

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Audrei de Oliveira Alves

**EFEITO GENÔMICO DE BEBIDAS RICAS EM CAFEINA E  
CATEQUINAS NA MODULAÇÃO DE MARCADORES OXIDATIVOS E  
INFLAMATÓRIOS ASSOCIADOS A IMUNOSSENESCÊNCIA**

Santa Maria, RS  
2021

**Audrei de Oliveira Alves**

**EFEITO GENÔMICO DE BEBIDAS RICAS EM CAFEINA E CATEQUINAS NA  
MODULAÇÃO DE MARCADORES OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS ASSOCIADOS  
A IMUNOSSENESCÊNCIA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito para obtenção do título de **Doutora em Farmacologia**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS  
2021

Alves, Audrei de Oliveira  
EFEITO GENÔMICO DE BEBIDAS RICAS EM CAFEINA E  
CATEQUINAS NA MODULAÇÃO DE MARCADORES OXIDATIVOS E  
INFLAMATÓRIOS ASSOCIADOS A IMUNOSSENESCÊNCIA / Audrei de  
Oliveira Alves.- 2021.  
103 f.; 30 cm

Orientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia, RS, 2021

1. envelhecimento; 2. inflamação; 3.  
imunossenescência. I. Cruz, Ivana Beatrice Mânica da II.  
Titulo.

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.

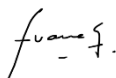
Declaro, AUDREI DE OLIVEIRA ALVES, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, 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.

**Audrei de Oliveira Alves**

**EFEITO GENÔMICO DE BEBIDAS RICAS EM CAFEINA E CATEQUINAS NA  
MODULAÇÃO DE MARCADORES OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS ASSOCIADOS  
A IMUNOSSENESCÊNCIA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito para obtenção do título de **Doutor em Farmacologia**.

**Aprovada em 10 de dezembro de 2021:**



---

**Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dr<sup>a</sup>. (Presidente/orientadora)**



---

**Patrícia Severo do Nascimento, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**



---

**Tatiana Emanuelli, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**



---

**Margarete Dulce Bagatini, Dr<sup>a</sup>. (UFFS)**



---

**Jacqueline da C. E. Piccoli, Dr<sup>a</sup>. (UNIPAMPA)**

Santa Maria, RS

2021

*Para as estrelas mais brilhantes do meu céu,  
Mimi e Ivo.*

*Todo o meu amor e gratidão.  
Desde sempre, pra sempre.*

## Agradecimentos

É preciso sonhar grande para realizar grandes feitos. Porém, grandes batalhas demandam e necessitam de grandes, dedicados e fiéis guerreiros. Hoje, especialmente, venho agradecer aos meus, que estiverem comigo desde o início da minha jornada.

Em primeiro lugar, agradeço aos grandes amores da minha vida, Mimi e Ivo. Foram eles que criaram esta mulher forte, ética, honrada, batalhadora, honesta, dedicada e repleta de amor. A eles, toda a minha gratidão.

A minha irmã, Andréa, minha bruxa preferida! Por todas as vezes em que tu me deu colo, me puxou as orelhas, me incentivou e me motivou a ser melhor do que eu sou. Te amo, desde sempre, pra sempre. Mesmo tu tendo roubado meus mamás.

Aos meus raios de sol, os homens da minha vida, os donos do meu coração, Danilo Filho e Murilo, por terem me mostrado qual o meu propósito de vida: o de ser tia. Esse é o meu melhor papel. Titisguela ama vocês.

As amigas de uma vida inteira, Ana Paula e Viviane. Vocês são o meu esteio, o meu porto seguro. Obrigada pela honra de fazer parte da vida dos meus anjos: Marina, minha periquita dos olhos de jabuticaba, e Luiz Paulo, meu gurizinho.

As minhas “maridas” Kellen e Daniele, e as “nossas” filhas Rafaela e Paola. Minha vida é mais colorida, mais leve e mais feliz com vocês.

A Taís Unfer, colega de graduação, por ter me apresentado a professora Ivana e ter tornado essa jornada possível. Não foi à toa que tu foi a primeira pessoa com quem falei nos corredores da UFSM. Já estava escrito que seguiríamos juntas até hoje. A ti, minha gratidão eterna.

A Grazielle, Beatriz e Charles. Obrigada por absolutamente tudo. Desde as inúmeras gauderidades com a parati (preta!!), até o momento em que estamos hoje. Fortalecemos nossos laços e o que era uma parceria de laboratório virou uma parceria pra vida. Pra toda a vida. Vocês se tornaram família. Amo vocês.

A Cibele e a Bárbara, por todas as viagens terapêuticas a Porto Alegre. Foi uma felicidade imensa termos tido a chance de nos conhecermos novamente, com um olhar de amor, de amizade, respeito, carinho e cuidado. Vocês estarão para sempre no meu coração.

Ao Moisés, minha princesa! Nossa conexão vem de outras vidas, com certeza. Estava escrito e não acaba aqui. Obrigada por tudo. Dinda te ama.

Aos demais colegas do laboratório de Biogenômica, minha gratidão, meu respeito e meu agradecimento. Em especial a Fernanda e a Verônica. Vocês foram parte importante no meu processo de crescimento. Obrigada pelos ensinamentos, pelos chimas, pelas festas, pelos drinks e pelo convívio diário. Já sinto saudades.

A professora Ivana, meu mais sincero e profundo agradecimento. Obrigada por todos os ensinamentos, pelas oportunidades, pelo incentivo. Mas, especialmente, por ter proporcionado a chance de cumprir a promessa que fiz pro meu pai. Um encanador que estudou até o terceiro ano primário e tinha vergonha de assinar o próprio nome, mas queria que as filhas tivessem um futuro diferente. Tenha a certeza de que ele está radiante e agradecido a ti, assim como eu.

A CAPES, pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia por ter tornado possível a concretização de um sonho.

***“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”***

***Madre Teresa de Calcutá***



## RESUMO

### EFEITO GENÔMICO DE BEBIDAS RICAS EM CAFEINA E CATEQUINAS NA MODULAÇÃO DE MARCADORES OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS ASSOCIADOS A IMUNOSSENESCÊNCIA

AUTORA: Audrei de Oliveira Alves  
ORIENTADORA: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

**Introdução:** O Brasil tem apresentado um envelhecimento populacional acelerado quando comparado com outros países do mundo, fato que impacta diretamente os sistemas de saúde e assistência social, pois o envelhecimento biológico está associado a disfunções que aumentam o risco de dependência, de doenças crônicas não transmissíveis, institucionalização, hospitalização e morte. Além disso, diminui a eficiência da resposta imune frente a infecção por patógenos, situação observada na pandemia Covid-19, na qual os idosos foram os mais afetados. Evidências epidemiológicas, clínicas e experimentais sugerem que o envelhecimento biológico pode ser modulado por fatores ambientais como a dieta, que parece ser capaz de atenuar alterações fisiológicas relevantes. **Objetivos:** Neste sentido, este estudo buscou avaliar o efeito genômico dos extratos aquosos de café, chás preto e verde, erva-mate e guaraná na modulação de marcadores oxidativos e inflamatórios. O primeiro estudo analisou a modulação inflamatória de células mononucleares do sangue periférico não ativadas (CMSPs-na), neutrófilos humanos ativados por levedura e celomócitos granulocíticos da minhoca *E. fetida*. O segundo estudo envolveu dois protocolos distintos. O primeiro avaliou a ativação inflamatória de CMSPs obtidas de indivíduos saudáveis antes e após a ingestão de 100mL de cada bebida, via modulação de espécies reativas (ERs). O segundo protocolo envolveu uma análise *in vitro* dos extratos cafeinados e das moléculas bioativas isoladas cafeína (Caf), teobromina (The) e catequina (Cat) na modulação dos genes das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX). **Resultados:** Os resultados do primeiro estudo estão publicados no periódico *Food and Chemical Toxicology*. Imunoensaios realizados em CMSPs humanas cultivadas por 24hs mostraram que todos os extratos diminuíram os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL 6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , e aumentaram os níveis da anti-inflamatória, IL-10, além de induzir uma super expressão dos seus genes. Um ensaio adicional, no qual neutrófilos humanos com e sem exposição aos extratos foram expostos a leveduras inativadas, mostrou que houve aumento na produção de armadilhas extracelulares (NETs). A análise da resposta inflamatória desencadeada em minhocas tratadas com os extratos e expostas a leveduras inativadas corroborou a hipótese de que estas bebidas melhoram a resposta imunológica na presença de patógenos sendo, porém, distinta para cada extrato, com destaque especial para a erva-mate. O segundo estudo foi submetido ao periódico *Nutrition* e analisou culturas de CMSPs antes e após a ingestão dos extratos, demonstrando diminuição da viabilidade e dos níveis de óxido nítrico (ON) após a ingestão. Os extratos exibiram alta similaridade na regulação dos genes antioxidantes, diminuindo a expressão dos mesmos. **Conclusões:** O conjunto dos resultados sugere que bebidas cafeinadas compartilham componentes bioativos nas suas matrizes químicas, e que os mesmos possuem similaridade de ação, modulando processos inflamatórios crônicos de baixo grau e aumentando a competência da inflamação aguda desencadeada por agentes patogênicos. Assim, parece que bebidas cafeinadas são atenuadoras de processos de imunossenescência associados as disfunções e DCNTs prevalentes no envelhecimento biológico.

**Palavras-chave:** envelhecimento; inflamação; imunossenescência.

## ABSTRACT

### EFEITO GENÔMICO DE BEBIDAS RICAS EM CAFEINA E CATEQUINAS NA MODULAÇÃO DE MARCADORES OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS ASSOCIADOS A IMUNOSSENESCÊNCIA

AUTHOR: Audrei de Oliveira Alves  
ADVISOR: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

**Introduction:** Brazil has shown an accelerated aging process when compared to other countries in the world, a fact that directly impacts health and social care systems, as biological aging is associated with dysfunctions that increase the risk of dependence, non-communicable chronic diseases (NCCDs), institutionalization, hospitalization and death. In addition, it reduces the efficiency of the immune response against infection by pathogens, a situation observed in the Covid-19 pandemic, in which the elderly people were the most affected. Epidemiological, clinical and experimental evidence suggests that biological aging could be modulated by environmental factors such as diet, which seems to be able to mitigate relevant physiological changes. **Objectives:** In this sense, this study aimed to evaluate the genomic effect of aqueous extracts of coffee, black and green teas, yerba mate and guarana in the modulation of oxidative and inflammatory markers. The first study analyzed the inflammatory modulation of non-activated peripheral blood mononuclear cells (na-PBMCs), yeast-activated human neutrophils, and *Eisenia fetida* earthworm granulocytic coelomocytes. The second study involved two separate protocols. The first one evaluated the inflammatory activation of PBMCs obtained from healthy individuals before and after ingesting 100 mL of each drink, by modulation of reactive oxygen species (ROS). The second protocol involved an *in vitro* analysis of caffeinated extracts and isolated bioactive molecules caffeine (Caf), theobromine (The) and catechin (Cat) in the modulation of antioxidant enzymes genes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX). **Results:** The results of the first study are published in the journal *Food and Chemical Toxicology*. Immunoassays performed in human PBMCs cultured for 24 hours showed that all extracts decreased the levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL 6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , and increased the levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10, in addition to induce an overexpression of their genes. An additional assay, in which human neutrophils with and without treatment to the extracts were exposed to inactivated yeasts, showed that there was an increase in the production of neutrophil extracellular traps (NETs). The analysis of the inflammatory response triggered in earthworms treated with the extracts and exposed to inactivated yeasts corroborated the hypothesis that these beverages improve the immune response in the presence of pathogens, being, however, distinct for each extract, with special emphasis on yerba mate. The second study was submitted to the journal *Nutrition* and analyzed PBMC cultures before and after the ingestion of extracts, demonstrating a decrease in viability and in nitric oxide (NO) levels after ingestion. The extracts exhibited high similarity in the regulation of antioxidant genes, decreasing their expression. **Conclusions:** The set of results suggests that caffeinated beverages share bioactive components in their chemical matrix, and have similar action, modulating low-grade chronic inflammatory processes and increasing the competence of acute inflammation triggered by pathogens. Thus, it seems that caffeinated beverages may attenuate immunosenescence processes associated with the dysfunctions and NCCDs prevalent in biological aging.

**Keywords:** aging, inflammation; immunosenescence.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Visão geral das células que participam da imunidade inata e da imunidade adaptativa.....	25
Figura 2 - Papel dos macrófagos na resposta inflamatória contra agentes microbianos ou lesões físicas. (A) Principais funções relacionadas a polarização de macrófagos M1 e M2 na inflamação. (B) Gráfico ilustrativo do papel dos macrófagos M1-M2 na inflamação aguda e na inflamação crônica. Nesta última o estado pró-inflamatório se mantém induzindo a destruição e disfunções teciduais.....	27
Figura 3 - Síntese dos principais processos que levam ao estabelecimento da inflamação crônica de baixo grau que induz o fenômeno “ <i>inflammaging</i> ” .....	32
Figura 4 - Representação gráfica da perda do polifenol quercetina após processamento dos alimentos (cozimentos) através do índice de retenção calculado. Índices maiores que 1 indicam que não houve perda do polifenol após processamento. Valores abaixo de 1 indicam perda do polifenol após processamento do alimento.....	41

## ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO

Figure 1 - Map indicating the world origin of plant species widely used in caffeinated beverages and the estimated caffeine concentration (mg/100 mL) of each species. Caffeine concentration estimates from each food item were obtained from Bhatti et al. (2013), Schimpl et al. (2013), and Je and Giovannucci (2014).....

02

Figure 2 - Hot aqueous extracts of caffeinated beverages. (A) Antioxidant capacity estimated by 50% effective concentration to scavenger (EC50) DPPH radicals. (B) Genoprotective effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damage triggered in pure calf dsDNA molecules. (C) Effect of different extracts on the viability of PBMCs 24 h cell cultures determined by MTT assay. Different letters indicate significant differences, determined using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test ( $p \leq 0.05$ ).....

06

Figure 3 - Effect of hot aqueous extracts of caffeinated beverages at 10  $\mu$ g/mL concentration and pure chemical molecules at concentrations found in each extract on the levels of supernatant cytokines of 24 h PBMC cultures. (A) proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ . (B) Pure molecules effects on proinflammatory cytokines. (C) IL-10 anti-inflammatory cytokine. Extracts: coffee (CO), black tea (BT), green tea (GT), yerba mate (YM), and guarana (GU). Bioactive molecules: caffeine (CAF), theobromine (THE), and catechin (CAT). Different letters indicate significant differences determined by one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test ( $p \leq 0.05$ ). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.).....

07

Figure 4 - Nutrigenomic effect of hot aqueous extracts of caffeinated beverages at a concentration of 10  $\mu$ g/mL and pure chemical molecules found in each extract on 24 h PBMC cultures. (A) Levels of cytokine gene expression of PBMC exposed to whole extracts: coffee (CO), black tea (BT), green tea (GT), yerba mate (YM), and guarana (GU). (B) Levels of cytokine gene expression of PBMC exposed to bioactive molecules: caffeine (CAF), theobromine (THE), catechin (CAT). (C) Identification of extracts and chemical molecules that present a similar effect on cytokines gene expression modulation by correspondence analysis. Gene expression was determined by qRT-PCR and results were normalized using the  $\beta$ -actin gene. In A and B, different letters indicate significant differences determined by oneway ANOVA, followed by Tukey's post hoc test ( $p \leq 0.05$ ). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.).....

08

Figure 5 - Encapsulation process formed by neutrophil cells around yeasts. In this immune response, the cells migrate via the movement of amoeboid trapping and destroying the yeasts. (A) Fluorescent images showing the encapsulation process. (B) General view of neutrophils cells (400x) by optical microscopy stained using Panoptic kit.....

09

Figure 6 - Characterization of immune cells found in supernatant and pellet extruded from coelomic fluid of *E.fetida* earthworm as an experimental model in studies involving inflammatory response. (A) Coelomocyte (eleocytes and amoebocytes) populations identified by flow cytometry. (B) General view of coelomocytes cells (100x) by optical microscopy stained using Panoptic kit. (C) Different stages of encapsulation process formed by coelomocyte cells around the yeasts. In this immune response, the cells migrate via the movement of amoeboid trapping and destroying the yeasts. In the final stage, these cells produce high concentrations of melanin, in the form of structures known as “brown bodies.” This is an acute and fast immune earthworm response against large microorganisms and residues. Cells participating in the encapsulation process present similar characteristics as human granulocytic cells. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.).....

10

Fig. 7. Earthworm (*E. fetida*) acute immune response assay consisting of paper filter contact during 24 h exposure to different hot water caffeinated extracts at 5 µg/mL concentration. Coffee (CO), black tea (BT), green tea (GT), yerba mate (YM), and guaraná (GU). (A) Representative brown bodies produced by coelomocytes exposed to inactive yeast cells. (B) Comparison of median brown bodies perimeters of coelomocytes obtained from earthworms exposed to different caffeinated beverages. Since the brown bodies present high size variations, a statistical comparison was performed using the non-parametric Kruskal-Wallis test, followed by Median post hoc test ( $p \leq 0.05$ ). (C) Representative microphotographs of extracellular trap (ET) structures produced by coelomocytes challenged by inactivated yeast cells. Left-hand side shows the ET around and between the brown bodies with yeast-trapped imaged by optical microscopy (200x). Right-hand side shows the presence of DNA molecules on ET structure detected by PicoGreen® dye with fluorescence microscopy (200x). Scale bar: 10 µm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.).....

