we investigated whether treatment with IPHE would delay the progression of paralysis induced by the A β peptide. Significant delay in the onset of paralysis was observed in CL2006 worms treated with IPHE or caffeine over time. Particularly, the average onset of paralysis was delayed by 22.5 and 27.7% when treated with 2 and 4 mg/mL of IPHE and by 11.0 and 21.0% upon caffeine treatment at concentrations of 200 or 400 μM , respectively (Figure 4 and Table 4). It was found that, results of the paralysis assays upon treatment with either 2 or 4 mg/mL of IPHE were significantly better than those involving treatments with caffeine at 200 μM but not at 400 μM .

Table 3. Effect of *Ilex paraguariensis* or caffeine treatments on *C. elegans* lifespan.

Treatment	Mean Lifespan (days \pm SEM)	Percentage change	P versus control ^{a,b}	Number of worms (N)
Wild type (N2)				
Control	15.25 \pm 0.30			313
2 mg/mL IPHE	16.54 \pm 0.46	8.4	0.0351	145
4 mg/mL IPHE	17.35 \pm 0.47	13.7	0.0002	143
200 μM Caffeine	19.21 \pm 0.49	25.9	<0.0001	128
400 μM Caffeine	20.02 \pm 0.66	31.2	<0.0001	122
CL2006				
Control	14.29 \pm 0.46			194
2 mg/mL IPHE	18.52 \pm 0.86	29.6	<0.0001	109
4 mg/mL IPHE	18.79 \pm 0.55	31.4	<0.0001	104
200 μM Caffeine	15.73 \pm 0.85	10.0	0.0421	102
400 μM Caffeine	16.40 \pm 0.76	14.7	0.0490	101

^aComparisons were performed using log-rank (Mantel-Cox) test.

^bComparisons in relations to the respective control group.

To explore the mechanisms involved in IPHE-mediated delay induced by the A β peptide, we evaluated the role of DAF-16 and HSF-1 by carrying out their knockdown through RNAi (Table 4). IPHE and caffeine treatments significantly delayed the paralysis of CL2006 worms in the control (RNAi) group. However, RNAi of *hsf-1* and *daf-16* completely ameliorated the protective effect of IPHE in CL2006 worms. Only the RNAi of *daf-16* in CL2006 worms prevented manifestation of the beneficial effect against β -amyloid paralysis in animals treated with caffeine (Table 4). These data suggested that the transcription factors DAF-16 and HSF-1 are required for IPHE-mediated protective effect against A β toxicity.

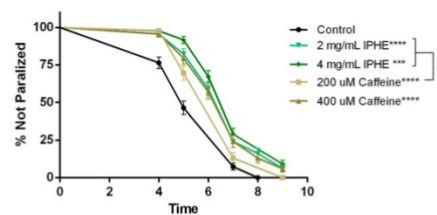


Figure 4. Effects of *Ilex paraguariensis* hydroalcoholic extract (IPHE) and caffeine on A β -induced paralysis in CL2006 strain. Animals were treated from L1 until young adult stage with either IPHE or caffeine. Animals were transferred to 35°C and the paralysis progress was analyzed every hour. Data are expressed as percent of paralysis. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ comparing to respective untreated control and $\delta p < 0.0001$ comparing IPHE with 200 μM of caffeine treatment by by Long Rank (Mantel-Cox) Test.

Table 4. Effect of *Ilex paraguariensis* or caffeine treatments on A β induced paralysis of CL2006 strain.

Treatment	Mean paralysis (hours \pm SEM)	Percentage change	P versus control ^a	Number of worms (N)
CL2006 on <i>E. coli</i> OP50				
Control	5.52 \pm 0.10			123
2 mg/mL IPHE	6.76 \pm 0.12	22.5	<0.0001	112
4 mg/mL IPHE	7.05 \pm 0.11	27.7	<0.0001	131
200 μ M Caffeine	6.13 \pm 0.11	11.0	<0.001	92
400 μ M Caffeine	6.68 \pm 0.12	21.0	<0.0001	116
CL2006 on control (RNAi)				
Control	5.48 \pm 0.04			542
2 mg/mL IPHE	6.16 \pm 0.07	12.4	<0.0001	310
4 mg/mL IPHE	6.74 \pm 0.10	22.9	<0.0001	205
200 μ M Caffeine	5.79 \pm 0.06	5.6	<0.0001	403
400 μ M Caffeine	6.01 \pm 0.08	9.6	<0.0001	207
CL2006 on <i>hsf-1</i> (RNAi)				
Control	5.58 \pm 0.07			304
2 mg/mL IPHE	5.79 \pm 0.10	3.7	0.0886	177
4 mg/mL IPHE	5.84 \pm 0.09	4.6	0.0730	169
200 μ M Caffeine	5.52 \pm 0.09	-1.1	0.2206	163
400 μ M Caffeine	5.54 \pm 0.08	-0.7	0.1525	156
CL2006 on <i>daf-16</i> (RNAi)				
Control	5.19 \pm 0.07			260
2 mg/mL IPHE	5.02 \pm 0.09	-3.2	0.0559	89
4 mg/mL IPHE	5.21 \pm 0.08	0.4	0.4265	90
200 μ M Caffeine	5.51 \pm 0.14	6.2	0.0018	96
400 μ M Caffeine	5.91 \pm 0.13	13.8	<0.0001	101

^aComparisons were performed using log-rank (Mantel-Cox) test.

3.4. A β and *hsp-16.2* expression in an A β -induced toxicity model of CL2006 worms

Next, we determined whether the delay in A β -induced paralysis due to IPHE treatment on CL2006 worms was related to downregulation of the A β transgene. It was found that treatment with 2 and 4 mg/mL of IPHE and 200 and 400 μ M of caffeine decreased the A β mRNA levels by 28.4 and 36.8% and 40.6 and 43.2%, respectively compared to those of the control group (Figure 5(A)). No significant difference in the reduction of mRNA levels was found among the groups subjected to IPHE and caffeine treatments.

We also investigated whether IPHE would upregulate *hsp-16.2* expression. The *hsp-16.2* mRNA levels were

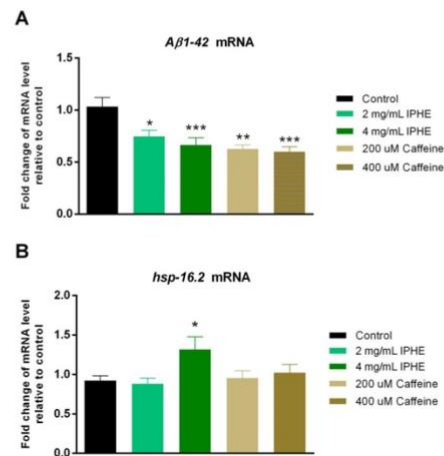


Figure 5. Effects of *Ilex paraguariensis* hydroalcoholic extract (IPHE) and caffeine on A β 1-42 and *hsp-16.2* mRNA expression. Expression levels of (A) A β 1-42 and (B) small heat shock protein *hsp-16.2* mRNA, using a $\Delta\Delta$ Cq method determined by quantitative real-time PCR in CL2006 worms pre-treated with either IPHE or caffeine from L1 to young adult. * $p < 0.0455$, ** $p = 0.0010$, *** $p < 0.0009$ comparing to respective untreated control by One-way ANOVA followed by Bonferroni Multiple Comparison.

increased only in the worms treated with 4 mg/mL of IPHE (Figure 5(B)). No significant change in the *hsp-16.2* expression was observed after treatment with 200 and 400 μ M of caffeine or 2 mg/mL of IPHE. Thus, no significant differences between the *hsp-16.2* expressions were observed in worms subjected to caffeine treatment, and only 4 mg/mL of IPHE increased the *hsp-16.2* mRNA levels.

3.5. IPHE and caffeine treatments reduced AChE activity in CL2006 worms

To explore if the protective effects of IPHE and caffeine on A β -induced toxicity *C. elegans* model could be involved with the AChE inhibition, we quantified AChE activity. It was found that treatment with 2 and 4 mg/mL of IPHE and 200 and 400 μ M of caffeine reduced AChE activity by 36.6 and 32.4% and 38.4 and 34.6%, respectively compared to the control group (Figure 6). No significant difference in the reduction of AChE activity was found among the groups subjected to IPHE and caffeine treatment. In this study, we demonstrated that IPHE and caffeine are AChE inhibitors in CL2006 worms.

4. Discussion

Oxidative stress is known to play an important role in the development of AD, and strong evidence supporting its

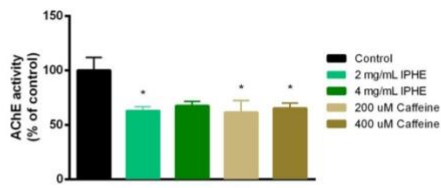


Figure 6. Effects of *Ilex paraguariensis* hydroalcoholic extract (IPHE) and caffeine on Acetylcholinesterase (AChE) activity. CL2006 animals were treated from L1 until young adult stage with either IPHE or caffeine. Data are the average of three independent assays performed in triplicate ($n = 3$) and are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.0143$, ** $p = 0.0225$, *** $p < 0.0371$ and **** $p < 0.0621$ compared to untreated control by One-way ANOVA followed by Bonferroni Multiple Comparison.

association with the occurrence of A β deposits is available. Epidemiological studies have suggested that the consumption of dietary antioxidants that increase lifespan and stress resistance could also delay or ameliorate the development of AD symptoms. Here we investigated the protective effects of the IPHE on oxidative stress, longevity, and A β toxicity *in vivo*.

The extracts of *I. paraguariensis* are known to be associated with multiple biological activities due to the presence of many bioactive compounds, particularly, the methylxanthines caffeine and theobromine, and phenolic compounds like caffeic acid, chlorogenic acid, and saponins [50,51]. Due to the presence of a large number of constituents in the *I. paraguariensis* extract, it is difficult to identify the exact compound responsible for its beneficial effects. Here, we tried to elucidate the relationship between the effects of *I. paraguariensis* with those of caffeine, since it is the main bioactive compound present in IPHE and has been widely studied in reference to neurodegenerative diseases [7,9,10,52].

It has been reported that caffeine treatment delays aging in *C. elegans* and protects it against aging-associated disorders [53–56]. The concentrations used in these studies range from 1 to 100 mM. Recently, Du, Zhou [57] demonstrated that caffeine at concentrations as low as 10 μ M extended the lifespan of *C. elegans*. In our study, we have also used low concentrations of caffeine. Since the concentration of caffeine present in 2 and 4 mg/mL of IPHE is 41 and 87 μ M, respectively, we compared the effect of its treatment on animals, as well as that of caffeine at approximately 9-fold higher concentrations than IPHE.

The main findings of our study indicate that to wild-type worms, 2 and 4 mg/mL of IPHE and 200 and 400 μ M of caffeine increased the mean lifespan of worms, 2 and 4 mg/mL of IPHE and 400 μ M of caffeine increased the worm survival after chemical

stress with juglone, and both concentrations of IPHE reduced ROS production under standard or stress condition induced by juglone. Moreover, to CL2006 worms, 2 and 4 mg/mL of IPHE and 200 and 400 μ M of caffeine increased the mean lifespan of worms, both treatments delayed A β -induced paralysis and also decreased the AChE activity. Inactivation of the transcription factors HSF-1 and DAF-16 by RNAi in CL2006 worms blocked the protective effect of IPHE, while only DAF-16 inactivation blocked the protective effect of caffeine. IPHE and caffeine decreased the levels of A β mRNA in the CL2006 worms; however, only IPHE could induce expression of the chaperonin hsp-16.2 (Figure 5).

Our results showed that IPHE and caffeine treatments effectively reduced the intracellular levels of ROS in wild-type worms under standard as well as stress conditions. The potential of IPHE and caffeine to regulate the redox state of *C. elegans* was positively correlated with an increased stress resistance and longevity in the wild-type animals. These results corroborated with those of the previous studies that have already demonstrated the antioxidant effects of *I. paraguariensis* both *in vitro* [16,50] and *in vivo* [21,30], and of caffeine *in vitro* only [58]. Although these studies have been conducted, our work is the first to demonstrate the antioxidant properties of caffeine in *C. elegans*.

It has been already demonstrated that infusions of *I. paraguariensis* reduce the levels of ROS, and increase resistance to oxidative stress and longevity in *C. elegans* [21,59]. When the wild-type animals were treated with two different concentrations of IPHE and caffeine to determine their antioxidant capacities, the results were found to vary depending on the type of assay. Under standard conditions, reduction in ROS levels was not significantly different among IPHE and caffeine-treatment groups. Statistical evaluation of the results revealed that, under conditions of stress, the efficiency of caffeine in reducing ROS levels was better than that of IPHE. Based on these results, we can expect that caffeine would provide increased stress resistance compared to IPHE, which, however, was not the case. In stress resistance assay, treatment with 2 mg/mL of IPHE was found to be the most effective. Lifespan of the worms subjected to caffeine treatment was greater than those subjected to the IPHE treatments.

Evidence shows that oxidative stress is associated with A β -induced toxicity [60]. Higher levels of ROS were found in animals expressing A β compared to the control animals [61], and the cellular damage resulting from ROS excess is one of the major consequences of A β -toxicity [62]. Our results showed that IPHE reduced the levels of ROS and extended the lifespan of CL2006 animals.

Thus, caffeine increased the lifespan of CL2006 animals even though it could not reduce ROS production.

Since IPHE and caffeine demonstrated pro-longevity properties in CL2006 worms, we attempted to determine whether these treatments could delay the progression of A β -toxicity-induced paralysis in the *C. elegans* model of A β -toxicity. All tested concentrations of IPHE and caffeine delayed the onset of paralysis induced by the toxicity induced by A β 1-42 peptides. Since conditions of oxidative-stress play a significant role in the development and progression of neurodegenerative diseases [63], we believe that the decrease in paralysis is correlated with decreased oxidative stress, preventing A β aggregation and toxicity, which has also been demonstrated in other studies [48,64].

In *C. elegans*, the expression of A β leads to the induction of HSP-16 proteins, including HSP-16.2, [35], which are known to co-localize with the A β peptides in CL2006 worms [65]. Moreover, induction of HSPs is regulated by HSF-1 and DAF-16 transcription factors [33,66]. Based on this information, we analyzed the relative abundance of A β and *hsp-16.2* mRNA in CL2006 worms. It was found that A β mRNA levels were significantly reduced in CL2006 worms treated with either IPHE or caffeine. Contrarily, the expression levels of *hsp-16.2* were elevated only in worms treated with 4 mg/mL of IPHE. Thus, the beneficial effects of IPHE with respect to A β -induced paralysis can be correlated with a reduction in the A β mRNA levels and an increased expression of the *hsp-16.2* mRNA.

Since cholinergic deficiency is present in the brain and [3] contributes substantially to the cognitive decline observed with aging and also in AD patients [3], inhibitors of AChE enzyme, which cleaves the Acetylcholine (ACh) in the cholinergic synapse, are the most consistent therapeutic approach used nowadays [67]. *In vitro* [68,69] and *in vivo* [70,71] studies have reported caffeine to be an AChE inhibitor. Although previous work with *C. elegans* has demonstrated that chronic treatment with *I. paraguayensis* increases the AChE activity in an A β -toxicity model [29], here we observed the opposite effect, which could be attributed to differences in the extract preparation and phytochemical composition. Here, we observed that IPHE and caffeine reduced AChE activity suggesting that they may be useful in treatments where acetylcholinesterase inhibition is used, including in AD.

Although the content of caffeine in IPHE is lower than the concentrations studied in this work, the results of ROS production, longevity, A β -induced paralysis, and *hsp-16.2* mRNA expression in the CL2006 strain were noticeably better when treated with IPHE than with caffeine. No significant differences in the A β 1-42 mRNA expressions were observed among groups

subjected to IPHE or caffeine treatments. Even though caffeine is the main bioactive in IPHE, other constituents present in it could have contributed to the beneficial effects that were observed. Studies have demonstrated that isolated polyphenols [72,73] and flavonoids [61,74] have already been suggested to protect against A β -induced toxicity in a *C. elegans* model of A β -toxicity. Similar results were observed in studies that used coffee [53] and guarana extracts [75], in which, their protective effects against A β 1-42 toxicity in the muscles were observed even though worms were treated with decaffeinated extracts. Therefore, we believe that the beneficial effects of IPHE are due a synergic effect between all constituents of the extract, including caffeine and the other components, which collectively improved the antioxidant effect and reduced paralysis.

DAF-16 and HSF-1 are two transcription factors regulated by insulin-like signaling [76]. DAF-16 and HSF-1 are involved in processes related to aging and antioxidant defenses [77] and heat shock protein expression and proteostasis, respectively [78,79]. Previous studies have reported that knocking down of DAF-2 (insulin-like receptor/IGF-1) reduced the levels of A β -induced toxicity in a DAF-16 and HSF-1 dependent manner [37]. Our results indicated that the IPHE-protective effect against body paralysis *daf-6* and *hsf-1* (RNAi) failed to delay the onset of paralysis in CL2006 worms suggesting that DAF-16 and HSF-1 are required for the protective effect of IPHE and caffeine against A β 1-42 toxicity. Taken together, these results suggested that IPHE and caffeine could protect against A β -induced toxicity by increasing the antioxidant defenses, expression of chaperonins and reducing the AChE activity and the expression of A β with the involvement of DAF-16 and HSF-1-dependent manner.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

The authors are thankful to Programa de Apoio a Núcleos Emergentes (PRONEM/FAPERGS) [16/2551-0000248-7] for providing financial assistance. R.P.O. received CNPq fellowship. F.A.A.S. received PROEX/CAPEX [23038.005848/2018-31] and CNPq fellowship. L.P.A. received PNP/CAPEX fellowship. M.L.M.; T.L.S.; D.C.Z.; F.B.O.B.; and L.M.C. received fellowships from CAPES, respectively numbers: 88882.182147/2018-01; 88882.182186/2018-01; 88882.182122/2018-01; 88887.210042/2018-00; and 88882.182175/2018-01. A.F. received fellowship from PIBIC/UFSC/CNPq. The authors are also thankful to the *Caenorhabditis* Genetics Stock Center for providing all strains, CGC is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440).

Notes on contributors

Marina Lopes Machado is a Master and PhD Student in Biological Sciences at Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

Leticia Priscilla Arantes is a Master and PhD in Biological Sciences at Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

Tássia Limana da Silveira is a Master and PhD Student in Biological Sciences at Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

Daniele Coradini Zamberlan is a Master and PhD in Biological Sciences at Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

Larissa Marafiga Cordeiro is a Master and PhD Student in Biological Sciences at Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

Fabiane Baptista Bicca Obetina is a Master Student in Biological Sciences at Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

Aline Franzen da Silva is a Pharmacy student at Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

Ivana Beatrice Mânica da Cruz is a Master and PhD in Genetics and Molecular Biology at the Federal University of Rio Grande do Sul. Associate professor at Federal University of Santa Maria.

Felix Alexandre Antunes Soares is a Master and PhD in Biological Sciences at Federal University of Rio Grande do Sul. Adjunct professor at the Federal University of Santa Maria.

Riva de Paula Oliveira is a PhD in Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais. Adjunct Professor at Federal University of Rio Grande do Norte.

ORCID

Marina Lopes Machado  <http://orcid.org/0000-0001-7425-3316>

Daniele Coradini Zamberlan  <http://orcid.org/0000-0002-2040-3224>

Fabiane Baptista Bicca Obetina  <http://orcid.org/0000-0001-9263-3793>

Felix Alexandre Antunes Soares  <http://orcid.org/0000-0002-6453-7902>

References

- [1] Mandelkow E-M, Mandelkow E. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 1998;8(11):425–7.
- [2] Avila J. Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology. *FEBS Lett.* 2006;580(12):2922–7. doi:10.1016/j.febslet.2006.02.067. PubMed PMID: 16529745.
- [3] Ji C, Aisa HA, Yang N, Li Q, Wang T, Zhang L, et al. Gossypium herbaceum extracts inhibited NF-kappaB activation to attenuate spatial memory impairment and hippocampal neurodegeneration induced by amyloid-beta in rats. *J Alzheimers Dis.* 2008;14(3):271–83. PubMed PMID: 18599954.
- [4] Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin.* 2017;38(9):1205–35. doi:10.1038/aps.2017.28. PubMed PMID: 28713158; PubMed Central PMCID: PMC5589967.
- [5] Zhao Y, Zhao B. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013. doi:10.1155/2013/316523. PubMed PMID: 23983897; PubMed Central PMCID: PMC3745981.
- [6] Weinberg BA, Bealer BK. The world of caffeine: the science and culture of the world's most popular drug. New York: Routledge; 2004.
- [7] Maia L, de Mendonca A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur J Neurol.* 2002;9(4):377–82. PubMed PMID: 12099922.
- [8] Eskelinen MH, Kivipelto M. Caffeine as a protective factor in dementia and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(Suppl 1):S167–74. doi:10.3233/JAD-2010-1404. PubMed PMID: 20182054.
- [9] Costa J, Lunet N, Santos C, Santos J, Vaz-Carneiro A. Caffeine exposure and the risk of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(Suppl 1):S221–38. doi:10.3233/JAD-2010-091525. PubMed PMID: 20182023.
- [10] Arendash GW, Mori T, Cao C, Mamcarz M, Runfeldt M, Dickson A, et al. Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid-beta levels in aged Alzheimer's disease mice. *J Alzheimers Dis.* 2009;17(3):661–80. doi:10.3233/JAD-2009-1087. PubMed PMID: 19581722.
- [11] Bastos DHM, Oliveira DMd, Matsumoto RLT, Carvalho PdO, Ribeiro ML. Yerba mate: pharmacological properties, research and biotechnology. *Med Aromat Plant Sci Biotechnol.* 2007;1(1):37–46.
- [12] Berte KA, Beux MR, Spada PK, Salvador M, Hoffmann-Ribani R. Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. *J Agric Food Chem.* 2011;59(10):5523–7. doi:10.1021/jf2008343. PubMed PMID: 21510640.
- [13] Gan RY, Zhang D, Wang M, Corke H. Health benefits of bioactive compounds from the Genus *Ilex*, a source of traditional caffeinated beverages. *Nutrients.* 2018;10(11). doi:10.3390/nu10111682. PubMed PMID: 30400635; PubMed Central PMCID: PMC6265843.
- [14] Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *J Ethnopharmacol.* 2011;136(3):378–84. doi:10.1016/j.jep.2010.06.032. Epub 2010 Jun 26.
- [15] Heck CI, de Mejia EG. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci.* 2007;72(9):R138–51. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x.
- [16] Cuelho CHF, Alves GAD, Lovatto MO, Bonilha IF, Barbisan F, da Cruz IBM, et al. Topical formulation containing *Ilex paraguariensis* extract increases metalloproteinases and myeloperoxidase activities in mice exposed to UVB radiation. *J Photochem Photobiol B.* 2018;189:95–103. doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.10.004. PubMed PMID: 30317053.