11

## TABELAS DO ARTIGO

Table 1 - Accession codes, Lengths (pb) and forward and reverse sequences of primers used to verify gene activation.....	04
Table 2 - Concentrations of bioactive compounds of hot aqueous extracts produced from five caffeinated beverages: coffee (CO), black tea (BT), green tea (GT), yerba mate (YM) and guarana (GU).....	06

## ILUSTRAÇÕES DO MANUSCRITO

Figure 1 - General experimental design: Protocol 1 evaluated the effects of caffeinated beverages on human oxidative markers in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in 24 h cell cultures obtained before intake (BI) and after intake (AI) of the extracts. Each extract was processed with 10 g of crude power diluted in 100 mL hot water (90°C) for 10 min and filtered. Protocol 2 used PBMCs exposed *in vitro* to similar caffeinated beverage concentrations (extraction conditions: 10 g/100 mL water, 90°C for 10 min) to evaluate antioxidant gene expression. The nutrigenomic effects of the concentration of the three main bioactive molecules present in each extract were evaluated. C = control; CO = coffee; GT = green tea; BT = black tea; YM = yerba mate; GU = guarana. Caf = caffeine The = theobromine; Cat = catechin. YM extract presented non-detectable Cat concentrations [8]; consequently, it was not evaluated. The identification of the molecules from each extract was denoted as CO-Caf, CO-The, CO-Cat, GT-Caf, GT-The, GT-Cat, BT-Caf, BT-The, BT-Cat, YM-Caf, YM-The, GU-Caf, GU-The, and GU-Cat. Because non-significant levels of Cat were detected in CO and YM extracts, only Caf and The are reported for these extracts.....

06

Figure 2 - Comparison of viability and oxidative markers between human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) cultures performed before (BI) and after (AI) intake of 100 mL caffeinated beverages. Data are presented as an index of each variable calculated by the following equation: Index = AI/BI. Values below 1 indicate decreasing levels, whereas values above 1 indicate increasing levels. As expected, the controls presented an index of approximately 1 because no additional variables were included in the two cultures. Statistical comparison was performed using a one-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test. Different letters indicate significant differences at  $p \leq 0.05$  between groups...

Figure 3 - Nutrigenomic effects of hot aqueous extracts of caffeinated beverages at a concentration of 10 µg/mL for each extract in 24 h PBMCs cultures. (A) Levels of antioxidant enzyme genes (*SOD* = superoxide dismutase; *GPX* = glutathione peroxidase; *CAT* = catalase). Treatments: control (C); coffee (CO), black tea (BT), green tea (GT), yerba mate (YM), and guarana (GU). Gene expression was determined by qRT-PCR, and results were normalized using the  $\beta$ -actin gene as the control. Different letters indicate significant differences determined by a one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test ( $p \leq 0.05$ ).....

15

Figure 4 - Nutrigenomic effects of the three major isolated bioactive molecules in the caffeinated beverage extracts (1 µg/0.02 g dry extract) on antioxidant genes in 24 h human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) cultures treated with 10 µg/mL of each extract. (A) Caffeine (Caf) effects on antioxidant genes; (B) theobromine (The) effects on antioxidant genes; (C) catechin (Caf) effects on antioxidant genes. *SOD* = superoxide dismutase; *GPX* = glutathione peroxidase; *CAT* = catalase. Gene expression was determined by qRT-PCR, and the results were normalized using the *β-actin* gene. Different letters indicate significant differences determined by a one-way analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* test ( $p \leq 0.05$ ).....

17

Figure 5 - Correspondence analysis for identification of potential similarities in gene expression of antioxidant enzymes (*SOD* = superoxide dismutase 1 and 2; *CAT* = catalase; *GPX* = glutathione peroxidase) among five caffeinated extracts (CO = coffee; BT= black tea; GT= green tea; YM = yerba mate; GU = guarana) and isolated bioactive molecules (Caffeine = Caf; Theobromine = The, and Cat= catechin). (A) Presence of genomic effects on gene expression without considering the intensity; (B) genomic effects considering the intensity and direction of gene modulation (upregulation or downregulation).....

18

## TABELAS DO ARTIGO

Table 1 - Concentrations of the major isolated active molecules in hot water caffeinated beverages, as previously described by Alves et al. [8].....

08

**Table 2** Comparison between 24 h peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures before (BI) and after (AI) intake of caffeinated extracts.....

12

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMSPs	Células mononucleares do sangue periférico
DAMPS	Do inglês, <i>damage-associated molecular patterns</i>
DCNTs	Doenças crônicas não transmissíveis
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EGCG	Epigallocatequina galato
EM	Elastase neutrofílica
ERs	Espécies reativas
FMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
LPS	Lipopolissacarídeo
MPO	Mieloperoxidase
NETs	Do Inglês, <i>neutrophil extracellular traps</i>
NOS	Óxido nítrico sintetase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Íon superóxido
ON	Óxido nítrico
PAD4	Peptil arginina desaminase 4
PCR	Proteína C reativa
PR3	Proteinase 3
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS – ARTIGO

BB	Do inglês, <i>brown body</i>
BT	Do inglês, <i>black tea</i>
CAF	Do inglês, <i>caffeine</i>
CAT	Do inglês, <i>catechin</i>
cDNA	Do inglês, <i>complementary DNA</i>
CO	Do inglês, <i>coffee</i>
DPPH assay	Do inglês, <i>2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical assay</i>
dsDNA	Do inglês, <i>double-stranded calf DNA</i>
ELISA	Do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assays</i>
ETs	Do inglês, <i>extracelular traps</i>
ETweb	Do inglês, <i>extracelular traps web</i>
exDNA	Do inglês, <i>extracellular DNA</i>
FBS	Do inglês, <i>fetal bovine serum</i>
FPR	Do inglês,
FSC	Do inglês, <i>forward scatter</i>
GEMO assay	Do inglês, <i>genomodifier capacity assay</i>
GT	Do inglês, <i>green tea</i>
GU	Do inglês, <i>guaraná</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Do inglês, <i>hidrogen peroxide</i>
IFN- $\gamma$	Do inglês, <i>interferon gamma</i>
IL-1 $\beta$	Do inglês, <i>interleukin 1 beta</i>
IL-6	Do inglês, <i>interleukin 6</i>
IL-10	Do inglês, <i>interleukin 10</i>
LBSS	Do inglês, <i>lumbricus balanced salt solution</i>
mRNA	Do inglês, <i>RNA Messenger</i>
MTT assay	Do inglês, <i>3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay</i>
NET-trap	Do inglês, <i>neutrophil extracellular trap</i>
PBS	Do inglês, <i>phosphate buffer saline</i>
PMA	Do inglês, <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
SSC	Do inglês, <i>side scatter</i>
TACE	Do inglês, <i>TNF-<math>\alpha</math>-converting enzyme</i>
THE	Do inglês, <i>theobromine</i>
TNF- $\alpha$	Do inglês, <i>tumor necrosis factor alpha</i>
YM	Do inglês, <i>yerba mate</i>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS – MANUSCRITO

AI	Do inglês, <i>after intake</i>
BI	Do inglês, <i>before intake</i>
BT	Do inglês, <i>black tea</i>
cDNA	Do inglês, <i>complementary DNA</i>
Caf	Do inglês, <i>caffeine</i>
Cat	Do inglês, <i>catechin</i>
CAT	Do inglês, <i>catalase</i>
CNTDs	Do inglês, <i>chronic non transmissible diseases</i>
CO	Do inglês, <i>coffee</i>
DCF-DA	Do inglês, <i>dichlorofluorescein acetate</i>
ds-DNA	Do inglês, <i>double-stranded calf DNA</i>
eNOS	Do inglês, <i>endothelial nitric oxide sintetase</i>
GPX	Do inglês, <i>glutathione peroxidase</i>
GU	Do inglês, <i>guaraná</i>
GT	Do inglês, <i>green tea</i>
HP	Do inglês, <i>hidrogen peroxide</i>
LPX	Do inglês, <i>lipoperoxidation</i>
mRNA	Do Inglês, <i>mithochondrial RNA</i>
nNOS	Do inglês, <i>neuronal nitric oxide sintetase</i>
NO	Do inglês, <i>nitric oxide</i>
PBMCs	Do inglês, <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
Pcarb	Do inglês, <i>protein carbonylation</i>
qRT-PCR	Do inglês, <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
ROS	Do inglês, <i>reactive oxigen species</i>
SOD 1	Do inglês, <i>superoxide dismutase 1</i>
SOD 2	Do inglês, <i>superoxide dismutase 2</i>
TBARS	Do inglês, <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
The	Do inglês, <i>theobromine</i>
YM	Do inglês, <i>yerba mate</i>





## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1 OBJETIVOS .....	23
1.1.1 Objetivo geral .....	23
1.1.2 Objetivos específicos .....	23
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	25
2.1 ENVELHECIMENTO DEMOGRÁFICO .....	25
2.2 ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO: O PAPEL DO SISTEMA IMUNE .....	26
2.2.1 Resposta inflamatória mediada por macrófagos .....	28
2.2.2 Imunossenescência e o fenômeno “ <i>inflammaging</i> ” .....	30
2.3 EFICIÊNCIA DA RESPOSTA ANTIPATOGENICA NO ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO .....	35
2.4 MODULAÇÃO DA IMUNOSSENESCÊNCIA PELA DIETA .....	38
2.4.1 O papel antioxidante e anti-inflamatório dos polifenóis .....	39
2.4.2 Potenciais variáveis interferentes nas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias dos polifenóis .....	41
<b>3 ARTIGO ACEITO</b> .....	45
<b>4 MANUSCRITO SUBMETIDO</b> .....	46
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	79
<b>6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	87
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	88
<b>ANEXO 1 – ARTIGO ACEITO</b> .....	98
<b>ANEXO 2 – CAPÍTULO DE LIVRO</b> .....	99
<b>ANEXO 3 – CAPÍTULO DE LIVRO</b> .....	100
<b>ANEXO 4 – CAPÍTULO DE LIVRO</b> .....	101
<b>ANEXO 5 – CAPÍTULO DE LIVRO</b> .....	102
<b>ANEXO 6 – ARTIGO DE REVISÃO</b> .....	103

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o mundo vem demonstrando uma tendência de envelhecimento populacional, embora em países desenvolvidos, como é o caso do Brasil, as condições socioeconômicas e de saúde não estejam acompanhando o crescimento da proporção de idosos. Aproximadamente 962 milhões da população mundial têm mais de 60 anos, um número estimado para aumentar para 1,4 bilhão em 2030 e para 2,1 bilhões em 2050. Além disso, projeções indicam que o número de pessoas com 80 anos ou mais tendem a aumentar dos atuais 137 milhões para 425 milhões em 2050 (UNITED NATIONS SECRETARIAT, 2017).

Investigações biogerontológicas e epidemiológicas indicam uma predisposição aumentada a todo tipo de enfermidades, ligada a alterações no sistema imune associadas a idade (PAWELEC, GOLDECK & DERHOVANESSIAN, 2014; FRANCESCHI & CAMPISI, 2014). Estas alterações são conhecidas pelo termo imunossenescência. Este conceito sugere que o sistema imunológico estaria envelhecendo como um todo, com determinadas funções ou capacidades sendo perdidas antes de outras. Um exemplo é a resposta imune, composta por pela imunidade inata e a adaptativa, distintas entre si, mas altamente relacionadas (SOLANA et al., 2010; MONTGOMERY; SHAW, 2015; CASTELO-BRANCO; SOVERAL, 2014; LARBI, FULOP, 2014).

O impacto da imunossenescência no sistema imune inato ocorre, principalmente, através de alterações como ativação e indução de uma resposta inflamatória crônica de baixo grau, associada a patogênese de diversos tipos de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), incluindo doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e osteomusculares, altamente prevalentes em idosos. Este processo é conhecido como “fenômeno *inflammaging*”, ou seja, indução do envelhecimento biológico mediado por um estado de inflamação crônica de baixo grau e persistente. A imunossenescência também altera a competência de células imunes em reconhecer e destruir patógenos. Ou seja, altera a imunocompetência (RODRIGUES et al., 2021). Esta menor capacidade de idosos em debelar infecções foi grandemente observada no contexto da Pandemia Covid-19, no

qual este grupo populacional foi mais afetado (TAHAGHOGHI-HAJGHORBANI et al., 2020).

Investigações têm sugerido que alguns marcadores de imunossenescência poderiam ser atenuados por fatores ambientais relacionados ao estilo de vida, com destaque especial a nutrição. Evidências sugerem que a dieta tem um papel extremamente relevante como ferramenta nutrigenômica, podendo atenuar marcadores da imunossenescência, incluindo diminuição nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e proliferação de macrófagos, indução na expressão de enzimas antioxidantes e diminuição nas taxas de agregação plaquetária. É possível também que elementos dietéticos possam contribuir na eficiência antimicrobiana, via aumento da função de células inatas, como os neutrófilos. Entretanto, a maior parte dos estudos foi realizada a partir da análise isolada de determinadas moléculas bioativas, em especial polifenóis, ou a partir da produção de extratos laboratoriais, geralmente hidroalcológicos, que não correspondem ao modo de processamento habitual de alimentos e bebidas consumidos pela população, e que poderiam apresentar potencial ação moduladora em alguns marcadores da imunossenescência (WEYH et al., 2020).

Como exemplos podemos citar algumas bebidas amplamente consumidas e que apresentam uma matriz química com preponderância de xantinas (cafeína, teobromina, teofilina) e diversos tipos de catequinas, como café, chá verde, chá preto, erva-mate e guaraná. Diversos estudos têm sugerido que as mesmas possuem ação antioxidante e anti-inflamatória, indicando atenuação na imunossenescência (SCHROETER et al., 2006; KURIYAMA et al., 2006; FRAGA et al., 2019; KOCH et al., 2018, KREWER et al., 2014).

Por este motivo, é relevante a identificação de alimentos funcionais que tenham a capacidade de modular, não somente os estados de inflamação crônica, mas também a imunocompetência frente a exposição a agentes patogênicos. Estudos prévios têm sugerido que bebidas cafeinadas ricas em catequinas, altamente consumidas no mundo, como o café, chás preto e verde, erva-mate e guaraná têm propriedades imunomoduladoras relevantes. Entretanto, investigações comparando a ação destas bebidas que têm uma matriz química cafeína-catequina similar, preparadas como habitualmente são consumidas pela população (via extrato aquoso a quente) ainda são

incipientes, principalmente em relação ao seu efeito na imunocompetência de células imunes frente a exposição a patógenos.

Para contribuir com esta questão, foi conduzido um estudo translacional utilizando cultura de células imunes humanas e também células imunes da minhoca californiana vermelha *Eisenia fétida*. A escolha deste modelo para a condução de estudos nutrigenômicos foi baseada nos seguintes critérios: (1) a minhoca é utilizada há muito tempo em estudos de ecotoxicidade; (2) tem baixo custo e facilidade de manutenção; (3) possui um sistema imune inato altamente eficiente, com células imunes similares a dos seres humanos, e que são facilmente obtidas, já que, na presença de um agente tóxico a minhoca extruda o fluido celômico para fora do corpo (HOMA, 2018).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito genômico de extratos aquosos de bebidas ricas na matriz cafeína/catequinas na modulação de marcadores oxidativos e inflamatórios associados a imunossenescência através de uma abordagem translacional que inclui ensaios com células imunes humanas e de *Eisenia fetida*.

### 1.1.2 Objetivos específicos

Caracterizar e comparar quimicamente extratos de bebidas cafeinadas obtidos como habitualmente são processados e consumidos pela população considerando a concentração de polifenóis totais, alcalóides, taninos, cafeína (Caf), teobromina (The) e catequinas totais (Cat);



Avaliar o impacto de extratos de bebidas cafeinadas obtidos como habitualmente são processados e consumidos pela população em:

(1) Indicadores de imunocompetência de células imunes humanas e do modelo experimental *E. fetida* expostas a leveduras inativadas determinando o efeito:

- Na viabilidade e proliferação celular;
- Em marcadores oxidativos;
- Na formação de NETs;
- Na modulação de citocinas da resposta inflamatórias em CMSPs humanos.

(2) Em marcadores oxidativos associados a ativação inflamatória de CMSPs obtidas de adultos com e sem ingestão aguda destas bebidas, e das principais moléculas bioativas presentes na matriz química (cafeína (Caf), teobromina (The) e catequina (Cat), em concentrações equivalentes àquelas encontradas em cada extrato cafeinado, na expressão do gene antioxidante.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ENVELHECIMENTO DEMOGRÁFICO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2005), o envelhecimento populacional é, sem dúvida, um dos maiores triunfos da humanidade, onde o número absoluto e a proporção de pessoas idosas estão aumentando na maioria dos países, com um aumento contínuo da expectativa de vida. Porém, também é considerado um dos maiores desafios a ser enfrentado pela sociedade, pois muitos idosos ainda vivem com uma ou mais comorbidades (World Health Organization, 2005). Atualmente, aproximadamente 962 milhões de indivíduos têm mais de 60 anos, número projetado para subir para 1,4 bilhão em 2030 e para 2,1 bilhões em 2050. Além disso, estima-se que o número de pessoas com 80 anos ou mais vai aumentar dos atuais 137 milhões para 425 milhões até 2050 (UNITED NATIONS SECRETARIAT, 2017). No Brasil, projeções indicam que até 2040, aproximadamente 23,8% da população brasileira será idosa, na proporção de quase 153 idosos para cada 100 jovens (MIRANDA; MENDES; SILVA, 2016).