- [17] Luz ABG, da Silva CHB, Nascimento M, de Campos Facchin BM, Baratto B, Frode TS, et al. The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (mate) in a murine model of pleurisy. *Int Immunopharmacol*. 2016;36:165–72. doi:10.1016/j.intimp.2016.04.027. PubMed PMID: 27155392.
- [18] Arcari DP, Santos JC, Gambero A, Ribeiro ML. The in vitro and in vivo effects of Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. *Food Chem*. 2013;141(2):809–15. doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.062. PubMed PMID: 23790851.
- [19] Gambero A, Ribeiro ML. The positive effects of Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in obesity. *Nutrients*. 2015;7(2):730–50. doi:10.3390/nu7020730.
- [20] Choi MS, Park HJ, Kim SR, Kim DY, Jung UJ. Long-term dietary supplementation with Yerba mate ameliorates diet-induced obesity and metabolic disorders in mice by regulating energy expenditure and lipid metabolism. *J Med Food*. 2017;20(12):1168–75. doi:10.1089/jmf.2017.3995. PubMed PMID: 28872427.
- [21] Machado ML, Arantes LP, Gubert P, Zamberlan DC, da Silva TC, da Silveira TL, et al. *Ilex paraguariensis* modulates fat metabolism in *Caenorhabditis elegans* through purinergic system (ADOR-1) and nuclear hormone receptor (NHR-49) pathways. *PLoS One*. 2018;13(9):e0204023. doi:10.1371/journal.pone.0204023. PubMed PMID: 30252861; PubMed Central PMCID: PMC6155532.
- [22] Ludka FK, Tandler Lde F, Kuminek G, Olescowicz G, Jacobsen J, Molz S. *Ilex paraguariensis* hydroalcoholic extract exerts antidepressant-like and neuroprotective effects: involvement of the NMDA receptor and the L-arginine-NO pathway. *Behav Pharmacol*. 2016;27(4):384–92. doi:10.1097/FBP.0000000000000211. PubMed PMID: 26703367.
- [23] Santos EC, Bicca MA, Blum-Silva CH, Costa AP, Dos Santos AA, Schenkel EP, et al. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. *Neuroscience*. 2015;292:13–21. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.02.004. PubMed PMID: 25681522.
- [24] Branco Cdos S, Scola G, Rodrigues AD, Cesio V, Laprovitera M, Heinzen H, et al. Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylenetetrazol-induced seizures in Wistar rats. *Brain Res Bull*. 2013;92:60–8. doi:10.1016/j.brainresbull.2012.11.008. PubMed PMID: 23270878.
- [25] Prediger RD, Fernandes MS, Rial D, Wopereis S, Pereira VS, Bosse TS, et al. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *J Ethnopharmacol*. 2008;120(3):465–73. doi:10.1016/j.jep.2008.09.018. PubMed PMID: 18948179.
- [26] Riachi LG, De Maria CAB. Yerba mate: an overview of physiological effects in humans. *J Funct Foods*. 2017;38:308–20.
- [27] Milioli EM, Cologni P, Santos CC, Marcos TD, Yunes VM, Fernandes MS, et al. Effect of acute administration of hydroalcohol extract of *Ilex paraguariensis* St Hilare (*Aquifoliaceae*) in animal models of Parkinson's disease. *Phytother Res*. 2007;21(8):771–6. doi:10.1002/ptr.2166. PubMed PMID: 17486685.
- [28] Reis Ede M, Schreiner Neto FW, Cattani VB, Peroza LR, Busanello A, Leal CQ, et al. Antidepressant-like effect of *Ilex paraguariensis* in rats. *Biomed Res Int*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/958209. PubMed PMID: 24895633; PubMed Central PMCID: PMC4026845.
- [29] Cittadini MC, Albrecht C, Miranda AR, Mazzuduli GM, Soria EA, Repposi G. Neuroprotective effect of *Ilex paraguariensis* intake on brain Myelin of lung adenocarcinoma-bearing male balb/c mice. *Nutr Cancer*. 2019;1–5. doi:10.1080/01635581.2018.1559932. PubMed PMID: 30661417.
- [30] Lima ME, Colpo AC, Salgueiro WG, Sardinha GE, Avila DS, Folmer V. *Ilex paraguariensis* extract increases lifespan and protects against the toxic effects caused by paraquat in *Caenorhabditis elegans*. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(10):10091–104. doi:10.3390/ijerph111010091.
- [31] Bortoli PM, Alves C, Costa E, Vanin AP, Sofiatti JR, Siqueira DP, et al. *Ilex paraguariensis*: potential antioxidant on aluminium toxicity, in an experimental model of Alzheimer's disease. *J Inorg Biochem*. 2018;181:104–10. doi:10.1016/j.jinorgbio.2017.11.001. PubMed PMID: 29150325.
- [32] Hsu AL, Murphy CT, Kenyon C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science*. 2003;300(5622):1142–5. doi:10.1126/science.1083701. PubMed PMID: 12750521.
- [33] Morley JF, Morimoto RI. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol Biol Cell*. 2004;15(2):657–64. doi:10.1091/mbc.e03-07-0532. PubMed PMID: 14668486; PubMed Central PMCID: PMC329286.
- [34] Murshid A, Eguchi T, Calderwood SK. Stress proteins in aging and life span. *Int J Hyperthermia*. 2013;29(5):442–7. doi:10.3109/02656736.2013.798873. PubMed PMID: 23742046; PubMed Central PMCID: PMC4083487.
- [35] Fonte V, Kipp DR, Yerg J, 3rd, Merin D, Forrestal M, Wagner E, et al. Suppression of in vivo beta-amyloid peptide toxicity by overexpression of the HSP-16.2 small chaperone protein. *J Biol Chem*. 2008;283(2):784–91. doi:10.1074/jbc.M703339200. PubMed PMID: 17993648.
- [36] Wu Y, Cao Z, Klein WL, Luo Y. Heat shock treatment reduces beta amyloid toxicity in vivo by diminishing oligomers. *Neurobiol Aging*. 2010;31(6):1055–8. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.07.013. PubMed PMID: 18762355; PubMed Central PMCID: PMC2921903.
- [37] Cohen E, Bieschke J, Perciavalle RM, Kelly JW, Dillin A. Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science*. 2006;313(5793):1604–10. doi:10.1126/science.1124646. PubMed PMID: 16902091.
- [38] Cao YY, Wang L, Ge H, Lu XL, Pei Z, Gu Q, et al. Salvianolic acid A, a polyphenolic derivative from *Salvia miltiorrhiza bunge*, as a multifunctional agent for the treatment of Alzheimer's disease. *Mol Divers*. 2013;17(3):515–24. doi:10.1007/s11030-013-9452-z. PubMed PMID: 23703159.
- [39] Sangha JS, Sun X, Wally OS, Zhang K, Ji X, Wang Z, et al. Liuwei Dihuang (LWDH), a traditional Chinese medicinal formula, protects against beta-amyloid toxicity in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. 2012;7(8):e43990. doi:10.1371/journal.pone.0043990. PubMed

- PMID: 22952840; PubMed Central PMCID: PMC3431378.
- [40] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974;77(1):71–94.
- [41] Oliveira RP, Abate JP, Dilks K, Landis J, Ashraf J, Murphy CT, et al. Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Aging Cell*. 2009;8(5):524–41. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00501.x.
- [42] Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab*. 2007;6(4):280–93. doi:10.1016/j.cmet.2007.08.011.
- [43] Blum J, Fridovich I. Superoxide, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity in two free-living nematode species. *Arch Biochem Biophys*. 1983;222(1):35–43.
- [44] Regitz C, Dußling LM, 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. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58(10):1931–40. doi:10.1002/mnfr.201400014.
- [45] Link CD. Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(20):9368–72. doi:10.1073/pnas.92.20.9368.
- [46] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25(4):402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262. PubMed PMID: 11846609.
- [47] Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7:88–95. doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9. PubMed PMID: 13726518.
- [48] Zamberlan DC, Arantes LP, Machado ML, Golombieski R, Soares FA. Diphenyl-diselenide suppresses amyloid-beta peptide in *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2014;278:40–50. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.07.068. Epub 2014 Aug 15.
- [49] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54.
- [50] Bastos DH, Saldanha LA, Catharino RR, Sawaya AC, Cunha IB, Carvalho PO, et al. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules*. 2007;12(3):423–32. PubMed PMID: 17851401.
- [51] Bastos DHM, Oliveira Dd, Matsumoto R, Carvalho PdO, Ribeiro M. Yerba mate: pharmacological properties, research and biotechnology. *Med Aromat Plant Sci Biotechnol*. 2007;1(1):37–46.
- [52] Kolahdouzan M, Hamadeh MJ. The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci Ther*. 2017;23(4):272–90. doi:10.1111/cns.12684. PubMed PMID: 28317317.
- [53] Dostal V, Roberts CM, Link CD. Genetic mechanisms of coffee extract protection in a *Caenorhabditis elegans* model of beta-amyloid peptide toxicity. *Genetics*. 2010;186(3):857–66. doi:10.1534/genetics.110.120436. PubMed PMID: 20805557; PubMed Central PMCID: PMC2975290.
- [54] Lublin A, Isoda F, Patel H, Yen K, Nguyen L, Hajje D, et al. FDA-approved drugs that protect mammalian neurons from glucose toxicity slow aging dependent on CBP and protect against proteotoxicity. *PLoS One*. 2011;6(11):e27762. doi:10.1371/journal.pone.0027762. PubMed PMID: 22114686; PubMed Central PMCID: PMC3218048.
- [55] Sutphin GL, Bishop E, Yanos ME, Moller RM, Kaerberlein M. Caffeine extends life span, improves healthspan, and delays age-associated pathology in *Caenorhabditis elegans*. *Longev Healthspan*. 2012;1:9. doi:10.1186/2046-2395-1-9. PubMed PMID: 24764514; PubMed Central PMCID: PMC3922918.
- [56] Bridi JC, Barros AG, Sampaio LR, Ferreira JC, Antunes Soares FA, Romano-Silva MA. Lifespan extension induced by caffeine in *Caenorhabditis elegans* is partially dependent on adenosine signaling. *Front Aging Neurosci*. 2015;7:220. doi:10.3389/fnagi.2015.00220. eCollection 2015.
- [57] Du F, Zhou L, Jiao Y, Bai S, Wang L, Ma J, et al. Ingredients in Zijuan Pu'er tea extract alleviate beta-amyloid peptide toxicity in a *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease likely through DAF-16. *Molecules*. 2019;24(4). doi:10.3390/molecules24040729. PubMed PMID: 30781621; PubMed Central PMCID: PMC6412921.
- [58] Goncalves DF, de Carvalho NR, Leite MB, Courtes AA, Hartmann DD, Stefanello ST, et al. Caffeine and Acetaminophen association: effects on mitochondrial bioenergetics. *Life Sci*. 2018;193:234–41. doi:10.1016/j.lfs.2017.10.039. PubMed PMID: 29107792.
- [59] Lima ME, Colpo AC, Salgueiro WG, Sardinha GE, Avila DS, Folmer V. *Ilex paraguariensis* extract increases life-span and protects against the toxic effects caused by paraquat in *Caenorhabditis elegans*. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(10):10091–104. doi:10.3390/ijerph111010091. PubMed PMID: 25264684; PubMed Central PMCID: PMC4210969.
- [60] Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(1):134–47. PubMed PMID: 9165306.
- [61] Smith JV, Luo Y. Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by Ginkgo biloba extract EGB 761. *J Alzheimers Dis*. 2003;5(4):287–300. PubMed PMID: 14624024.
- [62] Butterfield DA, Howard B, Yatin S, Koppal T, Drake J, Hensley K, et al. Elevated oxidative stress in models of normal brain aging and Alzheimer's disease. *Life Sci*. 1999;65(18–19):1883–92. PubMed PMID: 10576432.
- [63] Benzi G, Moretti A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging*. 1995;16(4):661–74. PubMed PMID: 8544918.
- [64] Zamberlan DC, Arantes LP, Machado ML, da Silveira TL, da Silva AF, da Cruz IBM, et al. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) protects against amyloid-beta toxicity in *Caenorhabditis elegans* through heat shock protein response activation. *Nutr Neurosci*. 2018:1–11. doi:10.1080/1028415X.2018.1517473. PubMed PMID: 30198423.

- [65] Fonte V, Kapulkin WJ, Taft A, Fluet A, Friedman D, Link CD. Interaction of intracellular β amyloid peptide with chaperone proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(14):9439–44.
- [66] Seo K, Choi E, Lee D, Jeong DE, Jang SK, Lee SJ. Heat shock factor 1 mediates the longevity conferred by inhibition of TOR and insulin/IGF-1 signaling pathways in *C. elegans*. *Aging Cell*. 2013;12(6):1073–81. doi:10.1111/acel.12140. PubMed PMID: 23879233.
- [67] Bullock R. New drugs for Alzheimer's disease and other dementias. *Br J Psychiatry*. 2002;180:135–9. doi:10.1192/bjp.180.2.135. PubMed PMID: 11823323.
- [68] Pohanka M, Dobes P. Caffeine inhibits acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase. *Int J Mol Sci*. 2013;14(5):9873–82. doi:10.3390/ijms14059873. PubMed PMID: 23698772; PubMed Central PMCID: PMC3676818.
- [69] Karadsheh N, Kussie P, Linthicum DS. Inhibition of acetylcholinesterase by caffeine, anabasine, methyl pyridine and their derivatives. *Toxicol Lett*. 1991;55(3):335–42. PubMed PMID: 2003276.
- [70] da Silva RS, Richetti SK, da Silveira VG, Battastini AM, Bogó MR, Lara DR, et al. Maternal caffeine intake affects acetylcholinesterase in hippocampus of neonate rats. *Int J Dev Neurosci*. 2008;26(3–4):339–43. doi:10.1016/j.ijdevneu.2007.12.006. PubMed PMID: 18258404.
- [71] Souza AC, Souza A, Medeiros LF, De Oliveira C, Scarabelot VL, Da Silva RS, et al. Maternal caffeine exposure alters neuromotor development and hippocampus acetylcholinesterase activity in rat offspring. *Brain Res*. 2015;1595:10–8. doi:10.1016/j.brainres.2014.10.039. PubMed PMID: 25451122.
- [72] Regitz C, Wenzel U. Amyloid-beta (A β 1–42)-induced paralysis in *Caenorhabditis elegans* is reduced by restricted cholesterol supply. *Neurosci Lett*. 2014;576:93–6. doi:10.1016/j.neulet.2014.05.059. PubMed PMID: 24909620.
- [73] Jagota S, Rajadas J. Effect of phenolic compounds against A β aggregation and A β -induced toxicity in transgenic *C. elegans*. *Neurochem Res*. 2012;37(1):40–8. doi:10.1007/s11064-011-0580-5. PubMed PMID: 21858698.
- [74] Jin CH, Shin EJ, Park JB, Jang CG, Li Z, Kim MS, et al. Fustin flavonoid attenuates beta-amyloid (1–42)-induced learning impairment. *J Neurosci Res*. 2009;87(16):3658–70. doi:10.1002/jnr.22159. PubMed PMID: 19533734.
- [75] Boasquavis PF, Silva GMM, Paiva FA, Cavalcanti RM, Nunez CV, de Paula Oliveira R. Guarana (*Paullinia cupana*) extract protects *Caenorhabditis elegans* models for Alzheimer disease and Huntington disease through activation of antioxidant and protein degradation pathways. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/9241308. PubMed PMID: 30116496; PubMed Central PMCID: PMC6079341.
- [76] Lapierre LR, Hansen M. Lessons from *C. elegans*: signaling pathways for longevity. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(12):637–44. doi:10.1016/j.tem.2012.07.007. PubMed PMID: 22939742; PubMed Central PMCID: PMC3502657.
- [77] Braeckman BP, Vanfleteren JR. Genetic control of longevity in *C. elegans*. *Exp Gerontol*. 2007;42(1–2):90–8. doi:10.1016/j.exger.2006.04.010. PubMed PMID: 16829009.
- [78] GuhaThakurta D, Palomar L, Stormo GD, Tedesco P, Johnson TE, Walker DW, et al. Identification of a novel cis-regulatory element involved in the heat shock response in *Caenorhabditis elegans* using microarray gene expression and computational methods. *Genome Res*. 2002;12(5):701–12. doi:10.1101/gr.228902. PubMed PMID: 11997337; PubMed Central PMCID: PMC186591.
- [79] Kumsta C, Chang JT, Schmalz J, Hansen M. Hormetic heat stress and HSF-1 induce autophagy to improve survival and proteostasis in *C. elegans*. *Nat Commun*. 2017;8. doi:10.1038/ncomms14337. PubMed PMID: 28198373; PubMed Central PMCID: PMC5316864.