O aumento no número de idosos tem como consequência direta a elevação na prevalência de disfunções, DCNTs e de indivíduos que apresentam um estado de fragilidade acentuada (CRUZ, 2015; MIRANDA; MENDES; SILVA, 2016). A fragilidade é a uma das questões mais problemáticas do envelhecimento da população. É um estado de vulnerabilidade em consequência do declínio cumulativo em muitos sistemas fisiológicos durante a vida. Esse declínio esgota as reservas homeostáticas e promove mudanças desproporcionais no estado de saúde, até mesmo em eventos estressores menores (CLEGG et al., 2013).

Estas condições clínicas verificadas ao longo do envelhecimento são situações que podem ser prevenidas e controladas a partir de estratégias que envolvam programas sociais e de saúde. Entretanto, a construção destas estratégias demanda pesquisas que analisem a fundo os mecanismos causais do envelhecimento biológico e seus fatores aceleradores e desaceleradores. Neste sentido, a pesquisa apresentada aqui buscou entender de que modo as bebidas cafeinadas café, chás verde e preto, guaraná e erva-mate poderiam ser úteis no controle destes mecanismos.

## 2.2 ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO: O PAPEL DO SISTEMA IMUNE

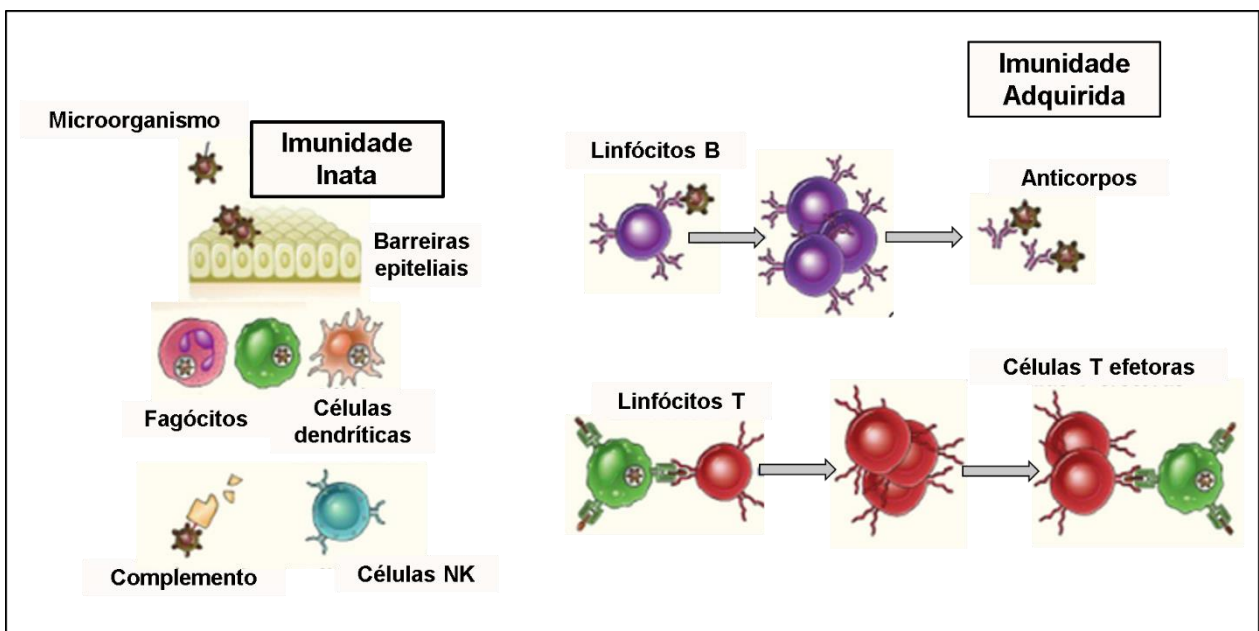
De modo geral, o envelhecimento biológico pode ser entendido como uma série de processos que refletem todas as mudanças ocorridas ao longo da vida de maneira progressiva e intrínseca, diretamente associadas à diminuição das funções fisiológicas e celulares, ao aumento na incidência de numerosas doenças degenerativas e a diminuição da capacidade de responder ao estresse (BECKMAN; AMES, 1998). Apesar da grande quantidade de estudos sobre o tema, os mecanismos que levam ao envelhecimento biológico ainda não são totalmente compreendidos. O que se sabe é que este fenômeno não pode ser interrompido ou revertido, embora possa ser acelerado ou desacelerado através da interação de fatores genéticos e ambientais (CRUZ, 2015).

Uma característica comum do envelhecimento é o declínio da função imune, denominada imunossenescência, que aumenta a mortalidade relacionada a DCNTs e doenças autoimunes (PAWELEC, 2018). O sistema imune, de forma geral, consiste em uma complexa rede de células, tecidos e órgãos que atuam para manter a homeostase do organismo de diversas formas, tanto contra invasores externos como bactérias, fungos, vírus, protozoários, entre outros, quanto para depurar agentes tóxicos, como espécies reativas, ou mesmo atuando em processos de cicatrização ou regeneração de tecidos lesados. Apesar de agir de modo coordenado, o sistema imune é, funcionalmente, dividido em dois tipos: o sistema imune inato ou natural e o sistema imune adquirido, também chamado de adaptativo (CRUVINEL et al., 2010) (Figura 1).

A imunidade inata é considerada a primeira linha de defesa do organismo, atuando através de uma resposta não específica, rápida e limitada a estímulos estranhos ao organismo ou lesões. A imunidade inata envolve diversas barreiras físicas, químicas e biológicas, células e moléculas, que já estão presentes em todos os indivíduos desde o seu nascimento (ABBAS; LICHTMANN; PILLAI, 2014). Por outro lado, a imunidade adquirida envolve um conjunto de células e processos que são desencadeados pela presença de moléculas produzidas por agentes estranhos ao organismo (antígenos) que irão aumentar a eficiência do sistema imune quando o organismo voltar a entrar em contato com os mesmos. Existem dois tipos de imunidade adquirida, a imunidade humoral e a celular. A imunidade humoral é mediada por moléculas denominadas anticorpos, que

estão presentes no sangue e em secreções mucosas que são produzidas pelos linfócitos B. Por outro lado, a imunidade celular é mediada por linfócitos T que promovem a destruição de microrganismos ou a morte de células infectadas pelos mesmos. Este tipo de resposta imune é desencadeado, principalmente, por infecções virais e bacterianas (ABBAS; LICHTMANN; PILLAI, 2014).

Figura 1: Visão geral das células que participam da imunidade inata e da imunidade adaptativa.



Fonte: Adaptado de ABBAS; LICHTMANN; PILLAI (2014).

A resposta imune é conduzida por órgãos primários e secundários e por células específicas. Nos órgãos primários ocorre a produção de linfócitos (linfopoese) incluindo o timo, medula óssea, e fígado. Os órgãos secundários estão relacionados com a resposta imune adquirida já que possuem aglomerados de células relacionadas a esta função. Este é o caso do baço e dos linfonodos (ABBAS; LICHTMANN; PILLAI, 2014).

As células imunológicas presentes no sangue e no tecido conjuntivo de diversos órgãos são produzidas a partir de células-tronco precursoras existentes na medula óssea vermelha. Estas células são provenientes de duas linhagens: a mieloide, que dá origem aos granulócitos (eosinófilos, neutrófilos e basófilos), fagócitos mononucleares (monócitos/macrófagos), células dendríticas e mastócitos. A linhagem linfoide dá origem

aos linfócitos B e T e as células *natural Killer* (ABBAS; LICHTMANN; PILLAI, 2014; CRUVINEL et al., 2010).

### **2.2.1 Resposta inflamatória mediada por macrófagos**

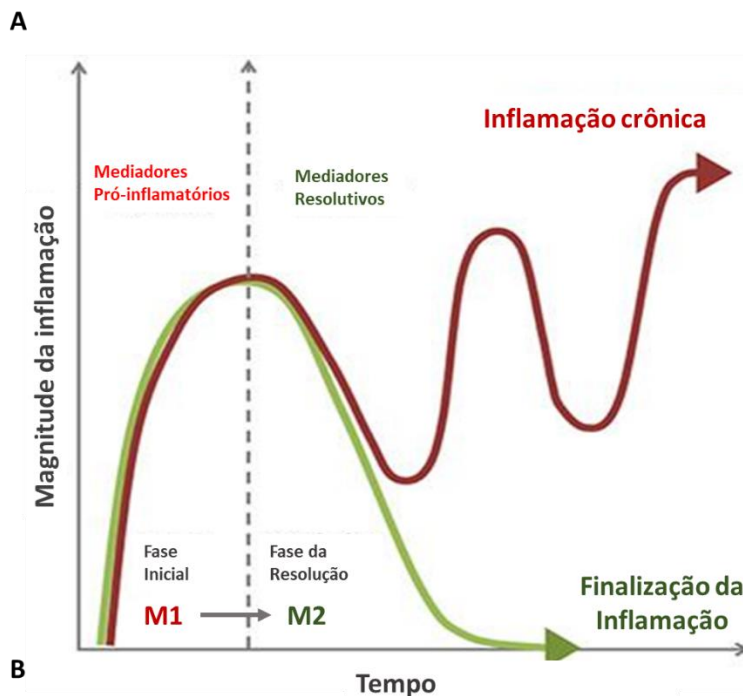
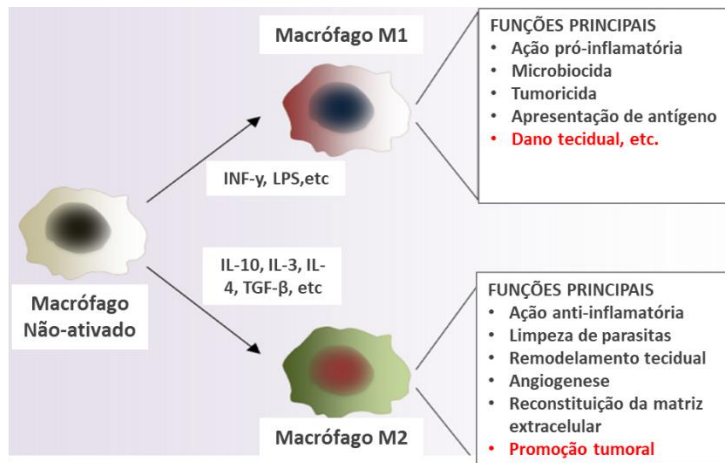
Os macrófagos são considerados células cruciais para o desencadeamento da resposta imune inata. Quando imaturos, são identificados como monócitos presentes no sangue. Entretanto, existem macrófagos distribuídos em muitos órgãos corporais, principalmente no tecido conjuntivo. Macrófagos possuem diversas e relevantes funções: neutralizam, ingerem e destroem antígenos. Além disto, processam estes elementos estranhos e apresentam os mesmos aos linfócitos T com o objetivo de ativar o sistema imune adquirido. Os macrófagos também realizam a fagocitose de fragmentos e tecidos lesados. De fato, na presença de antígenos microbianos ou de fragmentos teciduais originários de trauma, grande cirurgia ou queimadura, choque prolongado ou hipotermia, os macrófagos são ativados desencadeando um processo conhecido como inflamação ou resposta inflamatória (ABBAS; LICHTMANN; PILLAI, 2014).

Em geral, a inflamação é um evento agudo que tem início imediato e perdura por um período curto de tempo. Em termos fisiológicos, os principais sinais da resposta inflamatória aguda envolvem: resposta vascular, como a vasodilatação, que gera rubor e calor; permeabilidade vascular, que gera edema e aumenta a pressão tissular causando dor (tensão e compressão das terminações nervosas); subsequente perda de função do órgão ou tecido atingido. Esta resposta é mediada por macrófagos e por outras células do sangue, em especial neutrófilos, basófilos, mastócitos e eosinófilos, e também por células dendríticas e epiteliais (ABBAS; LICHTMANN; PILLAI, 2014; BANCHEREAU et al., 2000).

Macrófagos são células altamente plásticas e dinâmicas que apresentam diferenças funcionais segundo o seu estado de ativação ou inativação inflamatória. Por este motivo, são subdivididos em dois grupos sem alterações citomorfológicas aparentes: macrófagos clássicos M1 e macrófagos alternativos M2 (Figura 2). Na fase de repouso,

os macrófagos apresentam concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias, em especial Interleucina 1-beta ( $IL-1\beta$ ) e outras como a interleucina 6 ( $IL-6$ ), o fator de transcrição tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ). No momento em que são ativados pela detecção de microorganismos ou elevada concentração de fragmentos teciduais, por ação da enzima caspase 1, estas citocinas tornam-se ativas e são liberadas para a matriz extracelular (SAQIB et al. 2018).

Figura 2: Papel dos macrófagos na resposta inflamatória contra agentes microbianos ou lesões físicas.



(A) Principais funções relacionadas a polarização de macrófagos M1 e M2 na inflamação. Fonte: Modificado de Saqib et al. (2018); (B) Gráfico ilustrativo do papel dos macrófagos M1-M2 na inflamação aguda e na inflamação crônica. Nesta última o estado pró-inflamatório se mantém induzindo a destruição e disfunções teciduais. Fonte: modificado de Barnig et al. (2019).

Os macrófagos M1 se tornam capazes de realizar fagocitose, apresentando atividade antimicrobiana e tumoricida, matar microrganismos intracelulares, e fagocitar restos teciduais. Também produzem níveis elevados de espécies reativas (ERs), em especial óxido nítrico (ON), que serão importantes para a sua atividade fagocítica. Os macrófagos M1 também desencadeiam a apresentação de antígenos para o sistema imune adquirido. A fase na qual o macrófago está polarizado como M1 é considerada, portanto, uma fase “destrutiva”, na qual o que importa é defender o organismo do ataque de agentes externos e retirar agentes tóxicos ou tecidos necrosados. Por este motivo, esta fase é geralmente, intensa e curta. Em geral, a polarização dos macrófagos no fenótipo M1 desencadeia, de modo subsequente, a transformação fenotípica destes macrófagos em M2. Por sua vez, os macrófagos M2 passam a produzir citocinas anti-inflamatórias, em especial a interleucina 10 (IL-10), que irão inibir a produção continuada de citocinas pró-inflamatórias ativas. Este processo atenua os processos fagocíticos e desencadeia processos cicatriciais via ativação de células-tronco adultas presentes no tecido infectado e/ou lesado. A plasticidade da transição de macrófagos pode ser atribuída às complexas vias de sinalização associadas aos dois fenótipos (MOSSER; EDWARDS, 2008; CLASSEN; LLOBERAS; CELADA, 2009; WYNN; CHAWLA, POLLARD, 2013).

### **2.2.2 Imunossenescência e o fenômeno “*inflammaging*”**

Ao longo do desenvolvimento biológico, o sistema imune sofre modificações de modo continuado. Como esperado, a maior eficiência imunológica ocorre na puberdade e no período reprodutivo havendo, posteriormente, um declínio gradual. O

envelhecimento afeta elementos imunológicos críticos incluindo a função de células imunes, órgãos linfoides e fatores circulantes no sangue, em especial citocinas, fenômeno conhecido como imunossenescência (NIKOLICH-ŽUGICH, 2018).

A imunossenescência é considerada como um processo natural que está associado, principalmente, a alteração na resposta inflamatória e diminuição na eficiência antimicrobiana, tanto relacionada a resposta inata de macrófagos e neutrófilos quanto a resposta do sistema imune adquirido. Neste último, a imunossenescência diminui a capacidade do organismo de reconhecer e de se proteger contra novos antígenos aos quais o organismo é exposto (FÜLÖP et al., 2016). O equilíbrio na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias também sofre alterações com o processo de envelhecimento, possivelmente por quebra da homeostase de sua produção e liberação (TONET; NOBREGA, 2008). Esse desequilíbrio pode contribuir para a ocorrência de estados inflamatórios crônicos de baixo grau, onde os macrófagos são ativados, mas permanecem durante longo tempo com o fenótipo M1 causando destruição e disfunção tecidual (Figura 2B) (CLASSEN; LLOBERAS; CELADA, 2009).

Como sabemos, a inflamação é considerada um dos sete pilares do envelhecimento, juntamente com a modificação da adaptação ao estresse, epigenética, dano macromolecular, metabolismo, proteostase e células-tronco e regeneração (KENNEDY et al., 2014). Evidências têm sugerido que estados de inflamação crônica de baixo grau estão associados a uma grande quantidade de DCNTs prevalentes nos idosos incluindo obesidade (AHECHU et al., 2018), aterosclerose (GROH et al., 2018), doenças cardiovasculares (GOLIA et al., 2014), doenças neurodegenerativas (ATIENZA; ZIONTZ; CANTERO, 2018), distúrbios osteomusculares (ROBINSON et al., 2016) e enfermidades autoimunes (MÜLLER et al., 2019). Este tipo de inflamação também é observado em idosos frágeis. A fragilidade que afeta principalmente os idosos longevos, ou seja, acima de 80 anos, e é descrita como um distúrbio de múltiplos sistemas fisiológicos inter-relacionados, sendo caracterizada por sedentarismo, fadiga, perda de peso e massa magra e baixa força muscular. Na fragilidade, o acúmulo de danos celulares, acompanhado pelo comprometimento dos mecanismos de reparo, síntese e controle do DNA, detecção e liberação de proteínas e lipídios danificados, eliminação de organelas e células anormais, e defesa contra lesões leva à perda da homeostase dos sistemas



múltiplos e ao declínio fisiológico, via inflamação crônica de baixo grau (PANSARASA et al., 2019).

A partir das evidências sugerindo a relação entre inflamação crônica e DNCTs prevalentes nos idosos, surge o termo *inflammaging*. Originalmente o fenômeno *inflammaging* foi definido como uma diminuição geral na capacidade de lidar com diferentes estressores, acompanhados por um aumento progressivo no status pró-inflamatório do organismo, especialmente níveis elevados ou ligeiramente acima do limite de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  no soro de indivíduos idosos (FRANCESCHI et al., 2000; CEVENINI; MONTI; FRANCESCHI, 2013). Em consequência se estabelece uma inflamação sistêmica persistente, de baixo grau, estéril e sistêmica (AKHA, 2018; FRANCESCHI et al., 2000; CONTE et al., 2020).

Estudos complementares têm propostos múltiplos mecanismos pelo qual o fenômeno "*inflammaging*" poderia ser estabelecido, considerando que a inflamação crônica seria um fator acelerador do envelhecimento biológico e do desenvolvimento de DCNTs relacionadas a idade. Entre tais mecanismos, destaca-se a hipótese do estresse oxidativo (Figura 3) que levaria a um desbalanço na produção de moléculas oxidativas e antioxidantes. Esta condição, por sua vez, aumentaria a oxidação de macromoléculas, em especial lipídios, causando lipoperoxidação, carbonilação de proteínas e danos no DNA, causando disfunção em organelas chave para a função e sobrevivência celular, como é o caso das mitocôndrias. Assim, o estresse oxidativo parece induzir disfunção mitocondrial que, além de produzir menor quantidade de energia utilizada pelas células, também contribui na geração de uma maior concentração de EROs, em especial o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), catalisado pela enzima NADPH oxidase, e do ON, catalisado pela enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), nas reações de fosforilação oxidativa (DELA CRUZ; KANG, 2018; ZUO et al., 2019).

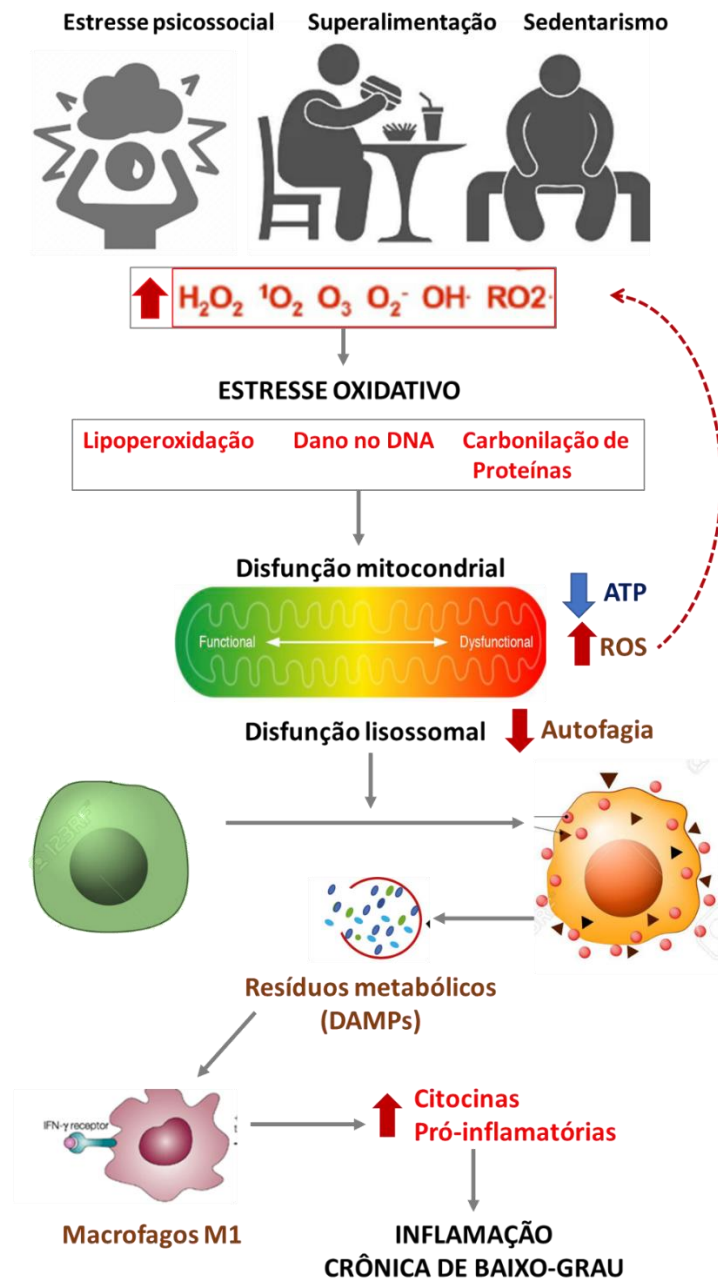
Como moléculas oxidadas não são funcionais, as células teriam que digerir uma maior quantidade de resíduos metabólicos. Entretanto, com o estresse oxidativo também poderia haver geração de disfunção lisossomal. Lisossomos são organelas responsáveis pela metabolização de produtos não desejáveis por um processo conhecido como autofagia. A ocorrência de disfunção lisossomal poderia induzir acúmulo de resíduos metabólicos na matriz extracelular que seriam os principais responsáveis pela ativação

dos macrófagos. Como a produção dos resíduos metabólicos ocorre de forma continuada, a mesma contribuiria para o estabelecimento de processos de inflamação crônica de baixo-grau, destruição e disfunção tecidual. Os resíduos metabólicos que podem gerar processos de inflamação crônica de baixo grau são conhecidos como padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (DELA CRUZ; KANG, 2018).

Uma vez instalada, a inflamação crônica contribuiria para a aceleração do encurtamento telomérico e, assim, para a entrada das células em estados de senescência replicativa. (FOUGÈRE et al., 2016).

Por sua vez, o estresse oxidativo pode ser gerado por diversos fatores genéticos (BRESCIANI; CRUZ; GONZÁLEZ-GALLEGO, 2015) e fatores ambientais relacionados com o estilo de vida dos indivíduos, com destaque ao sedentarismo, superalimentação, e adição de drogas, em especial o tabaco, e também pela exposição a fatores estressores psicossociais (KANDOLA; BOWMAN; BIRCH-MACHIN, 2015; PELUSO et al., 2018). Entretanto, ao contrário, fatores como uma dieta rica em frutos e vegetais parecem ter um efeito antagônico, desacelerando os processos de envelhecimento biológico, via atenuação dos estados inflamatórios crônicos.

**Figura 3:** Síntese dos principais processos que levam ao estabelecimento da inflamação crônica de baixo grau que induz o fenômeno “*inflammaging*”.



Fonte: A autora.

### 2.3 EFICIÊNCIA DA RESPOSTA ANTIPATOGÊNICA NO ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO

Além de ser capaz de causar estados de inflamação crônica, a imunossenescência impacta diretamente na eficiência da resposta corporal a infecção por patógenos. De fato, o risco de infecções nosocomiais aumenta com a idade, independentemente da duração gasta nos serviços de saúde (KLINE; BOWDISH, 2016). Apesar dos avanços na área do controle antimicrobiano, as infecções associadas aos cuidados de saúde devido a microrganismos resistentes a antimicrobianos são hoje um dos desafios mais importantes para a medicina moderna. Estimativas apontam até 2.609.911 novos casos anuais deste tipo de infecção em países da União Europeia. As mortes atribuíveis a microrganismos resistentes a antimicrobianos foram estimadas em 33.110 por ano, sendo que um número considerável destes óbitos ocorre em idosos (CASSINI et al. 2016).

Evidências têm descrito que o envelhecimento biológico prejudica a imunidade, especialmente em relação a infecções virais respiratórias. Este contexto pode explicar o fato de que, na atual pandemia de COVID-19, resultante da infecção pelo vírus SARS-CoV-2, a ocorrência de pneumonia aguda venha sendo bastante prevalente nos idosos. De fato, o envelhecimento geralmente leva a uma imunidade inata exagerada, particularmente na forma de acúmulo elevado de neutrófilos. Esta situação pode prejudicar a resposta imune aos vírus, já que estudos têm relatado que pacientes com COVID-19 que foram a óbito exibiam cerca de duas vezes mais neutrofilia do que os sobreviventes. Esta resposta neutrofílica exacerbada poderia contribuir para a chamada síndrome da tempestade das citocinas que é característica da severidade da doença (CHEN et al., 2019; CHEN et al., 2020). Por outro lado, o envelhecimento também pode causar estados de neutropenia e anemia nos idosos (BARCELLINI; FATTIZZO, 2018).

Com a idade, a produção de leucócitos pela medula óssea se altera, com aumento da quantidade de células de origem mieloide e diminuição da quantidade de linfócitos T virgens. Acredita-se que esta redução ocorra em consequência da involução tímica e expansão clonal de células T específicas associadas ao controle de infecções virais crônicas. A menor taxa de produção de linfócitos T virgens e alterações na produção de

linfócitos B acabam diminuindo a capacidade do sistema imune em responder a novas infecções ou mesmo a vacinas (DORRINGTON; BOWDISH, 2013).

Outro mecanismo que pode apresentar alterações relevantes ao longo do envelhecimento diz respeito a função dos neutrófilos. Neutrófilos são células fagocíticas do sistema imune inato que possuem um papel central na defesa imunológica. A compreensão do papel dos neutrófilos na eliminação de patógenos, regulação imunológica e patologia de doenças avançou dramaticamente nos últimos anos.

Neutrófilos respondem a insultos infecciosos por meio de uma série de mecanismos de defesa, incluindo fagocitose de microorganismos e degranulação tóxica de proteínas granulares citoplasmáticas que são microbicidas. Em 1996, pesquisadores japoneses relataram que neutrófilos humanos, quando tratados com o mitógeno forbol 12-miristato 13-acetato (FMA), morriam mais rapidamente e de uma maneira diferente daquela observada quando ocorria necrose ou apoptose celular (TAKEI et al., 1996). Entretanto, foi somente em 2004 que essa morte diferencial foi descrita em detalhes, estando associada a formação de grandes estruturas tridimensionais formadas por fibras de cromatina compostas por DNA e histonas associadas a proteínas e peptídeos granulares e citoplasmáticos (BRINKMANN et al., 2004).

Esses complexos de conteúdos de neutrófilos nucleares e citoplasmáticos misturados, liberados no espaço extracelular, foram denominados *Neutrophils extracellular traps* (NETs). O processo de formação de NETs geralmente induz a morte dos neutrófilos, sendo esta nova forma de morte celular foi denominada NETose (STEINBERG; GRINSTEIN, 2007). Atualmente já foram identificados os principais componentes proteicos das NETs, além das histonas e do DNA, incluindo a enzima elastase neutrofílica (EN), a mieloperoxidase (MPO), catepsina G, leucócito proteinase 3 (PR3), lactoferrina, gelatinase, lisozima C, calprotectina, neutrófilos defensinas e catelicidinas. Entretanto, também foi identificado um processo de NETose em que ocorre a liberação de DNA e outros componentes proteicos para o exterior do neutrófilo, sem que ocorra morte celular. Este processo é denominado NETose vital (BRINKMANN, 2018).

Ainda que os neutrófilos sejam células transcricionalmente ativas, a maior parte de seu DNA é transcricionalmente inativa e se encontra condensada no interior do núcleo,

sob a forma de heterocromatina. É a partir deste material genético que são formadas as NETs, cuja estrutura química é composta por fitas extracelulares de DNA descondensado (desenrolado), associadas com histonas e outras proteínas granulares produzidas pelos neutrófilos. Um estudo mostrou que NETs podem ser geradas *in vitro* após a estimulação de neutrófilos isolados com moléculas pró-inflamatórias, como é o caso do lipopolissarideo (LPS), componentes de bactérias gram-negativas, entre outros. Quando ocorre ativação do neutrófilo para a formação de NETs ocorre, então, descondensação da heterocromatina mediada pela enzima peptidil arginina desaminase 4 (PAD4) que enfraquece a ligação entre o DNA e as histonas. Além da PAD4, a enzima NE é considerada essencial para a NETose, já que esta enzima cliva as histonas durante a formação das NETs. Por sua vez, a ligação com o agente indutor das NETs induz um edema celular e nuclear que promove, a seguir, a liberação do conteúdo do DNA da membrana nuclear. Este DNA, juntamente com outros componentes proteicos, é expelido através da formação de microvesículas deixando intacta a superfície da membrana citoplasmática do neutrófilo. Assim, a NETose vital permite a movimentação dos neutrófilos desnucleados, os quais apresentam sinais de vitalidade e ainda são capazes de fagocitar bactérias (SOLLBERGER; TILLEY; ZYCHLINSKY, 2018).

A liberação de DNA e proteínas para o exterior celular forma redes que lembram teias de aranha. Tanto os grânulos de neutrófilos, que são ricos em proteínas antibacterianas e peptídeos, quanto o DNA podem atuar como moléculas microbicidas. Evidências sugerem que a liberação da cromatina extracelular pode ter evoluído para defender os organismos eucarióticos contra a infecção, e sua liberação tem pelo menos três funções: captura e morte de micróbios, amplificação das respostas imunológicas e indução da coagulação (SØRENSEN; BORREGAARD, 2016; SOLLBERGER; TILLEY; ZYCHLINSKY, 2018). NETs têm a capacidade de se ligar a bactérias gram-positivas, bem como gram-negativas, e sua atividade antimicrobiana é direta, matando os patógenos, e também indireta, evitando a propagação dos mesmos (HALVERSON et al., 2015).

Por outro lado, estudos têm mostrado que tanto a formação descontrolada de NETs quanto a insuficiência na sua formação podem ter consequências graves na saúde. Deficiências na quantidade ou função dos neutrófilos tornam o hospedeiro suscetível a

uma ampla gama de patógenos potencialmente fatais, destacando a importância crítica dos neutrófilos na homeostase do sistema imunológico (BRINKMANN, 2018).

## 2.4 MODULAÇÃO DA IMUNOSSENESCÊNCIA PELA DIETA

Até o presente momento, vários biomarcadores circulantes, como proteína C reativa (PCR) e fibrinogênio, ou celulares, como contagem de glóbulos brancos e plaquetas, têm sido usados para avaliar a ocorrência de inflamação de baixo grau em um indivíduo. Estes marcadores estão diretamente associados ao aumento nas concentrações de citocinas inflamatórias liberadas, especialmente, por macrófagos (CALDER et al., 2017).

Assim, existem estudos que têm descrito a associação entre os níveis circulantes de determinadas citocinas pró-inflamatórias com disfunções e DCNTs em idosos. Por exemplo, em idosos, níveis altos da IL-6 foram positivamente associados com maior risco de mortalidade (FERRUCCI et al., 1999) e negativamente associados com a força de preensão manual e força dos membros inferiores (VIRTUOSO et al., 2014). Por outro lado, níveis elevados da IL-1 $\beta$  foram associados a morbidades como a angina, insuficiência cardíaca congestiva e dislipidemias (DI IORIO et al., 2003). Um índice de inflamação proposto por Varadhan et al. (2014), que incluía a IL-6 e o receptor solúvel do TNF- $\alpha$ , previu o risco de mortalidade para todas as causas em indivíduos participantes do *Cardiovascular Health Study*, que foram acompanhados durante 10 anos. Da mesma forma, um estudo longitudinal em uma coorte de 1018 idosos italianos demonstrou que níveis circulantes mais altos de mediadores relacionados à inflamação, como IL-6, foram associados a ocorrência de um maior número de DCNTs como hipertensão, diabetes, doenças cardiovasculares, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), câncer, mal de Parkinson, doença articular dos membros inferiores, anemia, fratura de quadril e comprometimento cognitivo (FABBRI et al., 2015). Uma meta análise que incluiu 32 estudos transversais e 23.910 indivíduos idosos, mostrou que a fragilidade e a pré-fragilidade também estavam associadas a níveis séricos significativamente mais altos de moléculas inflamatórias, incluindo PCR e IL-6 (SOYSAL et al., 2016).

Por outro lado, um número significativo de publicações sugere que a inflamação de baixo grau associada ao envelhecimento poderia ser mitigada por fatores ambientais, em especial a dieta. Existe uma quantidade substancial de evidências sugerindo que muitos alimentos, nutrientes e componentes não nutricionais modulam a inflamação de forma aguda e crônica (CALDER et al., 2017; BONACCIO et al., 2017; PANSARASA et al., 2019; WEYH; KRÜGER; STRASSER, 2020).

No entanto, estudos dietéticos têm sido tipicamente limitados a medir um pequeno número de marcadores sanguíneos de inflamação, geralmente em jejum, podendo não refletir de forma fidedigna à inflamação que ocorre nos compartimentos teciduais ou o que poderia estar realmente acontecendo em resposta a desafios inflamatórios. Isso apresenta uma limitação significativa ao entendimento das interações entre dieta, nutriente e inflamação (MINIHANE et al., 2015). Por outro lado, estudos sobre o efeito do consumo de plantas, frutas e legumes sugerem que estes alimentos possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias relevantes a saúde humana. Em grande parte, pela presença de compostos secundários, em especial polifenóis (NATSUME, 2018).