4. DISCUSSÃO

Em muitos países, terapias que envolvem o uso de medicamentos à base de plantas são popularmente utilizadas como abordagem principal ou complementar a tratamentos medicamentosos (Bent e Ko, 2004; Molassiotis *et al.*, 2005; Xue *et al.*, 2007). Os compostos bioativos presentes nas plantas auxiliam nos mecanismos de proteção de diversas doenças, e seu uso tem sido amplamente explorado pela população, principalmente pelo seu fácil acesso, baixo custo, não exigência de prescrição médica e crença na atoxicidade. Além disso, extratos vegetais despertam um interesse na indústria farmacêutica, uma vez que representam uma alternativa para o desenvolvimento de futuros medicamentos (Harvey, 2005).

O estresse oxidativo está envolvido na etiologia de diversas doenças, incluindo a obesidade, pois o excesso de tecido adiposo provoca o acúmulo de EROs nos adipócitos (Furukawa *et al.*, 2004); e também nas doenças degenerativas, entre elas o Alzheimer (Benzi e Moretti, 1995). Portanto, fitoterápicos com propriedades antioxidantes podem prevenir, retardar ou amenizar os sintomas dessas doenças (Ho *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2013), e são amplamente usados em diversos modelos de estudo. Além disso, visto que as causas dessas doenças são multifatoriais, a grande diversidade de constituintes bioativos dos fitoterápicos pode torná-los eficazes na intervenção ou prevenção de diversos distúrbios.

Neste trabalho foram investigados os efeitos do tratamento crônico com o extrato de *Ilex paraguariensis* utilizando um modelo *in vivo*, o *Caenorhabditis elegans*. Sabendo que existem vários mecanismos em comum entre as patologias da DA e da obesidade, como o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e inflamação (Pugazhenthil *et al.*, 2017), e também baseado nas evidências de que *Ilex paraguariensis* confere atividade antioxidante (Berte *et al.*, 2011; Bracesco *et al.*, 2011; Cuelho *et al.*, 2018), anti-obesidade (Arcari *et al.*, 2013; Gambero e Ribeiro, 2015; Choi *et al.*, 2017) e efeitos neuroprotetores (Prediger *et al.*, 2008; Branco Cdos *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2015; Ludka *et al.*, 2016), buscamos avaliar os efeitos de *Ilex paraguariensis* sobre o metabolismo lipídico de *C. elegans*, e também investigar os possíveis efeitos protetores do extrato e de um de seus principais constituintes, a cafeína, em um modelo de toxicidade induzida pelo peptídeo β A no nematoide *C. elegans*.

No primeiro estudo da tese, investigamos o efeito do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, obtido comercialmente na cidade de Santa Maria, no Rio Grande do Sul. Foram avaliados os comportamentos relacionados a homeostase energética, níveis lipídicos, consumo de oxigênio e atividade antioxidante em *C. elegans*. Através da análise por HPLC do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, os constituintes majoritários identificados foram os

compostos fenólicos ácido caféico e rutina, e a metilxantina cafeína, todos com propriedades antioxidantes descritos (Jeszka-Skowron *et al.*, 2015; Goncalves *et al.*, 2018).

Como os triacilgliceróis são os principais lipídios armazenados no organismo, buscamos uma concentração de *Ilex paraguariensis* que pudesse modular a ATGL-1, uma lipase que mobiliza gordura a partir dos triacilgliceróis armazenados em *C. elegans* (Narbonne e Roy, 2009), e também avaliamos os estoques lipídicos intestinais e hipodérmicos através do corante fluorescente BODIPY conjugado com ácido graxo. O tratamento com 1 mg / mL de *Ilex paraguariensis* aumentou a expressão de ATGL-1 e diminuiu a fluorescência do BODIPY. Esses resultados indicam que o extrato pode atuar no metabolismo da gordura de *C. elegans*, aumentando a mobilização de gordura armazenada. Portanto, 1 mg / mL de *Ilex paraguariensis* foi a concentração escolhida para os demais experimentos.

Os efeitos de *Ilex paraguariensis* observados no metabolismo da gordura de *C. elegans* não estão relacionados com batimentos faríngeos e o ciclo de defecação, que são comportamentos relacionados com a ingestão de alimentos (Lakowski e Hekimi, 1998), nem com a locomoção, que está associada ao aumento do gasto energético (Watts *et al.*, 2003; Castaneda *et al.*, 2005), ou com a produção de ovos, que indiretamente altera o metabolismo da gordura (Kubagawa *et al.*, 2006). Portanto o extrato parece atuar diretamente sobre os níveis de lipídeos, e não sobre os comportamentos relacionados a homeostase energética, que resultaria em um aumento do gasto energético.

Sabendo que um dos principais constituintes do extrato de *Ilex paraguariensis* é a cafeína, um agente termogênico envolvido no aumento das taxas metabólicas (Harpaz *et al.*, 2017), avaliamos o consumo de oxigênio como uma medida indireta da oxidação dos ácidos graxos. *Ilex paraguariensis* aumentou a taxa do consumo de oxigênio de *C. elegans*, e esse resultado foi dependente do receptor nuclear hormonal NHR-49, que regula a oxidação de gordura em *C. elegans* (Chamoli *et al.*, 2014). O NHR-49 tem como alvo múltiplas enzimas envolvidas na β -oxidação (Van Gilst *et al.*, 2005), incluindo a ATGL-1 (Kim *et al.*, 2012). Assim, acreditamos que *Ilex paraguariensis* tem um efeito central na oxidação dos ácidos graxos, que resulta na redução dos lipídeos armazenados.

A ação primária da cafeína ocorre via antagonismo do receptor de adenosina, resultando na inibição da fosfodiesterase e aumento da lipólise (Nehlig *et al.*, 1992b). Neste estudo também foi observado o envolvimento do sistema purinérgico, uma vez que *Ilex paraguariensis* não alterou a taxa de consumo de oxigênio na cepa nocaute para o receptor de adenosina *ador-1*, indicando que a cafeína é um constituinte essencial para os efeitos do extrato de *Ilex paraguariensis* observados em *C. elegans*.

A atividade antioxidante de *Ilex paraguariensis* está bem descrita na literatura (Berte *et al.*, 2011; Bracesco *et al.*, 2011; Cuelho *et al.*, 2018). Neste estudo o tratamento de animais da cepa selvagem com *Ilex paraguariensis* reduziu a mortalidade induzida por estresse químico com juglone, a qual gera toxicidade por aumentar os níveis de EROs (Blum e Fridovich, 1983), e constatamos que a *hsp-16.2*, uma chaperonina induzida por estresse (De Jong *et al.*, 1998), não está envolvido na resposta ao estresse de *Ilex paraguariensis*.

Tomados em conjunto, os resultados indicam que o extrato de *Ilex paraguariensis* pode proteger contra o estresse gerado pela juglone e modular o metabolismo da gordura, aumentando a expressão de ATGL-1 e a taxa de consumo de oxigênio em *C. elegans*. As possíveis vias incluem a expressão dos genes *nhr-49* e *ador-1*. Os efeitos no metabolismo da gordura parecem não ter relação com qualquer procedimento comportamental testado aqui. Além disso, a cafeína parece ser um constituinte importante que contribui de maneira importante para os efeitos observados neste estudo, corroborando com os efeitos da cafeína na oxidação de lipídeos observados em outros estudos (Acheson *et al.*, 1980; Bracco *et al.*, 1995; Acheson *et al.*, 2004; Harpaz *et al.*, 2017).

No segundo estudo da tese, procuramos elucidar a relação entre os efeitos protetores do extrato hidroalcolico de *Ilex paraguariensis* (IPHE) e da cafeína, em um modelo de toxicidade induzida pelo peptídeo β A em *C. elegans*, e determinar os mecanismos envolvidos na proteção frente a toxicidade desse peptídeo utilizando a cepa CL2006. Estudos mostram que a cafeína, em concentrações entre 1 a 100 mM, atrasam o envelhecimento de *C. elegans* e o protege contra distúrbios associados ao envelhecimento (Dostal *et al.*, 2010; Lublin *et al.*, 2011; Sutphin *et al.*, 2012; Bridi *et al.*, 2015). Em nosso estudo, buscamos usar baixas concentrações de cafeína, porém aproximadamente 9 vezes maiores que a encontrada nas concentrações de *Ilex paraguariensis* analisadas. Com isso pretendemos encontrar uma relação com os efeitos de *Ilex paraguariensis* e o conteúdo aproximado de metilxantinas no extrato.

Os tratamentos com *Ilex paraguariensis* e cafeína reduziram os níveis intracelulares de EROs em animais do tipo selvagem sob condições padrão e de estresse induzido por juglone, e também aumentaram a resistência ao estresse gerado por juglone. O potencial de *Ilex paraguariensis* e da cafeína para regular o estado redox de *C. elegans* foi correlacionado positivamente com o aumento da longevidade observado em todos os tratamentos nos animais selvagens. Estes resultados corroboram com estudos anteriores que demonstraram os efeitos antioxidantes de *Ilex paraguariensis in vitro* (Bastos, D. H. *et al.*, 2007; Cuelho *et al.*, 2018) e *in vivo* (Lima *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2018), e da cafeína apenas *in vitro* (Goncalves *et*

al., 2018). Apesar desse estudo *in vitro*, nosso trabalho é o primeiro a demonstrar as propriedades antioxidantes da cafeína em *C. elegans*.

O estresse oxidativo está associado à toxicidade induzida pelo peptídeo β A (Markesbery, 1997). No nosso estudo, *Ilex paraguariensis* reduziu os níveis de EROs e prolongou a longevidade dos animais CL2006. A cafeína também aumentou a longevidade desses animais, apesar de não ser capaz de reduzir a produção de EROs da mesma. Níveis mais altos de EROs estão presentes em animais que expressam o peptídeo β A em comparação aos animais controle (Smith e Luo, 2003), e o dano celular resultante do excesso de EROs é uma das principais consequências da toxicidade do peptídeo β A (Butterfield *et al.*, 1999). Também, nesse estudo *Ilex paraguariensis* e cafeína atrasaram o início da paralisia induzida por A β 1-42 na cepa CL2006. Para *Ilex paraguariensis*, estes resultados foram dependentes do fator de transcrição DAF-16, envolvido em processos relacionados ao envelhecimento e defesas antioxidantes e para *Ilex paraguariensis* e cafeína, os resultados foram dependentes do fator de transcrição HSF-1, envolvido na homeostase proteica.

Avaliando o mecanismo mais profundamente, observamos que *Ilex paraguariensis* e cafeína reduziram os níveis de RNAm do peptídeo A β 1-42 em CL2006. A expressão do peptídeo β A leva à indução de proteínas chaperonas HSP-16 para promover a homeostase proteica, incluindo HSP-16.2 (Fonte *et al.*, 2008). Aqui observamos que a expressão de *hsp-16.2* estava elevada em animais tratados apenas com a maior concentração de *Ilex paraguariensis*. Assim, os efeitos benéficos de *Ilex paraguariensis* em relação à paralisia induzida pelo peptídeo β A podem ser correlacionados com uma redução nos níveis de RNAm do peptídeo β A e uma expressão aumentada de *hsp-16.2*. Também, *Ilex paraguariensis* e a cafeína reduziram a atividade da enzima acetilcolinesterase, envolvida na patogênese da DA (Hampel *et al.*, 2019), corroborando seu efeito protetor na patogênese da DA. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que *Ilex paraguariensis* e a cafeína poderiam proteger contra a toxicidade induzida pelo peptídeo β A, aumentando as defesas antioxidantes, a expressão de chaperoninas, reduzindo a atividade da enzima acetilcolinesterase e a expressão do peptídeo β A com o envolvimento das vias HSF-1 para ambos, e da DAF-16 apenas para *Ilex paraguariensis*.