#### **2.4.1 O papel antioxidante e anti-inflamatório dos polifenóis**

Evidências consolidadas não deixam dúvidas de que os polifenóis possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias que podem atenuar o fenômeno *inflammaging* e a inflamação crônica de baixo grau associada a diversos tipos de DCNTs prevalentes nos idosos (MISHRA; GAUTAM; SHARMA, 2013; HUSSAIN et al., 2016; JOSEPH; EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2016; NATSUME, 2018).

Polifenóis são moléculas bioativas caracterizadas pela presença de unidades estruturais fenólicas sendo amplamente distribuídos em plantas, como frutas e legumes. Atualmente alguns polifenóis sintéticos e semissintéticos também já são produzidos e comercializados. Nas plantas, fazem parte do metabolismo secundário e estão envolvidos no sistema de defesa, protegendo os vegetais da radiação ultravioleta, que causa danos no DNA, e do ataque de patógenos (HUSSAIN et al., 2016). Estas moléculas



são caracterizadas pelo gosto amargo, adstringência e propriedades antioxidantes. Segundo a revisão conduzida por Hussain et al (2016), já foram identificados mais de 8000 compostos fenólicos presentes nas plantas. Segundo suas características químicas, os polifenóis podem ser divididos em numerosas classes e subclasses. Entre elas se encontram os flavonoides, como flavonóis e flavonas, as isoflavonas, antocianidinas, o resveratrol, a curcumina, taninos, lignanas e os ácidos fenólicos. A classe que possui maior interesse dietético é a dos flavonoides, caracterizada pelo seu esqueleto com três anéis e ácidos fenólicos. Alguns ácidos fenólicos são bastante comuns em diversos vegetais consumidos por seres humanos incluindo o ácido gálico, o ácido cafeíco e o ácido clorogênico (MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019).

A atividade antioxidante dos polifenóis está relacionada a sua capacidade de reagir com EROs e transformá-las em água. Polifenóis também atuam suprimindo a formação de EROs através da inibição de enzimas envolvidas na sua produção ou através da indução do aumento dos níveis de enzimas antioxidantes das células (MISHRA; GAUTAM; SHARMA, 2013). Por exemplo, a interação de polifenóis com a enzima óxido nítrico sintetase (do inglês, NOS) pode modular a produção do ON. Alguns polifenóis têm a capacidade de inibir a enzima xantina oxidase, considerada uma molécula chave na produção de EROs. Este é o caso da quercetina, silibina e luteolina. Flavonóides também podem reduzir a atividade da enzima peroxidase e, assim, inibir a liberação de algumas EROs produzidas pelos neutrófilos (HUSSAIN et al., 2016; MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019).

Em relação a inflamação, estudos têm sugerido que polifenóis possuem atividades anti-inflamatórias, em especial a quercetina, rutina, morina, hesperitina, hesperidina, apigenina e diversos tipos de catequinas (HUSSAIN et al., 2016; JOSEPH; EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2016; NATSUME, 2018). No caso, muitos polifenóis podem afetar sistemas enzimáticos e de sinalização que estão envolvidos com os processos inflamatórios, como é o caso da tirosina e das serina-treonina proteína quinases. Estas enzimas participam dos processos que ativam a proliferação das células T, a ativação dos linfócitos B, a produção de citocinas em macrófagos M1. Outros estudos também mostraram que alguns polifenóis podem regular a atividade inflamatória das células através da modulação do metabolismo do ácido araquidônico (fosfolipase A2 e

ciclooxigenase - COX) e do metabolismo da arginina (NOS) (WELTON et al., 1986; LAUGHTON et al, 1991; YAHFOUFI et al., 2018).

Evidências também têm sugerido que alimentos ricos em determinados tipos de polifenóis possuem importante papel na modulação da inflamação crônica de baixo grau associadas a diversas DCNTs. Entre os alimentos mais populares se destacam o chá verde, principalmente por possuir na sua composição epigallocatequina-galato (EGCG) (OHISHI et al., 2016); o vinho tinto, por possuir na sua composição resveratrol (WEISKIRCHEN; WEISKIRCHEN, 2016), a maçã por ser rica em quercetina, entre outras frutas (ZHAO et al., 2017).

#### **2.4.2 Potenciais variáveis interferentes nas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias dos polifenóis**

O programa *Phenol-explorer databank*, desenvolvido por institutos de pesquisas europeus com apoio financeiro do Instituto Nacional do Câncer da França, e das empresas Unilever, Danone e Nestlé, compila informações a partir de mais de 1300 publicações científicas, indica a presença de 500 polifenóis diferentes em mais de 400 alimentos (NEVEU, 2010; ROTHWELL et al., 2012; ROTHWELL et al., 2013). Entretanto, podem existir variáveis intervenientes que incidem sobre o potencial efeito antioxidante e anti-inflamatório dos polifenóis. A seguir, algumas delas são comentadas.

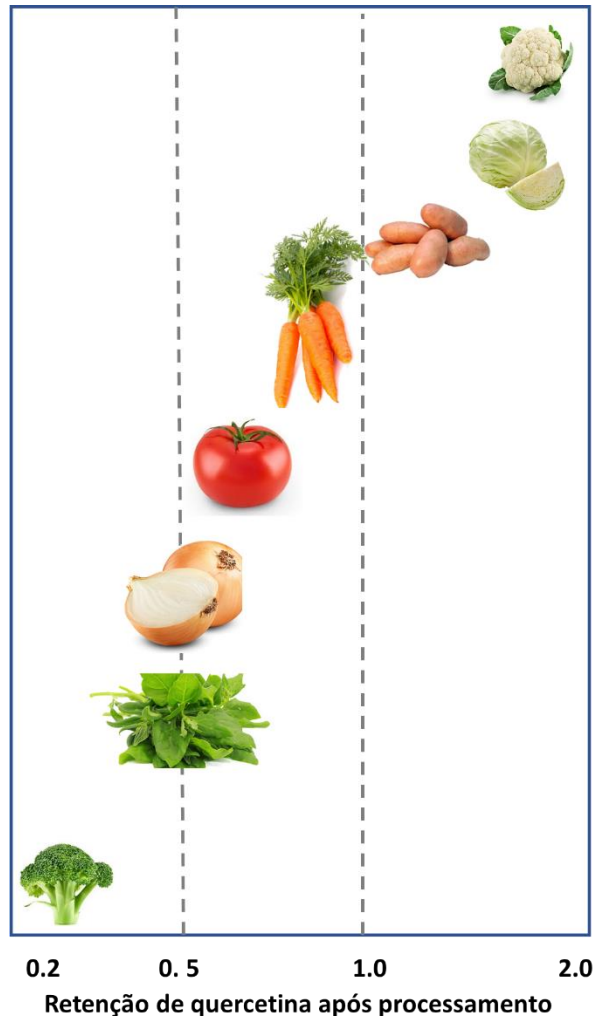
- Biodisponibilidade dos polifenóis: cerca de 90% dos polifenóis não são absorvidos no intestino delgado e atingem o cólon onde são metabolizados em compostos de baixo peso molecular pela microbiota intestinal. Geralmente, estes metabólitos têm uma taxa de absorção mais alta do que seus compostos originais (KAWABATA; YOSHIOKA; TERAO, 2019) e, muitos deles têm efeitos bioativos e são os principais responsáveis pelos efeitos biológicos sistêmicos dos polifenóis, como as propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras (CORTÉS-MARTÍN et al., 2020).

- Efeito do processamento dos alimentos na retenção dos polifenóis: uma outra variável interveniente importante diz respeito ao efeito do processamento dos alimentos na retenção de polifenóis. Um estudo conduzido por Rothwell et al (2013) avaliou os

efeitos do processamento em 161 polifenóis que haviam sido previamente compilados no *Phenol-Explorer databank*. Para avaliar este efeito, os autores utilizaram o cálculo de um índice de retenção, no qual a concentração de polifenóis quantificada no alimento processado era dividida pela concentração de polifenóis quantificada no alimento cru. Este valor era corrigido pela multiplicação do valor do peso total do alimento processado dividido pelo peso total do alimento cru. Valores de retenção maiores que 1 indicariam maior concentração de polifenóis nos alimentos processados do que os encontrados nos alimentos crus, enquanto valores abaixo de 1 indicariam perda de polifenóis ao longo do processamento do alimento. Segundo o estudo a maior parte dos alimentos após o processamento apresentou diminuição na retenção de polifenóis. Entretanto, é importante comentar que a perda de um determinado tipo de polifenol não foi similar em diversos tipos de alimentos (ROTHWELL et al.,2013).

Considerando, como exemplo, a quercetina, que é um polifenol presente em diversos tipos de alimento e que possui ação antioxidante e anti-inflamatória bem conhecida (LI et al., 2016), é sabido que no cozimento da couve-flor e do repolho a concentração deste polifenol aumenta, enquanto na cebola e brócolis, a retenção da quercetina é menor do que 50% quando comparada com o alimento cru. A Figura 4, baseada nos resultados descritos por Rothwell et al. (2013), apresenta o impacto do processamento de alimentos comumente utilizados na dieta ocidental sobre a retenção da quercetina.

Figura 4: Representação gráfica da perda do polifenol quercetina após o processamento dos alimentos (cozimento) através do índice de retenção calculado.



Índices maiores que 1 indicam que não houve perda do polifenol após processamento. Valores abaixo de 1 indicam perda do polifenol após processamento do alimento.

Fonte: Adaptado de Rothwell et al (2013).

- Interação de polifenóis com outras classes de moléculas bioativas em especial xantinas: muitas plantas ricas em polifenóis utilizadas como alimentos ou bebidas possuem matrizes químicas complexas que apresentam outras moléculas bioativas que podem interagir, ampliando ou diminuindo sua potencial ação anti-inflamatória. Além disso, determinados tipos de plantas compartilham matrizes químicas que apresentam similaridades relacionadas com a presença de polifenóis e de outros grupos químicos.

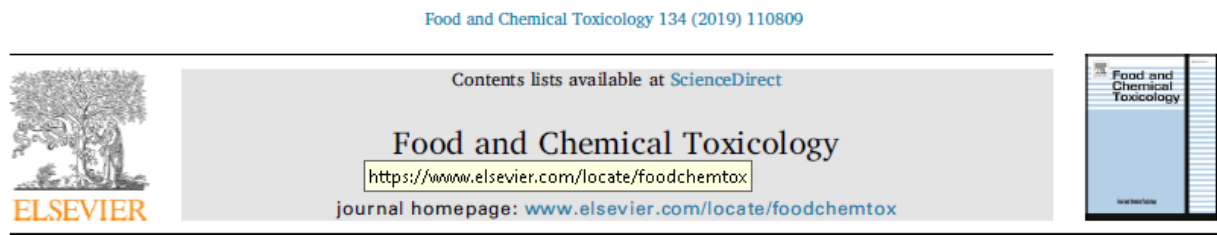
Este é o caso das bebidas amplamente consumidas no mundo que possuem cafeína e polifenóis na sua composição como café, chá verde e chá preto, erva-mate (consumida sob a forma de chá, chimarrão ou tererê) e guaraná (consumido sob a forma de sapó pelas populações ribeirinhas amazônicas). O sapó consiste em uma bebida obtida pela mistura de meia colher de café de pó de semente de guaraná torrada e moída, diluída em um copo de água gelada ou a temperatura ambiente, podendo ser adoçada, preferencialmente, com mel (SCHIMPL et al., 2013).

A cafeína é uma metilxantina do tipo purina (1,3,7 trimetilxantina) que, em bebidas como o café, está associada a presença de outros polifenóis, em especial o ácido clorogênico. Evidências epidemiológicas sugerem que o consumo de cafeína reduz o risco de várias doenças neurodegenerativas. Uma hipótese promissora para explicar este efeito protetor é o fato de a cafeína controlar a resposta neuroinflamatória mediada por células da micróglia, fato associado à maioria das condições neurodegenerativas (MADEIRA et al., 2017). Também tem sido descrito que o guaraná, que possui alta concentração de cafeína e catequinas na sua composição, apresenta ação anti-inflamatória importante (KREWER et al., 2014). O mesmo ocorre com a erva-mate, que apresenta cafeína e polifenóis na sua matriz química, e possui efeitos antioxidante e anti-inflamatório bem estabelecidos (BRACESCO et al., 2011). Ainda que o teor de cafeína seja bem menor do que o encontrado no guaraná e café, o chá verde possui uma matriz composta por cafeína-catequina, do qual se inclui o EGCG que tem uma forte ação antioxidante e anti-inflamatória (OHISHI et al., 2016).

Investigações utilizando a matriz química cafeína-catequinas encontrada nestas bebidas indicaram que pode haver a modulação dos níveis de citocinas inflamatórias produzidas em macrófagos expostos a determinados fármacos psiquiátricos. No caso do lítio, que tem ação anti-inflamatória reconhecida, esta matriz intensificou esta propriedade (BARBISAN et al., 2017). Por outro lado, em macrófagos expostos ao antipsicótico ziprasidona, que causa ativação destas células e aumento na produção das citocinas pró inflamatórias, o tratamento com a matriz química pura de cafeína e catequina atenuou este efeito (DUARTE et al., 2018).

### 3 ARTIGO ACEITO

Os resultados das primeiras investigações realizadas para este trabalho estão apresentados no artigo intitulado “*Caffeinated beverages contribute to a more efficient inflammatory response: Evidence from human and earthworm immune cells*”, publicado na revista “*Food and Chemical Toxicology*”, FI: 6.023, no ano de 2019 (Anexo 1).



#### Caffeinated beverages contribute to a more efficient inflammatory response: Evidence from human and earthworm immune cells



Audrei de Oliveira Alves<sup>a,b</sup>, Grazielle Castagna Cezimbra Weis<sup>a,c</sup>, Taís Cristina Unfer<sup>d</sup>, Charles Elias Assmann<sup>a,e</sup>, Fernanda Barbisan<sup>a,f</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>a</sup>, Bruna Chitolina<sup>a</sup>, Thiago Duarte<sup>a</sup>, Euler Esteves Ribeiro-Filho<sup>g</sup>, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte<sup>b</sup>, Aline Boligon<sup>a</sup>, Eduardo Vélez-Martin<sup>h</sup>, Taís Vidal Palma<sup>e</sup>, Cinthia Melazzo de Andrade<sup>e</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>a,b,f,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, SE, Brazil

<sup>e</sup> Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>f</sup> Programa de Pós-Graduação em Gerontologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

<sup>g</sup> Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Universidade Federal do Amazonas, AM, Brazil

<sup>h</sup> Illex Consultoria Científica, Porto Alegre, RS, Brazil

#### 4 MANUSCRITO SUBMETIDO

Os resultados obtidos com as análises do protocolo misto *in vitro/in vivo* estão apresentados no manuscrito intitulado: “*Hot water caffeinated beverages share modulatory effects on nitric oxide and antioxidant enzyme genes in human blood cells*”, submetido a revista “*Nutrition*”, FI: 4.008, no ano de 2021.

#### Hot water caffeinated beverages share modulatory effects on nitric oxide and antioxidant enzyme genes in human blood cells

Audrei de Oliveira Alves<sup>a#</sup>, Adriano Lenz<sup>b#</sup>, Taís Cristina Unfer<sup>c</sup>, Grazielle Cezimbra Weiss<sup>d</sup>, Beatriz da Silva Rosa Bonadiman<sup>e</sup>, Charles Elias Assmann<sup>b</sup>, Euler Esteves Ribeiro<sup>f</sup>, Cibele Ferreira Teixeira<sup>a</sup>, Eduardo Vélez Martin<sup>f</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>f</sup>, Vanusa do Nascimento<sup>f</sup>, Fernanda Barbisan<sup>g</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>a,g\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 21, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Farmácia, Campus Universitário Prof. Antônio Garcia Filho, Rua Padre Alvares Pitangueira, nº 258, Centro, 49.400-000, Lagarto, SE, Brazil.

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>e</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Campus Universitário, MIP - Córrego Grande 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>f</sup> Fundação Universidade Aberta da Terceira Idade, Universidade do Estado do Amazonas, Av. Carvalho Leal, 1777, Cachoeirinha, 69065-001, Manaus, AM, Brazil.

<sup>g</sup> Programa de Pós-Graduação em Gerontologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil. Telephone: 55-55-3220 8163.

\* Corresponding author

# The two authors contributed equally to the present study

## ABSTRACT

**Objective:** Inflammatory activation triggers high levels of reactive oxygen species (ROS), such as nitric oxide (NO), and decreases antioxidant enzymes that destroy pathogens and clean injured tissues. Previous evidence suggests that caffeinated beverages are habitually consumed by the human population and share anti-inflammatory effects. They may have a common reducing action because of the suppressive effects on oxidative metabolism. **Methods:** To test this hypothesis, we conducted two complementary protocols. First, we conducted an analysis of 24 h cultures of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from blood samples collected before (BI) and after (AI) ingestion of each caffeinated drink (coffee = CO; black tea = BT; green tea = GT, yerba mate = YM, and guarana GU) by 24 healthy adults who consumed beverages prepared by extraction of 10 g in 100 ml hot water for 10 min). Cellular viability and oxidative marker levels were quantified and compared among BI and AI 24 h PBMC



cultures. The second was an *in vitro* analysis of the caffeinated extracts and isolated bioactive molecules, caffeine (Caf), theobromine (The), and catechin (Cat), which were detected in the chemical matrix of these beverages on antioxidant gene modulation in 6 h PBMC cultures. **Results:** AI PBMCs showed lower cellular viability and NO levels than BI PBMC cultures. The extracts exhibited high similarity in the downregulation of antioxidant genes. **Conclusion:** Caffeinated beverages share biochemical and molecular mechanisms that induce a decrease in oxidative molecules as a causal mechanism involved in their anti-inflammatory action.

**Keywords:** coffee, black tea, green tea, guarana, yerba mate, nutrigenomics, antioxidant genes

## Introduction

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is a bioactive molecule commonly consumed worldwide that is found in different types of beverages, such as coffee (CO, *Coffea arabica*), black and green teas (BT and GT, respectively, *Camellia sinensis*), yerba mate (YM, *Ilex paraguariensis*), and guarana (GU, *Paullinia cupana*). The gastrointestinal absorption of caffeine is rapid, and after 45 min, 99% has been absorbed by the body [1]. The beneficial effects of habitual intake of caffeinated beverages have been described in the literature and primarily involve preventing and controlling chronic non-transmissible diseases (CNTDs), such as cardiovascular morbidities, neurodegenerative diseases, and cancer. The potential causal mechanism of this action involves the attenuation of a low-grade inflammatory process that contributes to the pathogenesis of CNTDs [1,2,3,4,5,6].

A previous study by Alves et al. [8] used caffeinated extracts (CO, GT, BT, YM, and GU) processed using hot water and short-term extraction. They found a lower *in vitro* expression of genes and proteins of pro-inflammatory cytokines in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Moreover, the investigation revealed that caffeinated beverages could increase the efficiency of granulocyte cells involved in acute inflammatory responses by improving the production of neutrophil extracellular traps in humans and earthworms.

This effect is common to all caffeinated drinks but may involve differential modulation of oxidative metabolism. Alves et al. [8] showed that all extracts presented antioxidant capacity based on non-cellular assays. Therefore, these extracts could include

scavenger reactive oxygen species (ROS), mainly nitric oxide (NO), which is a relevant molecule in the inflammatory activation processes triggered by macrophages and other immune cells [9,10,11]. Moreover, the anti-inflammatory effect of caffeinated extracts could involve the modulation of the endogenous antioxidant enzymes, namely superoxide dismutases copper/zinc-dependent (*SOD1*) and manganese-dependent (*SOD2*), catalase (*CAT*), and glutathione peroxidase (*GPX*) [9,10,11].

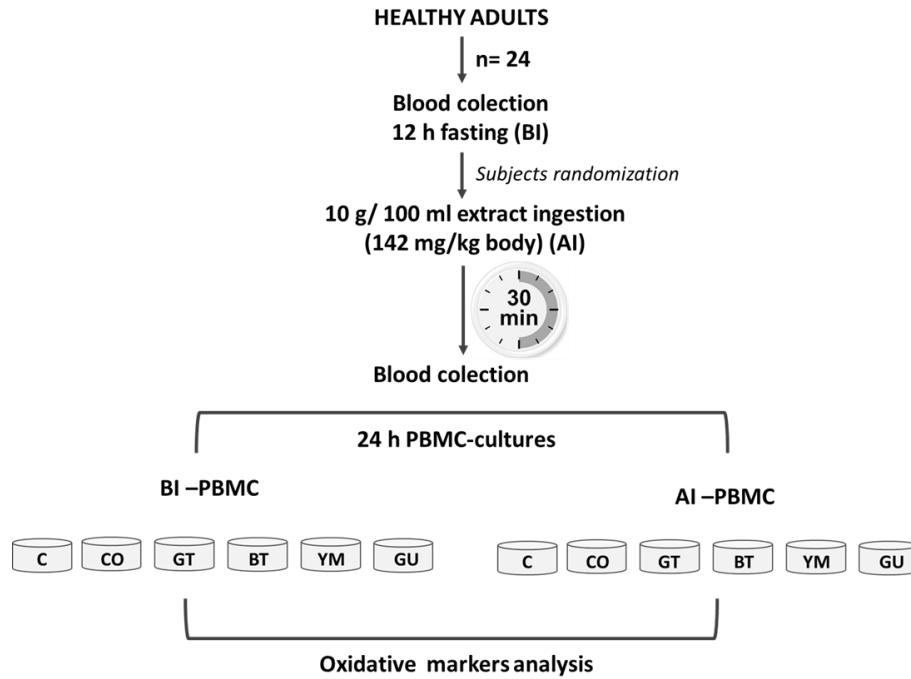
This study tested this hypothesis by using two complementary protocols. The first protocol compared the effects of caffeinated extract intake by healthy adults on the modulation of cell viability and oxidative markers associated with the inflammatory response in PBMCs. Cells were cultured for 24 h under standardized conditions. The second protocol evaluated the effects of caffeine supplements on gene modulation of antioxidant enzymes using the same human PBMC cultures as in the previous experiment. The contribution of isolated caffeine (Caf), theobromine (The), and catechin (Cat) bioactive molecules at the concentrations in each caffeinated extract on antioxidant gene expression was also determined.

## **Materials and Methods**

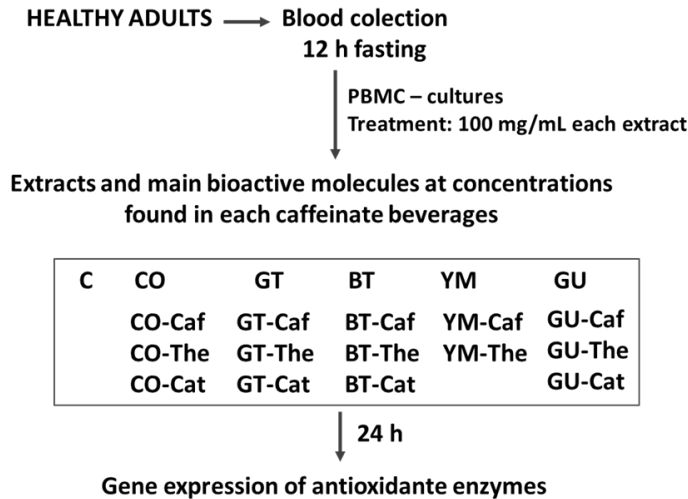
### **General experimental design**

This study is part of a research project investigating the role of the Amazonian Diet on health and aging factors, as approved by the Federal University of Santa Maria (UFSM) Ethical Board (CAE 0146.0.243.000–07). All participants signed a consent form, and the research followed the ethical principles of the Declaration of Helsinki and its later amendments. In both protocols, PBMCs were obtained from 24 healthy young adults ( $25.1 \pm 6.9$ , minimum age = 19, maximum = 48 years old; 16 females, eight males) were used. All volunteers were non-smokers without previous CNTDs and were willing to donate blood more than once to perform laboratory tests. Figure 1 presents a summary of the two protocols. Because it is difficult to conduct studies on nutrigenomic effects in humans, we opted to perform this analysis of human PBMCs *in vitro* exposed to caffeinated beverages.

**PROTOCOL 1**



**PROTOCOL 2**



**Figure 1** General experimental design: Protocol 1 evaluated the effects of caffeinated beverages on human oxidative markers in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in 24 h cell cultures obtained before intake (BI) and after intake (AI) of the extracts. Each extract was processed with 10 g of crude power diluted in 100 mL hot water (90°C) for 10 min and filtered. Protocol 2 used PBMCs exposed *in vitro* to similar caffeinated beverage concentrations (extraction conditions: 10 g/100 mL water, 90°C for 10 min) to evaluate antioxidant

gene expression. The nutrigenomic effects of the concentration of the three main bioactive molecules present in each extract were evaluated. C = control; CO = coffee; GT = green tea; BT = black tea; YM = yerba mate; GU = guarana. Caf = caffeine THE = theobromine; Cat = catechin. YM extract presented non-detectable Cat concentrations [8]; consequently, it was not evaluated. The identification of the molecules from each extract was denoted as CO-Caf, CO-The, CO-Cat, GT-Caf, GT-The, GT-Cat, BT-Caf, BT-The, BT-Cat, YM-Caf, YM-The, GU-Caf, GU-The, and GU-Cat. Because non-significant levels of Cat were detected in CO and YM extracts, only Caf and The are reported for these extracts.

PBMCs were obtained from blood samples before intake (BI) and after intake (AI) and placed under standardized cell culture conditions. The levels of cellular mortality and oxidative markers [NO, ROS, lipoperoxidation (LPX), and protein carbonylation (PCarb)] were quantified in PBMCs cultured for 24 h. In the second protocol, PBMCs obtained from the same volunteers were used to produce 24 h cell cultures supplemented with 10 µg/mL of each caffeinated beverage extract. This concentration was chosen by Alves et al. [8], who found antioxidants, a genoprotective capacity, and anti-inflammatory effects of this concentration on human PBMC cultures.

## **Chemicals**

All chemicals used in this study were purchased from Gibco® Life Technologies, Inc. (Grand Island, NY, USA) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

## Caffeinated extracts preparation and chemical characteristics

Each caffeinated extract was produced using the same suppliers as previously described in Alves et al. [8]. Extract preparations followed the same process. Briefly, each plant powder was infused in 1000 mL of filtered hot water ( $90 \pm 5$  °C) for 10 min. The extracts were then filtered through a Whatman No. 8 paper and placed in amber glass containers until the volunteers ingested them. The main bioactive molecules found in each extract were previously quantified by Alves et al. [8], and the data are presented in Table 1.

**Table 1** Concentrations of the major isolated active molecules in hot water caffeinated beverages, as previously described by Alves et al. [8]

Bioactive molecules	Caffeinate-beverages ( $\mu\text{g}/0.002$ g extract)				
	CO	GT	BT	YM	GU
Caffeine (CAF)	147	24	124	90	223
Theobromine (THE)	0.6	2	11	20	3.6
Catechin (CAT)	-	0.9	0.8	-	19
Total Polyphenols*	403.2	525.1	652.7	510.9	452.7

\* determined by gallic acid equivalents (GAE)

## **Blood collection and PBMC culture conditions**

In both experimental protocols, 20 mL blood samples were collected by venipuncture using heparinized vials and transferred to tubes with Ficoll Histopaque (1:1). Each volunteer performed the procedure. The tubes were centrifuged for 30 min at  $252 \times g$ , and the PBMCs were positioned at the interface. PBMCs were centrifuged again (10 min at 2000 rpm) and transferred to a culture medium containing 1 mL RPMI 1640 (Gibco) with 10% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin. Culture tubes for each subject were prepared with a final concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL. The PBMC cultures were incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> [7]. In the first protocol, BI and AI-PBMCs were maintained under standardized conditions for 24 h and processed by analysis of viability and oxidative markers. In the second protocol, PBMCs were exposed to 10 µg/mL of each extract or by isolated Caf, The, and Cat molecules. After 6 h, RNA from PBMC cultures was extracted and used to quantify the gene expression of antioxidant enzymes. Protocol two was performed using a similar method with BI blood samples to produce 6 h PBMC cultures supplemented with different extracts and bioactive molecules. RNA was extracted and used to quantify gene expression using qRT-PCR.

## **Viability assay and oxidative markers assays**



The main consequence of oxidative stress is decreased cell viability caused by necrosis or the induction of apoptosis. Therefore, the cellular mortality of BI and AI-PBMCs was quantified using double-stranded DNA (dsDNA) fragments and the PicoGreen® dsDNA kit. This assay indicates cell death and ruptures with the release of dsDNA fragments into the supernatant [9]. Fluorescence was determined at an excitation wavelength of 480 nm and emission wavelength of 520 nm to determine cell mortality. Four oxidative markers were evaluated in PBMCs: nitric oxide (NO) was quantified by the modified Griess spectrophotometric method [10]. The ROS levels were determined by dichlorofluorescein acetate fluorimetric assay (DCF-DA) with fluorescence measured at an excitation of 485 nm and an emission of 520 nm [11]. Lipoperoxidation was spectrophotometrically estimated by the formation of thiobarbituric acid reactive substances using the assay described by Jentzsch et al. [12] and protein carbonylation using the method of Levine [13].

### **mRNA expression analysis by quantitative QT-PCR assay**

In the second protocol, antioxidant gene expression was measured by PCR assay in PBMCs 6 h cell cultures with a similar approach to that of Alves et al. [8]. Total RNA was isolated from each sample using the TRIzol reagent. RNA yield was measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer. First-strand cDNA was synthesized from total RNA (2 µg) using a First-Strand cDNA Synthesis Kit and oligo dT primers. Q-PCR was

performed in a 10  $\mu$ L reaction that contained 0.5  $\mu$ L of the cDNA and 1 $\times$  KAPA SYBR<sup>®</sup> FAST Universal qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA) using the following PCR parameters: 95°C for 3 min, 40 cycles at 95°C for 10 s, 60°C for 30 s, and a melting curve at 65°C to 95°C in 0.5°C increments for 5 s. The expression level of the *beta-actin* gene was used as an internal control. Relative expression was calculated using the comparative Ct method and was expressed as a fold expression compared to the control. The specific primer pairs of antioxidant enzyme genes used in this study were: *SOD1* (Forward: 3'GCACACTGGTGGTCCATGAA5' and Reverse: 3'CACCACAAGCCAAACGACTT5'); *SOD2* (Forward: 3' GCCCTGGAA CCTCACATCAA5' and Reverse 3'GGTACTTCTCCTCGGTGACGTT5'); *CAT* (Forward: 3' GATAGCCTTCGACCCAAGCA5' and Reverse: 3' ATGGCGGT GAGTGTCAGGAT5'); *GPX* (Forward: 3' GGTTTTTCATCTATGAGGGTG TTTCC5', and Reverse: - 3'GCCTTGGTCTGGCAGAGACT5').

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were conducted using the Graph Pad Prism 5 software and R Software Free Package [14]. The Student's t-test was used to compare cellular viability and oxidative markers between BI PBMC and AI PBMC cultures. Variables lacking a normal distribution were evaluated by the Kolmogorov-Smirnov test after being log-transformed. These data were also normalized to the percentage of the negative control,

and the comparison among extracts was conducted using a one-way analysis of variance followed by the *post hoc* Tukey test. The same statistical analyses were applied to the gene expression comparison among caffeinated extracts tested here and when PBMC cultures were supplemented with isolated bioactive molecules (Caf, The, and Cat). We used an ordination analysis to visualize similarity patterns among treatments based on changes in antioxidant gene expression. A principal coordinates analysis with Euclidean distance was performed with the MULTIV 3.55 statistical package [14]. Data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation. All p-values were two-tailed. The alpha value was set to  $< 0.05$  to define statistical significance.

## Results

The first protocol compared some oxidative markers of PBMCs obtained from blood samples of healthy adults with BI and AI caffeinated extracts (Table 2). The cellular mortality levels were similar in 24 h cultures obtained from blood without the intake of caffeinated extracts (C-group) by volunteers. However, PBMC cultures from blood samples obtained from AI extracts showed lower cellular mortality and NO levels than BI cultures. However, except for 24 h PBMC cultures from adults whose GT intake had a lowering effect on ROS levels, the others did not exhibit significant differences for this oxidative marker. Considerable data variation was observed when PCarb and LPX were analyzed, with no significant differences between BI and AI PBMC cultures.

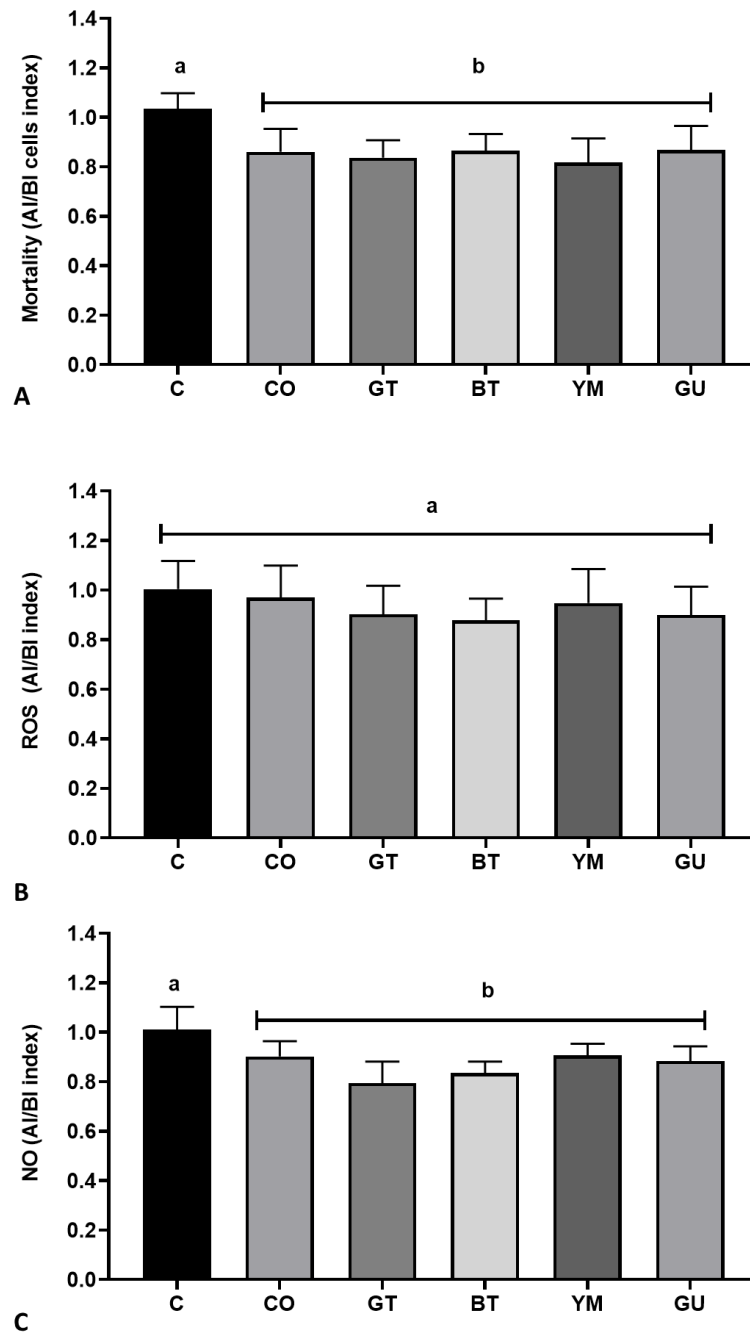
An additional comparison of cellular mortality, ROS, and NO among PBMC cultures supplemented with different extracts was performed using data normalized as % of the AI C group (Figure 2). All 24 h AI PBMC cultures produced decreased levels of these markers compared with those of BI-PBMC cultures. Unfortunately, it was impossible to perform this analysis for PCarb and TBAR markers because of the considerable variation found within these variables.