Embora o conteúdo de cafeína em *Ilex paraguariensis* seja menor do que as concentrações estudadas neste trabalho, os resultados foram notavelmente melhores quando tratados com *Ilex paraguariensis* do que com cafeína. Ainda que a cafeína seja o mais abundante bioativo de *Ilex paraguariensis*, outros constituintes presentes no extrato parecem ter contribuído para os efeitos benéficos observados.

Apesar de os extratos de *Ilex paraguariensis* estudados nos dois trabalhos serem diferentes, um aquoso e o outro hidroalcolico, resultando em diferentes composições, ambos possuíam como um dos seus principais constituintes bioativos a metilxantina cafeína. Através de ambos os estudos observamos o potencial antioxidante dos extratos, tanto sob condições basal ou induzida por estresse oxidativo gerado pela juglone ou pela toxicidade do peptídeo β A. Os dados sugerem que os efeitos observados ocorrem através da ativação de fatores de transcrição que modulam a expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos, envelhecimento e defesas antioxidantes de *C. elegans*.

Sabendo que o sobrepeso e a obesidade são fatores de risco para a DA, ou seja, uma dieta rica em gordura esta positivamente correlacionada com a patogenia da DA (Cole *et al.*, 2010), e também que essas doenças estão relacionadas com o aumento do estresse oxidativo (Furukawa *et al.*, 2004; Benzi e Moretti, 1995), o uso de substancias bioativas com atividade antioxidante e termogênica, e com potencial atividade protetora contra atoxicidade gerada pelo peptídeo β A podem ser alternativas para a terapêutica dessas doenças. Nesse estudo acreditamos que *Ilex paraguariensis*, mais que a cafeína, tem o potencial de prevenir as doenças neurodegenerativas indiretamente por atuar no metabolismo de lipídeos, promovendo a oxidação dos lipídeos, e também diretamente, quando a doença já esta instaurada, *Ilex paraguariensis* pode reduzir os efeitos deletérios gerados pela toxicidade do peptídeo β A pela sua atividade antioxidante, e também ativar vias importantes envolvidas na proteção frente aos danos oxidativos, manutenção da proteostase e ativação sistema de defesa e reparo celular, como a DAF-16 e as HSPs, conferindo efeitos benéficos também no envelhecimento.

Dulloo e colegas já mostraram em estudos *in vitro* e *in vivo* que o aumento da atividade termogênica induzidas pelo chá verde foi perdido quando a mesma quantidade de cafeína isolada presente no extrato foi testada (Dulloo *et al.*, 1999; Dulloo *et al.*, 2000). Outros estudos demonstraram que polifenóis isolados (Jagota e Rajadas, 2012; Regitz e Wenzel, 2014) e flavonóides (Smith e Luo, 2003; Jin *et al.*, 2009) já foram sugeridos para proteger contra a toxicidade induzida pelo peptídeo β A em um modelo de toxicidade em *C. elegans*, e também estão envolvido no aumento das defesas antioxidantes. Portanto, acreditamos que os efeitos benéficos de ambos os extratos de *Ilex paraguariensis* são devidos a um efeito sinérgico entre todos os constituintes do extrato, incluindo cafeína e outros componentes, que coletivamente melhoraram o efeito antioxidante, modulam o metabolismo e também reduzem a paralisia.

5. CONCLUSÕES

5.1 CONCLUSÃO GERAL

O extrato de *Ilex paraguariensis* tem sido associado a várias atividades biológicas, atribuídas principalmente à sua grande quantidade de compostos bioativos, incluindo as metilxantinas cafeína e teobromina e os compostos fenólicos ácido cafeico, ácido clorogênico e saponinas. Neste trabalho avaliamos os efeitos de *Ilex paraguariensis* sobre dois modelos distintos - metabolismo de lipídeos e modelo de toxicidade induzida pelo peptídeo β A - utilizando o nematódeo *C. elegans*. Os resultados obtidos nos permitem concluir que os extratos de *Ilex paraguariensis* apresentam atividade antioxidante, uma vez que protegeram contra o estresse gerado por juglone, e também reduziram as espécies reativas de oxigênio, estes efeitos ocorreram provavelmente pelo aumento das defesas antioxidantes de *C. elegans*. No estudo do metabolismo de lipídeos, foi possível observar que o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* aumentou a taxa metabólica de *C. elegans*, provavelmente via NHR-49 e ADOR-1. Já no estudo com o modelo de toxicidade induzida pelo peptídeo β A na cepa CL2006, os resultados sugerem que *Ilex paraguariensis* e a cafeína protegem contra a toxicidade induzida pelo peptídeo β A, aumentando a expressão de chaperoninas, reduzindo a atividade da enzima acetilcolinesterase e a expressão do peptídeo β A com o envolvimento das vias de sinalização DAF-16 e HSF-1. Tomados em conjunto, os dois trabalhos mostram o potencial terapêutico de *Ilex paraguariensis* para atuar nas patologias de sobrepeso e obesidade, como um adjuvante eficaz para o controle e manutenção do metabolismo de lipídeos, e dessa forma prevenindo ou retardando o aparecimento de doenças neurodegenerativas, como a DA, seja pela redução do risco do aparecimento da doença, ou pela ativação de fatores de transcrição que modulam a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse e na detoxificação em *C. elegans*.

5.2 CONCLUSÕES PARCIAIS

- O extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* protegeu *C. elegans* contra o estressor químico juglone e modulou o metabolismo da gordura de *C. elegans*, aumentando a expressão de *atgl-1* e a taxa de consumo de oxigênio em *C. elegans*. As possíveis vias incluem a NHR-49, via ligada à β -oxidação e ADOR-1, ortólogo do receptor de adenosina humana.

- O extrato hidroalcolico de *Ilex paraguariensis* e a cafeína, nos animais selvagem, aumentaram a longevidade, a sobrevivência após estresse químico com juglone e reduziram a produção de EROs sob condição padrão ou de estresse induzida por juglone. Para os animais da cepa CL2006, IPHE e cafeína aumentaram a longevidade, atrasaram a paralisia induzida pelo peptídeo β A e também diminuíram a atividade da AchE, mas apenas IPHE reduziu a produção de EROs. Os efeitos parecem ser dependentes dos fatores de transcrição HSF-1 e DAF-16 para IPHE, enquanto apenas do HSF-1 para cafeína, além disso IPHE e cafeína diminuíram os níveis de RNAm de β A nos vermes CL2006; no entanto, apenas o IPHE pode induzir a expressão da chaperonina hsp-16.2.

6. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos nesta tese, as perspectivas para trabalhos futuros são:

- Identificar precisamente o mecanismo de ação de *Ilex paraguariensis* para diminuir os depósitos de lipídeos em *C. elegans*, e avaliar o comportamento fino de *C. elegans* que possam ser alterados frente a exposição à *Ilex paraguariensis*;
- Avaliar os efeitos da cafeína isolada sob os depósitos de lipídeos de *C. elegans*, e também analisar outras plantas popularmente usadas e com grande quantidade de cafeína, como por exemplo, *Paullinia cupana*, o guaraná;
- Elucidar demais vias que possam estar envolvidas nos efeitos promovidos por IPHE e cafeína no modelo de toxicidade induzida pelo peptídeo β A, e também analisar o mecanismo de proteção de IPHE e cafeína frente a toxicidade do peptídeo β A com expressão neuronal;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHESON, K. J. et al. Metabolic effects of caffeine in humans: lipid oxidation or futile cycling? **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 1, p. 40-46, 2004.

ACHESON, K. J. et al. Caffeine and coffee: their influence on metabolic rate and substrate utilization in normal weight and obese individuals. **Am J Clin Nutr**, v. 33, n. 5, p. 989-997, 1980.

AFANAS'EV, Ilex New nucleophilic mechanisms of ros-dependent epigenetic modifications: comparison of aging and cancer. **Aging Dis**, v. 5, n. 1, p. 52-62, Feb 2014.

AISEN, P. S. et al. Report of the task force on designing clinical trials in early (predementia) AD. **Neurology**, v. 76, n. 3, p. 280-6, Jan 18 2011.

ALBERT, M. S. Cognitive and neurobiologic markers of early Alzheimer disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 24, p. 13547-51, Nov 26 1996.

ALZHEIMER, A. **A Characteristic Disease of the Cerebral Cortex: Meeting of South-West Germany Psychiatrists Held in Tübingen on November 3rd and 4th, 1906.**

ALZHEIMER'S, A. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement**, v. 11, n. 3, p. 332-84, Mar 2015.

AN, J. H. et al. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 45, p. 16275-16280, Nov 8 2005.

ANDERSON, A. S. et al. Antioxidants from medicinal plants used in the treatment of obesity. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 3, n. 3, p. 429, 2013.

ANGULO, E. et al. A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. **Brain Pathol**, v. 13, n. 4, p. 440-51, Oct 2003.

ANSTEY, K. J. et al. Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. **Obes Rev**, v. 12, n. 5, p. e426-37, May 2011.

ANTEBI, A. Genetics of aging in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS Genet**, v. 3, n. 9, p. 1565-71, Sep 2007.

ANTUNA-PUENTE, B. et al. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. **Diabetes Metab**, v. 34, n. 1, p. 2-11, Feb 2008.

ARCARI, D. P. et al. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. **Food Chem**, v. 141, n. 2, p. 809-15, Nov 15 2013.

ARENDASH, G. W. et al. Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid-beta levels in aged Alzheimer's disease mice. **J Alzheimers Dis**, v. 17, n. 3, p. 661-80, 2009.

ARYA, U.; DWIVEDI, H.; SUBRAMANIAM, J. R. Reserpine ameliorates Abeta toxicity in the Alzheimer's disease model in *Caenorhabditis elegans*. **Exp Gerontol**, v. 44, n. 6-7, p. 462-6, Jun-Jul 2009.

ASHRAFI, K. Obesity and the regulation of fat metabolism. 2007.

ASHRAFI, K. et al. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. **Nature**, v. 421, n. 6920, p. 268-72, Jan 16 2003.

AVOGARO, A. Insulin resistance: trigger or concomitant factor in the metabolic syndrome. **Panminerva Med**, v. 48, n. 1, p. 3-12, Mar 2006.

AYUDA-DURAN, B. et al. Epicatechin modulates stress-resistance in *C. elegans* via insulin/IGF-1 signaling pathway. **PLoS One**, v. 14, n. 1, p. e0199483, 2019.

BALL, M. J. Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in the hippocampus with ageing and dementia. A quantitative study. **Acta Neuropathol**, v. 37, n. 2, p. 111-8, Feb 28 1977.

BARGMANN, C. Ilex; KAPLAN, J. M. Signal transduction in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. **Annu Rev Neurosci**, v. 21, p. 279-308, 1998.

BARONE, J. J.; ROBERTS, H. R. Caffeine consumption. **Food Chem Toxicol**, v. 34, n. 1, p. 119-29, Jan 1996.

BASTOS, D. H. et al. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 423-32, Mar 12 2007.

BASTOS, D. H. M. et al. Yerba mate: pharmacological properties, research and biotechnology. **Med Aromat Plant Sci Biotechnol**, v. 1, n. 1, p. 37-46, 2007.

BASTOS, D. H. M.; TORRES, E. A. F. D. S. Bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. **Nutrire: revista da Sociedade Brasileira de alimentação e Nutrição**, v. 26, p. 77-89, 2003.

BENT, S.; KO, R. Commonly used herbal medicines in the United States: a review. **The American journal of medicine**, v. 116, n. 7, p. 478-485, 2004.

BENZI, G.; MORETTI, A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? **Neurobiol Aging**, v. 16, n. 4, p. 661-74, Jul-Aug 1995.

BERTE, K. A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 10, p. 5523-7, May 25 2011.

BIXBY, M. et al. Ilex paraguariensis extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sci**, v. 77, n. 3, p. 345-58, Jun 3 2005.

BLACKWELL, T. K. et al. SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p. 290-301, Nov 2015.

BLUM, J.; FRIDOVICH, Ilex Superoxide, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity in two free-living nematode species. **Arch Biochem Biophys**, v. 222, n. 1, p. 35-43, 1983.

BOASQUIVIS, P. F. et al. Guarana (*Paullinia cupana*) Extract Protects *Caenorhabditis elegans* Models for Alzheimer Disease and Huntington Disease through Activation of Antioxidant and Protein Degradation Pathways. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2018, p. 9241308, 2018.

BONDI, M. W. et al. Cognitive and neuropathologic correlates of Stroop Color-Word Test performance in Alzheimer's disease. **Neuropsychology**, v. 16, n. 3, p. 335-43, Jul 2002.