**Table 2** Comparison between 24 h peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures before (BI) and after (AI) intake of caffeinated extracts

Markers	Extracts	B	AI	<i>p</i>
		Mean ± SD	Mean ± SD	
Cell mortality# (µg/mL)	C	538,51 ± 112,26	583.55 ± 124.02	0.123
	CO	576.15 ± 79.95	519.48 ± 59.57	0.007
	GT	565.84 ± 98.51	513.27 ± 90.97	0.01
	BT	531.28 ± 110.25	466.61 ± 82.60	0.003
	YM	565.84 ± 98.51	469.68 ± 103.16	0.01
	GU	574.03 ± 68.78	512.91 ± 89.46	0.001
ROS (µgmol/mL)	C	650.84 ± 119.38	622.25 ± 50.08	0.279
	CO	631.21 ± 141.84	635.82 ± 102.88	0.165
	GT	517.69 ± 220.68	479.61 ± 77.22	0.047
	BT	680.91 ± 54.61	627.16 ± 69.48	0.882
	YM	678.82 ± 48.36	661.95 ± 110.00	0.636
	GU	597.44 ± 55.85	567.59 ± 59.92	0.132

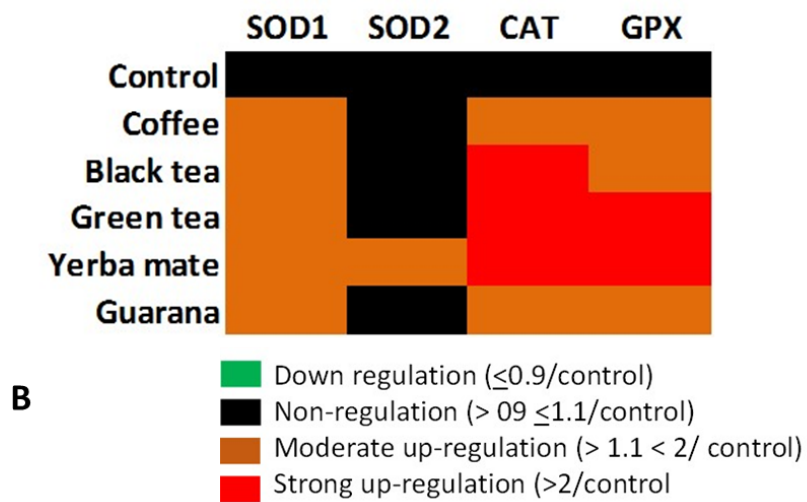
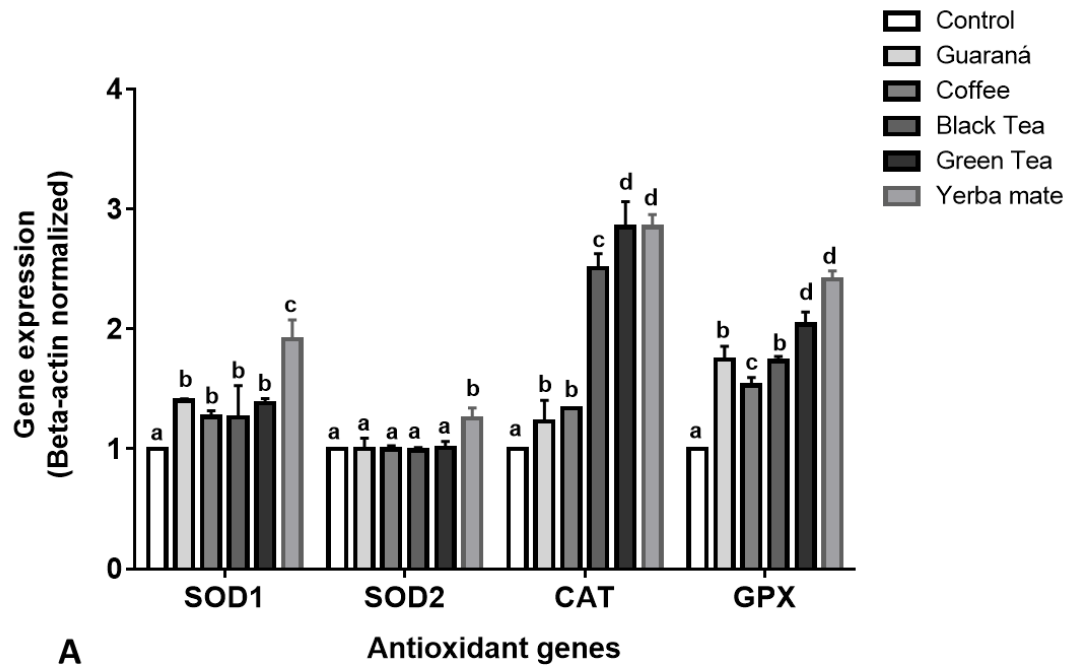
NO ( $\mu\text{M}$ )	C	0.070 $\pm$ 0.005	0.067 $\pm$ 0.004	0.156
	CO	0.084 $\pm$ 0.014	0.071 $\pm$ 0.015	0.028
	GT	0.076 $\pm$ 0.004	0.063 $\pm$ 0.003	0.0001
	BT	0.075 $\pm$ 0.002	0.067 $\pm$ 0.006	0.0001
	YM	0.080 $\pm$ 0.008	0.074 $\pm$ 0.008	0.01
	GU	0.075 $\pm$ 0.004	0.066 $\pm$ 0.005	0.0001
PCarb (nmol/mg protein)	C	0.143 $\pm$ 0.020	0.127 $\pm$ 0.018	0.086
	CO	0.104 $\pm$ 0.077	0.012 $\pm$ 0.092	0.471
	GT	0.150 $\pm$ 0.069	0.135 $\pm$ 0.013	0.702
	BT	0.118 $\pm$ 0.053	0.134 $\pm$ 0.007	0.538
	YM	0.118 $\pm$ 0.022	0.100 $\pm$ 0.023	0.149
	GU	0.101 $\pm$ 0.055	0.105 $\pm$ 0.064	0.892
LPX (mol/MDA)	C	2.022 $\pm$ 1.231	2.31 $\pm$ 1.426	0.737
	CO	0.975 $\pm$ 1.420	0.118 $\pm$ 0.316	0.687
	GT	1.962 $\pm$ 1.232	3.251 $\pm$ 0.353	0.805
	BT	2.415 $\pm$ 1.58	2.700 $\pm$ 1.511	0.998
	YM	1.165 $\pm$ 1.07	1.419 $\pm$ 1.025	0.239
	GU	2.182 $\pm$ 0.832	3.078 $\pm$ 1.851	0.308

SD= standard deviation; C = control; CO= coffee; GT = Green tea; BT= Black tea; YM= Yerba mate; GU = Guaraná. # Cell mortality was estimated by quantification of extracellular double-stranded DNA fragments using a fluorescent DNA Picogreen Kit; ROS = reactive oxygen species, which were quantitated using the DCFH-DA fluorimetric assay; NO = nitric oxide; PCarb = protein carbonylation; LPX = lipoperoxidation, as estimated by the TBARS assay. PBMC cultures obtained from healthy adult blood samples before and after hot water caffeinated extracts as are commonly consumed by the population were compared by Student T test, and  $p \leq 0.05$  was considered significant.



**Figure 2** Comparison of viability and oxidative markers between human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures performed before (BI) and after (AI) intake of 100 mL caffeinated beverages. Data are presented as an index of each variable calculated by the following equation: Index = AI/BI. Values below 1 indicate decreasing levels, whereas values above 1 indicate increasing levels. As expected, the controls presented an index of approximately 1 because no additional variables were included in the two cultures.

Statistical comparison was performed using a one-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test. Different letters indicate significant differences at  $p \leq 0.05$  between groups.



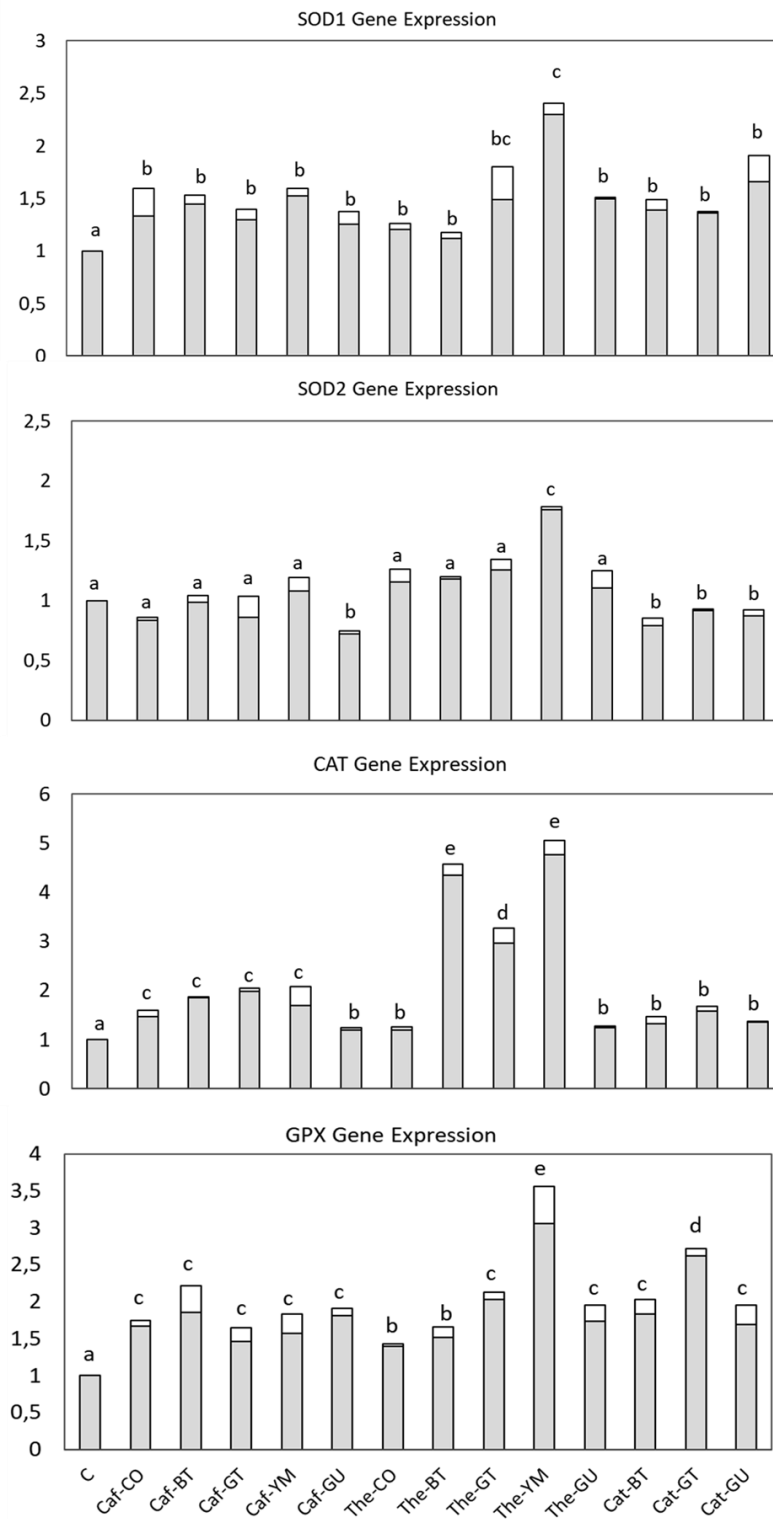
**Figure 3** Nutrigenomic effects of hot aqueous extracts of caffeinated beverages at a concentration of 10 µg/mL for each extract in 24 h PBMC cultures. (A) Levels of antioxidant enzyme genes (*SOD* = superoxide dismutase; *GPX* = glutathione peroxidase; *CAT* = catalase). Treatments: control (C); coffee (CO), black tea (BT), green tea (GT), yerba mate (YM), and guarana (GU). Gene expression was determined by qRT-PCR, and results were normalized using the  $\beta$ -actin gene as the control. Different letters indicate significant differences determined by a one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test ( $p \leq 0.05$ ).

The second protocol showed that caffeinated beverages triggered differential expression of antioxidant enzymes in PBMCs. All extracts upregulated *SOD1*, *CAT*, and *GPX* genes. However, the intensity of gene expression was dependent on the extract (Figure 3). Cultures exposed to YM extract presented higher *SOD1* and *GPX* gene expression levels than did the other extracts. The *CAT* gene expression level was also higher for GB and YM extracts. The YM extract was the only one that triggered upregulation of the *SOD2* gene, which has antioxidant activity in the mitochondria.

At this stage of the study, the contribution of the three isolated bioactive molecules (Caf, The, and Cat) on the modulation of the expression of antioxidant enzyme genes was evaluated (Figure 4). The two isolated xanthines (Caf and The) triggered a genomic effect on PBMC modulation of the antioxidant enzyme genes. Caf-supplementation at all concentrations tested upregulated the expression of *SOD1*, *CAT*, and *GPX* genes. However, Caf-supplementation did not induce significant alterations in the *SOD2* gene expression, except when PBMC cultures were exposed to 223 µg/mL Caf, which was estimated to occur in the GU extract. At this higher Caf concentration, the expression of the *SOD2* gene was downregulated compared to the control PBMC cultures. Supplementation with The-exposure triggered the upregulation of all antioxidant enzyme genes. However, the Caf and The extracts exhibited antagonistic effects on the

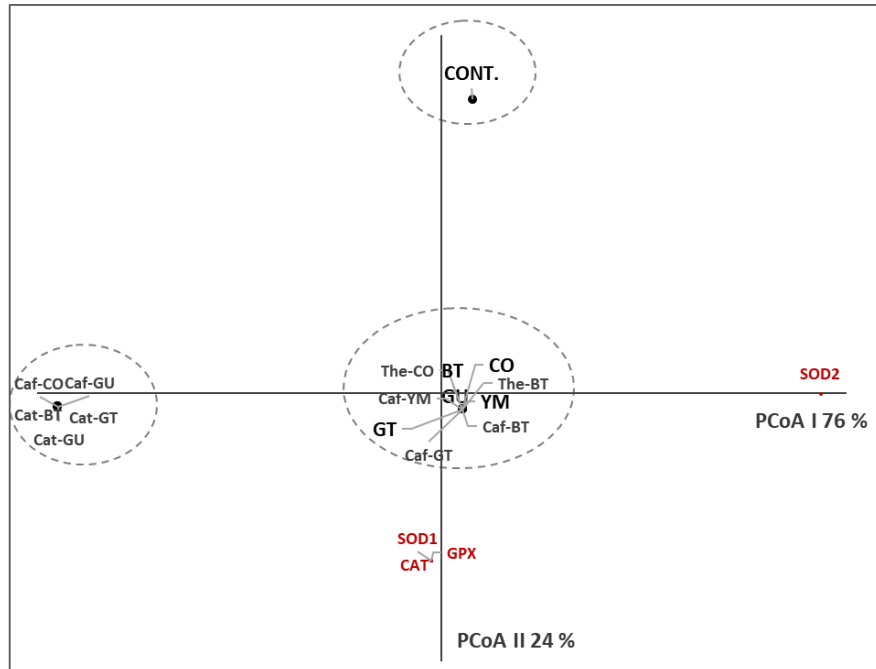


expression of the *SOD2* gene. Polyphenol Cat upregulated the *SOD1*, *CAT*, and *GPX* genes and downregulated the *SOD2* gene at all concentrations tested.