BRACCO, D. et al. Effects of caffeine on energy metabolism, heart rate, and methylxanthine metabolism in lean and obese women. **Am J Physiol**, v. 269, n. 4 Pt 1, p. E671-8, 1995.

BRACESCO, N. et al. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **J Altern Complement Med**, v. 9, n. 3, p. 379-87, Jun 2003.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **J Ethnopharmacol**, v. 136, n. 3, p. 378-384, 2011.

BRAECKMAN, B. P.; HOUTHOOFD, K.; VANFLETEREN, J. R. Intermediary metabolism. **WormBook**, p. 1-24, Feb 16 2009.

BRANCO CDOS, S. et al. Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylentetrazol-induced seizures in Wistar rats. **Brain Res Bull**, v. 92, p. 60-8, Mar 2013.

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

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

BRIDI, J. C. et al. Lifespan Extension Induced by Caffeine in *Caenorhabditis elegans* is Partially Dependent on Adenosine Signaling. **Front Aging Neurosci**, v. 7, p. 220-220, 2015.

BROCKMANN, G. A.; BEVOVA, M. R. Using mouse models to dissect the genetics of obesity. **Trends Genet**, v. 18, n. 7, p. 367-376, 2002.

BROWN, R. C.; LOCKWOOD, A. H.; SONAWANE, B. R. Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 9, p. 1250-6, Sep 2005.

BULLO, M. et al. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. **Obes Res**, v. 11, n. 4, p. 525-31, Apr 2003.

BULLOCK, R. New drugs for Alzheimer's disease and other dementias. **Br J Psychiatry**, v. 180, p. 135-9, Feb 2002.

BUTTERFIELD, D. A. et al. Elevated oxidative stress in models of normal brain aging and Alzheimer's disease. **Life Sci**, v. 65, n. 18-19, p. 1883-92, 1999.

CAO, Y. Y. et al. Salvianolic acid A, a polyphenolic derivative from *Salvia miltiorrhiza bunge*, as a multifunctional agent for the treatment of Alzheimer's disease. **Mol Divers**, v. 17, n. 3, p. 515-24, Aug 2013.

CARMAN, A. J. et al. Current evidence for the use of coffee and caffeine to prevent age-related cognitive decline and Alzheimer's disease. **J Nutr Health Aging**, v. 18, n. 4, p. 383-92, Apr 2014.

CARRAGETA, D. F. et al. Anti-obesity potential of natural methylxanthines. **Journal of Functional Foods**, v. 43, p. 84-94, 2018.

CASTANEDA, T. R. et al. Obesity and the neuroendocrine control of energy homeostasis: the role of spontaneous locomotor activity. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 5, p. 1314-1319, 2005.

CHALLISS, R. A.; RICHARDS, S. J.; BUDOHOSKI, L. Characterization of the adenosine receptor modulating insulin action in rat skeletal muscle. **Eur J Pharmacol**, v. 226, n. 2, p. 121-128, 1992.

CHAMOLI, M. et al. A novel kinase regulates dietary restriction-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*. **Aging Cell**, v. 13, n. 4, p. 641-655, 2014.

CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Herbal beverages: Bioactive compounds and their role in disease risk reduction - A review. **J Tradit Complement Med**, v. 8, n. 4, p. 451-458, Oct 2018.

CHAWLA, A. et al. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1866-70, Nov 30 2001.

CHOI, M. S. et al. Long-Term Dietary Supplementation with Yerba Mate Ameliorates Diet-Induced Obesity and Metabolic Disorders in Mice by Regulating Energy Expenditure and Lipid Metabolism. **J Med Food**, v. 20, n. 12, p. 1168-1175, Dec 2017.

CHOU, T. Wake up and smell the coffee. Caffeine, coffee, and the medical consequences. **West J Med**, v. 157, n. 5, p. 544-53, Nov 1992.

CHU, Y. F. et al. Crude caffeine reduces memory impairment and amyloid beta(1-42) levels in an Alzheimer's mouse model. **Food Chem**, v. 135, n. 3, p. 2095-102, Dec 1 2012.

CLIPPINGDALE, A. B.; WADE, J. D.; BARROW, C. J. The amyloid- β peptide and its role in Alzheimer's disease. **Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society**, v. 7, n. 5, p. 227-249, 2001.

COHEN, E. et al. Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. **Science**, v. 313, n. 5793, p. 1604-10, Sep 15 2006.

COLE, G. M.; MA, Q. L.; FRAUTSCHY, S. A. Dietary fatty acids and the aging brain. **Nutr Rev**, v. 68 Suppl 2, p. S102-11, Dec 2010.

CONSORTIUM, C. E. S. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2012-2018, 1998.

COSTA, J. et al. Caffeine exposure and the risk of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **J Alzheimers Dis**, v. 20 Suppl 1, p. S221-38, 2010.

CUELHO, C. H. F. et al. Topical formulation containing *Ilex Paraguariensis* extract increases metalloproteinases and myeloperoxidase activities in mice exposed to UVB radiation. **J Photochem Photobiol B**, v. 189, p. 95-103, Dec 2018.

CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochem Int**, v. 38, n. 2, p. 107-125, 2001.

CUPINO, T. L.; ZABEL, M. K. Alzheimer's silent partner: cerebral amyloid angiopathy. **Transl Stroke Res**, v. 5, n. 3, p. 330-7, Jun 2014.

DAS, L. et al. Role of nutraceuticals in human health. **Journal of food science and technology**, v. 49, n. 2, p. 173-183, 2012.

DASILVA, K. A.; SHAW, J. E.; MCLAURIN, J. Amyloid-beta fibrillogenesis: structural insight and therapeutic intervention. **Exp Neurol**, v. 223, n. 2, p. 311-21, Jun 2010.

DAVIDSON, T. L. et al. The effects of a high-energy diet on hippocampal-dependent discrimination performance and blood-brain barrier integrity differ for diet-induced obese and diet-resistant rats. **Physiol Behav**, v. 107, n. 1, p. 26-33, Aug 20 2012.

DE ANDRADE, F. et al. Safety assessment of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) dried extract: results of acute and 90 days subchronic toxicity studies in rats and rabbits. **Food Chem Toxicol**, v. 50, n. 2, p. 328-34, Feb 2012.

DE JONG, W. W.; CASPERS, G. J.; LEUNISSEN, J. A. Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily. **Int J Biol Macromol**, v. 22, n. 3-4, p. 151-62, May-Jun 1998.

DE LA MONTE, S. M.; WANDS, J. R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. **J Diabetes Sci Technol**, v. 2, n. 6, p. 1101-13, Nov 2008.

DE MENDONCA, A.; SEBASTIAO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? **Brain Res Brain Res Rev**, v. 33, n. 2-3, p. 258-74, Sep 2000.

DEVOE, L. D. et al. Maternal caffeine consumption and fetal behavior in normal third-trimester pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 168, n. 4, p. 1105-11; discussion 1111-2, Apr 1993.

Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 916, p. i-viii, 1-149, backcover, 2003.

DIMITRIADI, M.; HART, A. C. Neurodegenerative disorders: insights from the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Neurobiol Dis**, v. 40, n. 1, p. 4-11, Oct 2010.

DOSTAL, V.; LINK, C. D. Assaying beta-amyloid toxicity using a transgenic *C. elegans* model. **J Vis Exp**, n. 44, Oct 9 2010.

DOSTAL, V.; ROBERTS, C. M.; LINK, C. D. Genetic mechanisms of coffee extract protection in a *Caenorhabditis elegans* model of beta-amyloid peptide toxicity. **Genetics**, v. 186, n. 3, p. 857-66, Nov 2010.

DULLOO, A. G. et al. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. **Am J Clin Nutr**, v. 70, n. 6, p. 1040-1045, 1999.

DULLOO, A. G. et al. Green tea and thermogenesis: interactions between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 24, n. 2, p. 252-258, 2000.

DURLAC, P. J. et al. A rapid effect of caffeinated beverages on two choice reaction time tasks. **Nutr Neurosci**, v. 5, n. 6, p. 433-42, Dec 2002.

EDWARDS, R. D. Changes in world inequality in length of life: 1970-2000. **Popul Dev Rev**, v. 37, n. 3, p. 499-528, 2011.

ESKELINEN, M. H.; KIVIPELTO, M. Caffeine as a protective factor in dementia and Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 20 Suppl 1, p. S167-74, 2010.

ESKELINEN, M. H. et al. Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. **J Alzheimers Dis**, v. 16, n. 1, p. 85-91, 2009.

FAIN, J. N. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. **Vitam Horm**, v. 74, p. 443-77, 2006.

FANG, P. et al. Endogenous peptides as risk markers to assess the development of insulin resistance. **Peptides**, v. 51, p. 9-14, Jan 2014.

FILIP, R. et al. Phenolic compounds in seven South American Ilex species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774-778, 2001.

FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species. **J Cell Biol**, v. 194, n. 1, p. 7-15, Jul 11 2011.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

FITZPATRICK, A. L. et al. Midlife and late-life obesity and the risk of dementia: cardiovascular health study. **Arch Neurol**, v. 66, n. 3, p. 336-42, Mar 2009.

FONTE, V. et al. Interaction of intracellular β amyloid peptide with chaperone proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 14, p. 9439-9444, 2002.

FONTE, V. et al. Suppression of in vivo beta-amyloid peptide toxicity by overexpression of the HSP-16.2 small chaperone protein. **J Biol Chem**, v. 283, n. 2, p. 784-91, Jan 11 2008.

FORSE, R. A.; BETANCOURT-GARCIA, M. M.; KISSEE, M. C. Epidemiology and discrimination in obesity. In: (Ed.). **The ASMBS textbook of bariatric surgery**: Springer, 2020. p.3-14.

FREDHOLM, B. B. et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacol Rev**, v. 51, n. 1, p. 83-133, 1999.

FREDHOLM, B. B. et al. Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p. 385-412, 2005.

FREEMAN, L. R.; GRANHOLM, A. C. Vascular changes in rat hippocampus following a high saturated fat and cholesterol diet. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 32, n. 4, p. 643-53, Apr 2012.

FRIEDRICH, M. Epidemic of obesity expands its spread to developing countries. **Jama**, v. 287, n. 11, p. 1382-1386, 2002.

FROKJAER-JENSEN, C. et al. Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. **Nat Genet**, v. 40, n. 11, p. 1375-83, Nov 2008.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752-1752, 2004.

GAHR, M. et al. Cerebral Amyloid Angiopathy--a disease with implications for neurology and psychiatry. **Brain Res**, v. 1519, p. 19-30, Jun 26 2013.

GAMBERO, A.; RIBEIRO, M. L. The Positive Effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in Obesity. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 730-750, 2015.

GAN, R. Y. et al. Health Benefits of Bioactive Compounds from the Genus *Ilex*, a Source of Traditional Caffeinated Beverages. **Nutrients**, v. 10, n. 11, Nov 5 2018.

GELBER, R. P. et al. Coffee intake in midlife and risk of dementia and its neuropathologic correlates. **J Alzheimers Dis**, v. 23, n. 4, p. 607-15, 2011.

GHARIBI, B. et al. Contrasting effects of A1 and A2b adenosine receptors on adipogenesis. **Int J Obes (Lond)**, v. 36, n. 3, p. 397-406, Mar 2012

GHOSH, D. D. et al. Multisensory integration in *C. elegans*. **Curr Opin Neurobiol**, v. 43, p. 110-118, Apr 2017.

GIULIAN, R. et al. Elemental characterization of commercial mate tea leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) before and after hot water infusion using ion beam techniques. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 3, p. 741-6, Feb 7 2007.

GNOATTO, S. C.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. L. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 723-725, 2005.

GOLDFARB, B. ADA/EASD statement casts critical eye on metabolic syndrome. **DOC News**, v. 2, n. 10, p. 1-5, 2005.

GONCALVES, D. F. et al. Caffeine and acetaminophen association: Effects on mitochondrial bioenergetics. **Life Sci**, v. 193, p. 234-241, Jan 15 2018.

GRAHAM, H. N. Mate. **Prog Clin Biol Res**, v. 158, p. 179-83, 1984.

GRAHAM, T. E. Caffeine and exercise: metabolism, endurance and performance. **Sports Med**, v. 31, n. 11, p. 785-807, 2001.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 224, n. 2, p. 338-344, 1996.

GUPTA, S. et al. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. **J Neurochem**, v. 120, n. 6, p. 1060-71, Mar 2012.

GUZIK, T. J.; MANGALAT, D.; KORBUT, R. Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? **J Physiol Pharmacol**, v. 57, n. 4, p. 505-28, Dec 2006.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. 344, n. 8924, p. 721-4, Sep 10 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford university press Oxford, 1999.

HAMPEL, H. et al. Revisiting the Cholinergic Hypothesis in Alzheimer's Disease: Emerging Evidence from Translational and Clinical Research. **J Prev Alzheimers Dis**, v. 6, n. 1, p. 2-15, 2019.

HARPAZ, E. et al. The effect of caffeine on energy balance. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, v. 28, n. 1, p. 1-10, Jan 1 2017.

HARVEY, A. Natural Products in Drug Discovery and Development. 27-28 June 2005, London, UK. **IDrugs**, v. 8, n. 9, p. 719-21, Sep 2005.

HASSING, L. B. et al. Overweight in midlife is related to lower cognitive function 30 years later: a prospective study with longitudinal assessments. **Dement Geriatr Cogn Disord**, v. 29, n. 6, p. 543-52, 2010.

HASSING, L. B. et al. Overweight in midlife and risk of dementia: a 40-year follow-up study. **Int J Obes (Lond)**, v. 33, n. 8, p. 893-8, Aug 2009.

HAYASHI, M. Oxidative stress in developmental brain disorders. **Neuropathology**, v. 29, n. 1, p. 1-8, Feb 2009.

HECK, C. Ilex; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **J Food Sci**, v. 72, n. 9, p. R138-51, 2007.

HECKMAN, M. A.; WEIL, J.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **J Food Sci**, v. 75, n. 3, p. R77-87, Apr 2010.

HEKIMI, S.; LAPOINTE, J.; WEN, Y. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. **Trends Cell Biol**, v. 21, n. 10, p. 569-76, Oct 2011.

HENEKA, M. T. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Lancet Neurol**, v. 14, n. 4, p. 388-405, Apr 2015.

HERNDON, L. A. et al. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. **Nature**, v. 419, n. 6909, p. 808-14, Oct 24 2002.

HICKS, A. Current status and future development of global tea production and tea products. **AU JT**, v. 12, n. 4, p. 251-264, 2009.

HO, E. et al. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. **Redox Biol**, v. 1, p. 483-91, Oct 8 2013.

HO, Y.-S.; SO, K.-F.; CHANG, R. C.-C. Anti-aging herbal medicine—how and why can they be used in aging-associated neurodegenerative diseases? **Ageing research reviews**, v. 9, n. 3, p. 354-362, 2010.

HODGKIN, J. Karyotype, ploidy, and gene dosage. 2005.

HRUBY, A.; HU, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. **Pharmacoeconomics**, v. 33, n. 7, p. 673-89, Jul 2015.

HSU, A. L.; MURPHY, C. T.; KENYON, C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. **Science**, v. 300, n. 5622, p. 1142-5, May 16 2003.

HUNG, C. W. et al. Ageing and neurodegenerative diseases. **Ageing Res Rev**, v. 9 Suppl 1, p. S36-46, Nov 2010.

ITO, E.; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. Theophylline metabolism in higher plants. **Biochim Biophys Acta**, v. 1336, n. 2, p. 323-330, 1997. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.

JAGOTA, S.; RAJADAS, J. Effect of phenolic compounds against Abeta aggregation and Abeta-induced toxicity in transgenic *C. elegans*. **Neurochem Res**, v. 37, n. 1, p. 40-8, Jan 2012.

JAGUST, W. et al. Central obesity and the aging brain. **Arch Neurol**, v. 62, n. 10, p. 1545-8, Oct 2005.

JANN, M. W. Pharmacology and clinical efficacy of cholinesterase inhibitors. **Am J Health Syst Pharm**, v. 55 Suppl 2, p. S22-5, Nov 1 1998.

JESZKA-SKOWRON, M.; KRAWCZYK, M.; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A. Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 40, p. 70-77, 2015.

JIN, C. H. et al. Fustin flavonoid attenuates beta-amyloid (1-42)-induced learning impairment. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 16, p. 3658-70, Dec 2009.

JONES, K. T.; ASHRAFI, K. *Caenorhabditis elegans* as an emerging model for studying the basic biology of obesity. **Dis Model Mech**, v. 2, n. 5-6, p. 224-229, 2009.

JOSHI, V. Phyto-Nutrients, Nutraceutical, Fermented Foods and Traditional Medicine in Human Health: Issues, Concerns and Strategies.

KAHN, N. W. et al. Proteasomal dysfunction activates the transcription factor SKN-1 and produces a selective oxidative-stress response in *Caenorhabditis elegans*. **Biochemical Journal**, v. 409, p. 205-213, Jan 1 2008.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 5, p. 387-398, 2006.

KARMI, A. et al. Increased brain fatty acid uptake in metabolic syndrome. **Diabetes**, v. 59, n. 9, p. 2171-7, Sep 2010.

KAYMAK, E. et al. Efficient generation of transgenic reporter strains and analysis of expression patterns in *Caenorhabditis elegans* using library MosSCIlex **Dev Dyn**, v. 245, n. 9, p. 925-36, Sep 2016.

KENYON, C. A pathway that links reproductive status to lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1204, p. 156-62, Aug 2010.

KHAN, A. H. et al. Conserved signaling pathways genetically associated with longevity across the species. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v. 1865, n. 7, p. 1745-1755, Jul 1 2019.

- KIM, S. et al. PDHK-2 deficiency is associated with attenuation of lipase-mediated fat consumption for the increased survival of *Caenorhabditis elegans* dauers. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41755, 2012.
- KIRKMAN, M. S. et al. Diabetes in older adults: a consensus report. **J Am Geriatr Soc**, v. 60, n. 12, p. 2342-56, Dec 2012.
- KUBAGAWA, H. M. et al. Oocyte signals derived from polyunsaturated fatty acids control sperm recruitment in vivo. **Nat Cell Biol**, v. 8, n. 10, p. 1143-1148, 2006.
- LAKOWSKI, B.; HEKIMI, S. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 22, p. 13091-13096, 1998.
- LAKSO, M. et al. Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein. **J Neurochem**, v. 86, n. 1, p. 165-72, Jul 2003.
- LANOUE, K. F.; MARTIN, L. F. Abnormal A1 adenosine receptor function in genetic obesity. **FASEB J**, v. 8, n. 1, p. 72-80, 1994.
- LAPIERRE, L. R.; HANSEN, M. Lessons from *C. elegans*: signaling pathways for longevity. **Trends Endocrinol Metab**, v. 23, n. 12, p. 637-44, Dec 2012.
- LARGE, V. et al. Metabolism of lipids in human white adipocyte. **Diabetes Metab**, v. 30, n. 4, p. 294-309, Sep 2004.
- LEE, H. M. et al. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 62, n. 1, p. 194-204, Jan 2013.
- LEITE, M. R. et al. Protective effect of caffeine and a selective A2A receptor antagonist on impairment of memory and oxidative stress of aged rats. **Exp Gerontol**, v. 46, n. 4, p. 309-15, Apr 2011.
- LEONARDUZZI, G.; SOTTERO, B.; POLI, G. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited. **Pharmacol Ther**, v. 128, n. 2, p. 336-74, Nov 2010.
- LEUNG, M. C. et al. *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. **Toxicol Sci**, v. 106, n. 1, p. 5-28, Nov 2008.
- LI, X. et al. Specific SKN-1/Nrf Stress Responses to Perturbations in Translation Elongation and Proteasome Activity. **Plos Genetics**, v. 7, n. 6, Jun 2011.
- LIMA, L. C. W. RESOLUÇÃO-RDC ANVISA Nº 2, DE 7 DE JANEIRO DE 2002. **Publicação no DOU de**, v. 9, n. 01/02, 2002.
- LIMA, M. E. et al. *Ilex paraguariensis* Extract Increases Lifespan and Protects Against the Toxic Effects Caused by Paraquat in *Caenorhabditis elegans*. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 10, p. 10091-10104, 2014.

LINDEN, J. Structure and function of A1 adenosine receptors. **FASEB J**, v. 5, n. 12, p. 2668-2676, 1991.

LINK, C. D. Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 20, p. 9368-72, 1995.

LINK, C. D. et al. Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. **Neurobiol Aging**, v. 24, n. 3, p. 397-413, May-Jun 2003.

LUBLIN, A. et al. FDA-approved drugs that protect mammalian neurons from glucose toxicity slow aging dependent on cbp and protect against proteotoxicity. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27762, 2011.

LUBLIN, A. L.; GANDY, S. Amyloid-beta oligomers: possible roles as key neurotoxins in Alzheimer's Disease. **Mt Sinai J Med**, v. 77, n. 1, p. 43-9, Jan-Feb 2010.

LUDKA, F. K. et al. *Ilex paraguariensis* hydroalcoholic extract exerts antidepressant-like and neuroprotective effects: involvement of the NMDA receptor and the L-arginine-NO pathway. **Behav Pharmacol**, v. 27, n. 4, p. 384-92, Jun 2016.

LUZ, A. B. G. et al. The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy. **Int Immunopharmacol**, v. 36, p. 165-172, Jul 2016.

MACHADO, M. L. et al. *Ilex paraguariensis* modulates fat metabolism in *Caenorhabditis elegans* through purinergic system (ADOR-1) and nuclear hormone receptor (NHR-49) pathways. **PLoS One**, v. 13, n. 9, p. e0204023, 2018.

MACK, H. *Ilex*; HEIMBUCHER, T.; MURPHY, C. T. The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model for aging research. **Drug Discovery Today: Disease Models**, 2019.

MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? **Crit Care**, v. 10, n. 1, p. 208, Feb 2006.

MAIA, L.; DE MENDONCA, A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? **Eur J Neurol**, v. 9, n. 4, p. 377-82, Jul 2002. ISSN 1351-5101 (Print) 1351-5101.

MALTA, D. C. et al. A construção da vigilância e prevenção das doenças crônicas não transmissíveis no contexto do Sistema Único de Saúde. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 15, n. 3, p. 47-65, 2006.

MALTA, D. C.; SILVA JR, J. B. D. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil após três anos de implantação, 2011-2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, p. 389-395, 2014.

MALTA, D. C.; SZWARCOWALD, C. L. Population-based surveys and monitoring of noncommunicable diseases. **Rev Saude Publica**, v. 51 Suppl 1, p. 2s, Jun 1 2017.

MANDELKOW, E.-M.; MANDELKOW, E. Tau in Alzheimer's disease. **Trends in cell biology**, v. 8, n. 11, p. 425-427, 1998.

MARKAKI, M.; TAVERNARAKIS, N. Modeling human diseases in *Caenorhabditis elegans*. **Biotechnol J**, v. 5, n. 12, p. 1261-76, Dec 2010.

MARKESBERY, W. R. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. **Free Radic Biol Med**, v. 23, n. 1, p. 134-47, 1997.

MAZZAFERA, P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. **Food chemistry**, v. 60, n. 1, p. 67-71, 1997.

MI, K.; JOHNSON, G. V. The role of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Curr Alzheimer Res**, v. 3, n. 5, p. 449-63, Dec 2006.

MILANSKI, M. et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. **J Neurosci**, v. 29, n. 2, p. 359-70, Jan 14 2009.

MILIOLI, E. M. et al. Effect of acute administration of hydroalcohol extract of *Ilex paraguariensis* St Hilair (Aquifoliaceae) in animal models of Parkinson's disease. **Phytother Res**, v. 21, n. 8, p. 771-6, Aug 2007.

MITTAL, K.; MANI, R. J.; KATARE, D. P. Type 3 Diabetes: Cross Talk between Differentially Regulated Proteins of Type 2 Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease. **Sci Rep**, v. 6, p. 25589, May 6 2016.

MOLASSIOTIS, A. et al. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. **Annals of oncology**, v. 16, n. 4, p. 655-663, 2005.

MONTEIRO, C. A.; MONDINI, L.; COSTA, R. B. Mudanças na composição e adequação nutricional da dieta familiar nas áreas metropolitanas do Brasil (1988-1996). **Revista de Saúde Pública**, v. 34, p. 251-258, 2000.

MORLEY, J. F.; MORIMOTO, R. *Ilex* Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. **Mol Biol Cell**, v. 15, n. 2, p. 657-64, Feb 2004.

MOSIMANN, A. L.; WILHELM-FILHO, D.; DA SILVA, E. L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Biofactors**, v. 26, n. 1, p. 59-70, 2006.

MURPHY, C. T.; HU, P. J. Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*. **WormBook**, p. 1-43, Dec 26 2013.

MURPHY, C. T. et al. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 424, n. 6946, p. 277-283, 2003.

MURSHID, A.; EGUCHI, T.; CALDERWOOD, S. K. Stress proteins in aging and life span. **Int J Hyperthermia**, v. 29, n. 5, p. 442-7, Aug 2013.

NAHAS, M. V. **Atividade física, saúde e qualidade de vida: conceitos e sugestões para um estilo de vida ativo.** Midiograf, 2006.

NARBONNE, P.; ROY, R. Caenorhabditis elegans dauers need LKB1/AMPK to ration lipid reserves and ensure long-term survival. **Nature**, v. 457, n. 7226, p. 210-214, 2009.

NASS, R.; BLAKELY, R. D. The Caenorhabditis elegans dopaminergic system: opportunities for insights into dopamine transport and neurodegeneration. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 43, p. 521-44, 2003.

NEHA, K. et al. Medicinal prospects of antioxidants: A review. **Eur J Med Chem**, v. 178, p. 687-704, Sep 15 2019.

NEHLIG, A.; DAVAL, J. L.; DEBRY, G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 17, n. 2, p. 139-70, May-Aug 1992a.

NEPAL, B.; BROWN, L. J.; ANSTEY, K. J. Rising midlife obesity will worsen future prevalence of dementia. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e99305, 2014.

NIRAULA, P. et al. Ilex paraguariensis Extends Lifespan and Increases an Ability to Resist Environmental Stresses in Drosophila. **Rejuvenation Res**, v. 21, n. 6, p. 497-505, Dec 2018.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 11, p. 1287-312, Dec 1 2001.

ODDONE, E.; IMBRIANI, M. [Are we underestimating occupational risks for neurodegenerative diseases?]. **G Ital Med Lav Ergon**, v. 37, n. 1, p. 5-7, Jan-Mar 2015.

OGG, S. et al. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in C. elegans. **Nature**, v. 389, n. 6654, p. 994-9, Oct 30 1997.

ORGANIZATION, W. H. **The World health report: 1998: Life in the 21st century: a vision for all: executive summary.** Geneva: World Health Organization. 1998

ORGANIZATION, W. H. **Dementia: a public health priority.** World Health Organization, 2012. ISBN 9241564458.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 85-97, Feb 2011.

PANAHI, Y. et al. Neuroprotective effects of antioxidants in the management of neurodegenerative disorders: A literature review. **J Cell Biochem**, v. 120, n. 3, p. 2742-2748, Mar 2019.

PANCHAL, S. K. et al. Caffeine attenuates metabolic syndrome in diet-induced obese rats. **Nutrition**, v. 28, n. 10, p. 1055-62, Oct 2012.

PANG, J.; CHOI, Y.; PARK, T. Ilex paraguariensis extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Arch Biochem Biophys**, v. 476, n. 2, p. 178-85, Aug 15 2008.

PARK, J. Y. et al. Neuroprotection by fructose-1,6-bisphosphate involves ROS alterations via p38 MAPK/ERK. **Brain Res**, v. 1026, n. 2, p. 295-301, Nov 12 2004.

PAULA, Vanessa de Jesus R. de et al. Neurobiological pathways to Alzheimer's disease: Amyloid-beta, TAU protein or both?. **Dementia & Neuropsychologia**, v. 3, n. 3, p. 188-194, 2009.

PEETERS, A. et al. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. **Ann Intern Med**, v. 138, n. 1, p. 24-32, Jan 7 2003.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **Int J Biomed Sci**, v. 4, n. 2, p. 89-96, Jun 2008.

PHARMACOPOEIA, B. British pharmacopoeia. 2016.

PI-SUNYER, F. X. The epidemiology of central fat distribution in relation to disease. **Nutr Rev**, v. 62, n. 7 Pt 2, p. S120-6, 2004.

PIEVANI, M. et al. Brain connectivity in neurodegenerative diseases--from phenotype to proteinopathy. **Nat Rev Neurol**, v. 10, n. 11, p. 620-33, Nov 2014.

POPKIN, B. M.; ADAIR, L. S.; NG, S. W. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. **Nutr Rev**, v. 70, n. 1, p. 3-21, Jan 2012.

PRAITIS, V. et al. Creation of low-copy integrated transgenic lines in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 157, n. 3, p. 1217-26, Mar 2001.

PREDIGER, R. D. et al. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **J Ethnopharmacol**, v. 120, n. 3, p. 465-73, Dec 8 2008.

PRINCE, M. et al. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. **Alzheimers Dement**, v. 9, n. 1, p. 63-75 e2, Jan 2013.

PRZEDBORSKI, S.; VILA, M.; JACKSON-LEWIS, V. Neurodegeneration: what is it and where are we? **J Clin Invest**, v. 111, n. 1, p. 3-10, Jan 2003.

PUGAZHENTHI, S.; QIN, L.; REDDY, P. H. Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v. 1863, n. 5, p. 1037-1045, May 2017.

PURDON, D.; ARAI, T.; RAPOPORT, S. No evidence for direct incorporation of esterified palmitic acid from plasma into brain lipids of awake adult rat. **J Lipid Res**, v. 38, n. 3, p. 526-30, Mar 1997.

QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 362, n. 4, p. 329-44, Jan 28 2010.

RAMSDEN, M. et al. Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). **J Neurosci**, v. 25, n. 46, p. 10637-47, Nov 16 2005.

REGINATTO, F. H. et al. Methylxanthines accumulation in Ilex species-caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other Ilex species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6, p. 443-446, 1999.

REGITZ, C.; WENZEL, U. Amyloid-beta (A β 1-42)-induced paralysis in *Caenorhabditis elegans* is reduced by restricted cholesterol supply. **Neurosci Lett**, v. 576, p. 93-6, Jul 25 2014.

REIS EDE, M. et al. Antidepressant-like effect of *Ilex paraguariensis* in rats. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 958209, 2014.

REITER, R. J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. **FASEB J**, v. 9, n. 7, p. 526-33, Apr 1995.

REVETT, T. J. et al. Glutamate system, amyloid ss peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. **J Psychiatry Neurosci**, v. 38, n. 1, p. 6-23, Jan 2013.

RIACHI, L. G.; DE MARIA, C. A. B. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of functional foods**, v. 38, p. 308-320, 2017.

RIDDLE, D. L. et al. Introduction to *C. elegans*. In: RIDDLE, D. L.; BLUMENTHAL, T., et al (Ed.). 2nd. Cold Spring Harbor (NY), 1997a.

RIVERA, E. J. et al. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. **J Alzheimers Dis**, v. 8, n. 3, p. 247-68, Dec 2005.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, E. et al. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. **Brain Research**, v. 858, n. 2, p. 436-439, Mar 10 2000.

ROMACHO, T. et al. Adipose tissue and its role in organ crosstalk. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 210, n. 4, p. 733-53, Apr 2014.

ROSLER, M. et al. Free radicals in Alzheimer's dementia: currently available therapeutic strategies. **J Neural Transm Suppl**, v. 54, p. 211-9, 1998.

ROSS, C. A.; POIRIER, M. A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. **Nat Med**, v. 10 Suppl, p. S10-7, Jul 2004.

RTVELADZE, K. et al. Health and economic burden of obesity in Brazil. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68785, 2013. ISSN 1932-6203.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, Dec 13 2001.

SALUD, O. P. D. L.; ORGANIZATION, P. A. H. **La salud en las Américas**. Pan American Health Org, 2002.

SANTAMARIA, A. et al. Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. **J Neurochem**, v. 86, n. 2, p. 479-88, Jul 2003.

SANTOS, E. C. et al. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. **Neuroscience**, v. 292, p. 13-21, Apr 30 2015.

SCALBERT, A.; JOHNSON, Ilex T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **Am J Clin Nutr**, v. 81, n. 1 Suppl, p. 215S-217S, Jan 2005.

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J. C.; MOSCA, S. M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. **Clin Nutr**, v. 24, n. 3, p. 360-6, Jun 2005.

SCHINELLA, G. R. et al. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, n. 2, p. 357-360, 2000.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiological reviews**, v. 81, n. 2, p. 741-766, 2001.

SEO, K. et al. Heat shock factor 1 mediates the longevity conferred by inhibition of TOR and insulin/IGF-1 signaling pathways in *C. elegans*. **Aging Cell**, v. 12, n. 6, p. 1073-81, Dec 2013.

SHAW, H. J. **The Consuming Geographies of Food: Diet, Food Deserts and Obesity**. Routledge, 2014.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

SINGH, S. K. et al. Neuroprotective and Antioxidant Effect of Ginkgo biloba Extract Against AD and Other Neurological Disorders. **Neurotherapeutics**, v. 16, n. 3, p. 666-674, Jul 2019.

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

SNODGRASS, R. G. et al. Inflammasome-mediated secretion of IL-1beta in human monocytes through TLR2 activation; modulation by dietary fatty acids. **J Immunol**, v. 191, n. 8, p. 4337-47, Oct 15 2013.

SPIEGELMAN, B. M.; FLIER, J. S. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 531-543, 2001.

STEEN, E. et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? **J Alzheimers Dis**, v. 7, n. 1, p. 63-80, Feb 2005.

SULSTON, J. E. et al. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Developmental biology**, v. 100, n. 1, p. 64-119, 1983.

SUTPHIN, G. L. et al. Caffeine extends life span, improves healthspan, and delays age-associated pathology in *Caenorhabditis elegans*. **Longev Healthspan**, v. 1, p. 9, 2012.

SVILAR, D. et al. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, n. 12, p. 2491-507, Jun 15 2011.

TAKALO, M. et al. High-fat diet increases tau expression in the brain of T2DM and AD mice independently of peripheral metabolic status. **J Nutr Biochem**, v. 25, n. 6, p. 634-41, Jun 2014.

TUCSEK, Z. et al. Obesity in aging exacerbates blood-brain barrier disruption, neuroinflammation, and oxidative stress in the mouse hippocampus: effects on expression of genes involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 69, n. 10, p. 1212-26, Oct 2014.

TULLET, J. M. et al. Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. **Cell**, v. 132, n. 6, p. 1025-38, Mar 21 2008.

VAN BREDA, S. G. J.; DE KOK, T. Smart Combinations of Bioactive Compounds in Fruits and Vegetables May Guide New Strategies for Personalized Prevention of Chronic Diseases. **Mol Nutr Food Res**, v. 62, n. 1, Jan 2018.

VAN GILST, M. R. et al. Nuclear hormone receptor NHR-49 controls fat consumption and fatty acid composition in *C. elegans*. **PLoS Biol**, v. 3, n. 2, p. e53, Feb 2005.

VILA-LUNA, S. et al. Chronic caffeine consumption prevents cognitive decline from young to middle age in rats, and is associated with increased length, branching, and spine density of basal dendrites in CA1 hippocampal neurons. **Neuroscience**, v. 202, p. 384-95, Jan 27 2012.

WAGNER, K.-H.; BRATH, H. A global view on the development of non communicable diseases. **Preventive medicine**, v. 54, p. S38-S41, 2012.

WATTS, J. L. et al. Deficiencies in C20 polyunsaturated fatty acids cause behavioral and developmental defects in *Caenorhabditis elegans* fat-3 mutants. **Genetics**, v. 163, n. 2, p. 581-589, 2003.

WEINBERG, B. A.; BEALER, B. K. **The world of caffeine: the science and culture of the world's most popular drug**. Psychology Press, 2001.

WHITE, J. G. et al. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 314, n. 1165, p. 1-340, Nov 12 1986.

WHITMER, R. A. The epidemiology of adiposity and dementia. **Curr Alzheimer Res**, v. 4, n. 2, p. 117-22, Apr 2007.

WHITMER, R. A. et al. Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. **BMJ**, v. 330, n. 7504, p. 1360, Jun 11 2005.

WHITMER, R. A. et al. Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later. **Neurology**, v. 71, n. 14, p. 1057-64, Sep 30 2008.

WHO. **Noncommunicable Diseases Progress Monitor, 2017**: World Health Organization Geneva 2015.

WICKS, S. R. et al. Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. **Nat Genet**, v. 28, n. 2, p. 160-164, 2001.

WILCOX, G. Insulin and insulin resistance. **Clin Biochem Rev**, v. 26, n. 2, p. 19-39, May 2005.

WILLCOX, J. K.; ASH, S. L.; CATIGNANI, G. L. Antioxidants and prevention of chronic disease. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 44, n. 4, p. 275-95, 2004.

WILSON, D. M.; BINDER, L. Ilex Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. **Am J Pathol**, v. 150, n. 6, p. 2181-95, Jun 1997.

WISHER, D. Martindale: The complete drug reference. **Journal of the Medical Library Association**, v. 100, n. 1, p. 75-77, 2012.

WU, Y. et al. Heat shock treatment reduces beta amyloid toxicity in vivo by diminishing oligomers. **Neurobiol Aging**, v. 31, n. 6, p. 1055-8, Jun 2010.

XUE, C. C. et al. Complementary and alternative medicine use in Australia: a national population-based survey. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 13, n. 6, p. 643-650, 2007.

YUDKIN, J. S. et al. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, n. 4, p. 972-8, Apr 1999.

ZAMBERLAN, D. C. et al. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) protects against amyloid-beta toxicity in *Caenorhabditis elegans* through heat shock protein response activation. **Nutr Neurosci**, p. 1-11, Sep 9 2018.

ZHANG, S. O. et al. Genetic and dietary regulation of lipid droplet expansion in *Caenorhabditis elegans*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 10, p. 4640-4645, 2010.