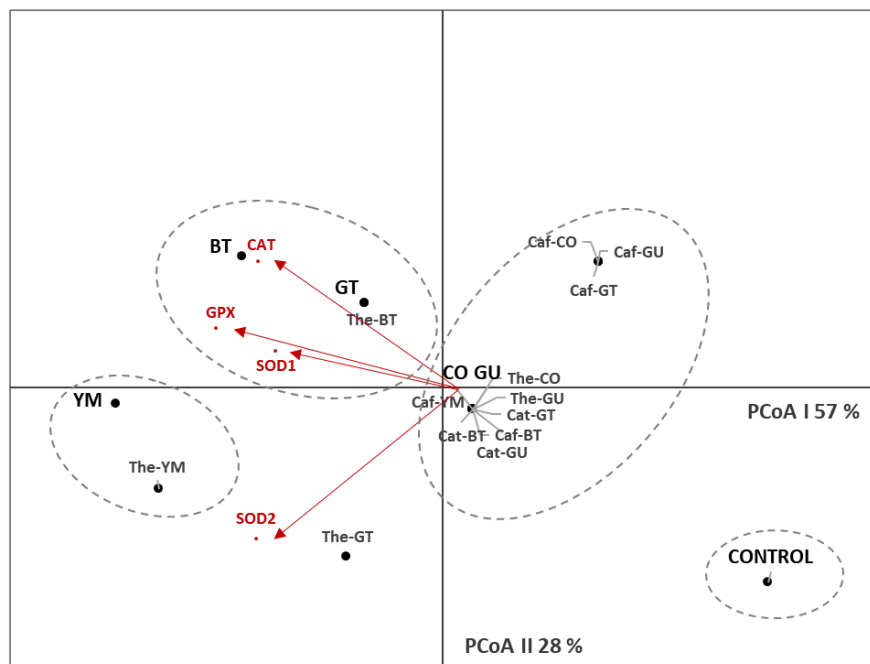


**Figure 4** Nutrigenomic effects of the three major isolated bioactive molecules in the caffeinated beverage extracts (1  $\mu\text{g}/0.02$  g dry extract) on antioxidant genes in 24 h human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures treated with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of each extract. (A) Caffeine (Caf) effects on antioxidant genes; (B)

theobromine (The) effects on antioxidant genes; (C) catechin (Caf) effects on antioxidant genes. *SOD* = superoxide dismutase; *GPX* = glutathione peroxidase; *CAT* = catalase. Gene expression was determined by qRT-PCR, and the results were normalized using the  $\beta$ -actin gene. Different letters indicate significant differences determined by a one-way analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* test ( $p \leq 0.05$ ).



A



B

**Figure 5** Correspondence analysis for identification of potential similarities in gene expression of antioxidant enzymes (*SOD* = superoxide dismutase 1 and 2; *CAT* = catalase; *GPX* = glutathione peroxidase) among five caffeinated extracts (CO = coffee; BT= black tea; GT= green tea; YM = yerba mate; GU = guarana) and isolated bioactive molecules (Caffeine = Caf; Theobromine = The, and Cat= catechin). (A) Presence of genomic effects on gene expression without considering the intensity; (B) genomic effects considering the intensity and direction of gene modulation (upregulation or downregulation).

Two correspondence analyses were conducted with these data to determine similarities in gene expression modulation among extracts and isolated bioactive molecules. The first analysis compared the genomic effects on antioxidant enzyme genes without considering their intensity (Figure 5A). All extracts presented high similarity in their genomic effects possibly influenced by Caf and The and were less affected by Cat molecules. When the intensity and direction of the effects (downregulation or upregulation) were considered (Figure 5B), three groups differed from the control. The CO and GU extracts presented extensive similarity in the intensity of gene modulation, probably because of high Caf concentrations in their chemical matrix.

As expected, BT and GT had greater similarities than the other extracts, mainly related to the induction of *CAT*, *GPX*, and *SOD1* genes. The YM extract was the most distant from the others regarding *SOD2* gene expression. The diagram shows that the difference was associated with high levels of The molecules (20 µg/mL) that induced higher expression levels of the *SOD2* gene.

## Discussion

Previous *in vitro* and *in vivo* studies have described the antioxidant and anti-inflammatory effects of several caffeinated beverages consumed worldwide. However, the studies have not compared differences and similarities in the oxidative modulation of caffeinated beverages prepared as habitually consumed by the human population. The first study showed that the intake of only one 100 mL cup of each caffeinated beverage by healthy adults could lower cellular mortality and NO levels in PBMC cultures. These results suggest that the absorption of bioactive molecules from each extract could have a persistent effect on immune cells. Complementary data from an *in vitro* protocol indicated that this effect could be involved in the differential modulation of antioxidant enzyme genes by each extract. However, some differences in this genomic effect were observed among the caffeinated extracts, mainly concerning the *SOD2* gene. These data should be discussed from two relevant aspects. The first is regarding methodological issues, and the second regards the results of this study.

Concerning methodological issues, it should be noted that studies regarding causal mechanisms of food and beverages on molecular, biochemical, and physiological variables are generally performed through experimental models because of difficulties in collecting data from humans. These methodological challenges involve ethical and operational issues. For example, there is consistent evidence that inter-individual variability can affect the absorption and metabolism of caffeine and polyphenols [15,16,17]. In an attempt to lessen this limitation, this study used a mixed *in vivo-in vitro* experimental design, in which blood samples were collected from healthy adults having ethnic, age, and lifestyle similarities, before and after ingesting half a glass (100 mL) of

each of five caffeinated beverages prepared as they are usually consumed. The only difference was that the traditional consumption of roasted guarana seed powder by Amazonian riverside people does not generally involve hot water extraction but rather a mixture of this powder with honey or sugar water [6].

The blood samples were processed to obtain PBMCs, generating two cellular cultures from the same individuals to compare the effects of caffeinated extracts. The results showed a persistent reaction from drinking the beverages after 24 h. However, we cannot discard the possibility that this action was triggered because there was no hepatic or renal metabolism acting on these molecules under *in vitro* conditions, resulting in an *in vivo* situation. However, it is difficult to assess this issue *in vivo* because the volunteers would have to remain for 24 h without ingesting food or water, which would not be ethically acceptable. Moreover, this type of beverage is consumed more than once per day. Individuals also drink more than one type of caffeinated beverage per day. For example, in areas where YM is traditionally a daily drink, people also consume coffee.

Another important methodological issue concerns the relatively low concentration of PBMCs obtained from each sample, which decreased the possibility of examining more oxidative markers. Thus, we assessed NO levels directly associated with immune response modulation and total ROS, Pcarb, and LPX levels. Given the limited volume of blood samples, it was not possible to extend the analysis to genotoxicity markers or even quantify antioxidant enzymes. Additionally, we failed to obtain samples and data related to gene expression from the PBMCs BI and AI for caffeinated beverages.

Consequently, we opted to conduct a complementary protocol in which PBMCs were supplemented with extracts and isolated bioactive molecules to establish their

potential action on antioxidant enzyme genes. Despite these limitations, the analysis showed relevant results regarding the similarity of genomic action of the caffeinated beverages. For example, the data corroborated the results previously described by Alves et al. [8], showing the antioxidant and genoprotective capacity of these five caffeinated extracts by non-cellular assays and an immune-modulatory effect.

In the first protocol, cellular mortality was significantly different between the BI and AI PBMC cultures. Cell mortality declined in all cases, which indicated that the consumption and absorption of bioactive molecules from the extracts could have a protective effect on PBMCs. This effect could be related to the decrease in macromolecule oxidation, especially DNA damage, which generates apoptosis. Unfortunately, this assumption was not based on direct analysis because of the limitation regarding blood sample volume. However, considering previously published data, xanthines and polyphenols could trigger the cytoprotective process through their antioxidant properties [1,4,8,18-20].

The caffeinated extracts lowered the NO levels in PBMCs. NO is considered a ROS molecule that exerts multiple modulating effects on inflammation and plays a crucial role in immune response regulation. Generally, elevated NO concentrations are induced by iNOS enzyme activity by macrophages and neutrophils in the presence of an inflammatory process [21-23]. Therefore, the reduction of NO levels triggered by xanthines and polyphenols could involve a direct oxidative scavenger action or an inhibitory effect on iNOS enzyme activity [23]. Hwang et al. [24] studied RAW 264.7 macrophage cell cultures with zebrafish and found similar results. In both experimental models, inflammatory

activation was induced by LPS exposure. However, Caf exposure decreased NO levels and downregulated the expression of pro-inflammatory and iNOS genes.

Moreover, polyphenols, such as catechins, could decrease NO levels by inhibiting the iNOS enzyme [23]. Here, it is essential to point out that some polyphenols induce NO production by endothelial cells, improving circulation while concomitantly suppressing iNOS expression and decreasing NO levels by immune cells associated with the inflammatory response [23]. Alves et al. [8] also described the downregulation of pro-inflammatory cytokine genes (*IL-1 $\beta$* , *IL6*, *TNF- $\alpha$* , and *IFN- $\gamma$* ) in human PBMCs supplemented with different caffeinated beverages. Therefore, the results of this study reinforce the potential lowering effect of caffeinated beverages on NO concentrations. This action could be a key factor associated with the anti-inflammatory effects of these beverages.

To better understand the results related to the modulation of the expression of antioxidant enzyme genes by caffeinated drinks, it is necessary to briefly review the role of NO and other ROS, especially the superoxide anion and hydrogen peroxide (HP), which are associated with the inflammatory response. Phagocytic cells, such as neutrophils and macrophages, when exposed to pathogens or non-pathogens, are pro-inflammatory agents that undergo marked changes in the way they handle oxygen. NO/superoxide interplay is known to fine-tune mechanisms regulating life and death in neutrophils and other immune cells [23]. During an inflammatory response, large amounts of NO formed by iNOS surpass the physiological amounts of NO, usually made by nNOS or eNOS and other ROS, such as superoxide anion and HP molecules [23].



Initially, inflammatory activation involves an increase in the oxygen uptake rate, which generates high superoxide and HP molecules with microbiocidal activity. The increase in superoxide concentrations in macrophages and other immune cells also involves NADPH-oxidase enzyme activity [23].

All body cells control the superoxide anion levels produced during oxidative phosphorylation by an enzymatic antioxidant system. This system initially dismutates the superoxide anion in HP via *SOD* enzyme action. Subsequently, the HP molecules are catalyzed in water by *CAT* and *GPX* enzymes. In particular, *SOD2* and *GPX* are enzymes that act inside the mitochondria to control the concentrations of these ROS molecules. *SOD1* acts in the cytoplasm and is the main antioxidant enzyme that catalyzes the superoxide anion in HP molecules [25].

In this context, it can be postulated that caffeinated beverages could trigger the lowering of NO levels, mainly by Caf action. This effect could subsequently trigger the overexpression of antioxidant enzyme genes, leading to a decrease in the levels of superoxide and HP molecules. These events could attenuate the inflammatory response associated with the ingestion of caffeinated beverages. However, there were some specificities according to the chemical composition of each extract. This is the case for the increasing effects of the The molecule on the *SOD2* gene at higher concentrations, such as that found in the YM extract. This antioxidant enzyme is active only in the mitochondria. Unfortunately, we could not identify previous consistent studies showing an association between the The molecule and *SOD2* gene modulation. However, an investigation using a rat model of diabetic nephropathy treated with pentoxifylline (PTX), a xanthine derived from theobromine, described an increase in *SOD* enzyme levels [25].

Another study showed that the YM extract produced the same way people habitually consume the beverage, increased the lifespan of the nematode *Caenorhabditis elegans*, and reduced ROS produced by exposure of these animals to Paraquat®, which is a superoxide generator and a highly toxic pesticide [26].

Although polyphenols present a relevant antioxidant and anti-inflammatory effect [15], in this investigation, Cat isolated molecules did not trigger a strong modulatory effect on antioxidant enzyme genes. It is important to remember that polyphenols may contribute to the results because other molecules of this chemical group are present in the chemical matrix of the extracts. This statement is based on the high total polyphenol concentrations described in Table 1.

## **Conclusions**

Despite methodological limitations related to *in vitro* assays, the results suggested that caffeinated beverages prepared as humans usually consume them have some antioxidant effects that could explain their anti-inflammatory effects. The common effects involve reduced NO levels and genomic regulation of antioxidant enzyme genes, explaining the common anti-inflammatory effects of these beverages.

## Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

The authors would like to thank all the volunteers who donated blood and participated in this study. This research was supported by the Brazilian research agencies (CNPq, CAPES, FAPERGS and FAPEAM).

## References

[1] van Dam RM, Hu FB, Willett WC. Coffee, Caffeine, and Health. *N Engl J Med.* 2020;383:369-78, <http://dx.DOI.org/10.1056/NEJMra1816604>.

[2] Madeira MH, Boia R, Ambrósio AF, Santiago AR. Having a Coffee Break: The Impact of Caffeine Consumption on Microglia-Mediated Inflammation in Neurodegenerative Diseases. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:4761081, <http://dx.DOI.org/10.1155/2017/4761081>. Epub 2017 Jan 31.

[3] Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *J Ethnopharmacol.* 2011 Jul 14;136(3):378-84. <http://dx.DOI.org/10.1016/j.jep.2010.06.032>. Epub 2010 Jun 26.

[4] Peluso I, Serafini M. Antioxidants from black and green tea: from dietary modulation of oxidative stress to pharmacological mechanisms. *Br J Pharmacol.* 2017;174:1195–208, <http://dx.DOI.org/10.1111/bph.13649>.

[5] Musial C, Kuban-Jankowska A, Gorska-Ponikowska M. Beneficial properties of green tea catechins. *Int J Mol Sci.* 2020;21, 1774, <http://dx.DOI.org/10.3390/ijms21051744>.

[6] Schimpl FC, Da Silva JF, Gonçalves JFDC, Mazzafera P. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *J. Ethnopharmacol.* 2013 Oct 28;150(1):14-31, <http://dx.DOI.org/10.1016/j.jep.2013.08.023>.

[7] Krewer CDC, Suleiman L, Frescura Duarte MMM, Ribeiro EE, Mostardeiro CP, Echart Montano MA, et al. Guarana, a supplement rich in caffeine and catechin, modulates cytokines: Evidence from human in vitro and in vivo protocols. *Eur Food Res Technol.* 2014;239:49–57. <http://dx.DOI.org/10.1007/s00217-014-2182-3>.

[8] Alves AO, Weis GCC, Unfer TC, Assmann CE, Barbisan F, Azzolin VF et al. Caffeinated beverages contribute to a more efficient inflammatory response: Evidence from human and earthworm immune cells. *Food Chem Toxicol* 2019 Dec;134:110809. <http://dx.DOI.org/10.1016/j.fct.2019.110809>. Epub 2019 Sep 6.

[9] Há TTN, Huy NT, Murao LA, Lan NTP, Thuy TT, Tuan HM et al. Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. *PLoS One.* 2011; 6(10): e25969. Published online 2011 Oct 7. <http://dx.DOI.org/10.1371/journal.pone.0025969>.

[10] Choi WS, Shin PG, Lee JH, Kim GD. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Cell. Immunol.* 2012; 280 (2), 164–170. <http://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.12.007>.

[11] Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142:231–55. <http://dx.DOI.org/10.1038/sj.bjp.0705776>.

[12] Jentzsc, AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK. Improved analysis human of malondialdehyde in body fluids. *Free Radic Biol Med.* 1996;20;2:251256. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8).

[13] Levine RL, Williams JA, Stadtman EP, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1994;233:346-57. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9).

[14] R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2014. Available from: <http://www.R-project.org/>

[15] Williamson G. The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutr Bull.* 2017;42:226–35. <http://dx.DOI.org/10.1111/nbu.12278>

[16] Barcelos RP, Souza MA, Amaral GP, Stefanello ST, Bresciani G, Fighera MR, et al. Caffeine supplementation modulates oxidative stress markers in the liver of trained rats. *Life Sci [Internet]. Elsevier Inc.;* 2014;96:40–5. <http://dx.DOI.org/10.1016/j.lfs.2013.12.002>

[17] Pan Y, Long X, Yi R, Zhao X. Polyphenols in Liubao tea can prevent CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage in mice through its antioxidant capacities. *Nutrients*. 2018;10:1–17. <http://dx.DOI.org/10.3390/nu10091280>.

[18] Ruskovska T, Maksimova V, Milenkovic D. Polyphenols in human nutrition: From the in vitro antioxidant capacity to the beneficial effects on cardiometabolic health and related inter-individual variability - An overview and perspective. *Br J Nutr*. 2020;123:241–54. <http://dx.DOI.org/10.1017/S0007114519002733>.

[19] Martini D, Del Bo' C, Tassotti M, Riso P, Rio D Del, Brighenti F, et al. Coffee consumption and oxidative stress: A review of human intervention studies. *Molecules*. 2016;21. <http://dx.DOI.org/10.3390/molecules21080979>.

[20] Iglesias DE, Bombicino SS, Boveris A, Valdez LB. (+)-Catechin inhibits heart mitochondrial complex i and nitric oxide synthase: Functional consequences on membrane potential and hydrogen peroxide production. *Food Funct Royal Society of Chemistry*; 2019;10:2528–37. <http://dx.DOI.org/10.1039/c8fo01843j>.

[21] Guzik TJ, Korbout R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*. 2003;54:469–87.

[22] Kobayashi Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J Leukoc Biol*. 2010;88:1157–62. <http://dx.DOI.org/10.1189/jlb.0310149>.

[23] Lind M, Hayes A, Caprnda M, Petrovic D, Rodrigo L, Kruzliak P, et al. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomed Pharmacother* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2017;93:370–5. <http://dx.DOI.org/10.1016/j.biopha.2017.06.036>.

[24] Hwang JH, Kim KJ, Ryu SJ, Lee BY. Caffeine prevents LPS-induced inflammatory responses in RAW264.7 cells and zebrafish. *Chem Biol Interact* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;248:1–7. <http://dx.DOI.org/10.1016/j.cbi.2016.01.020>.

[25] Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:337–49. [http://dx.DOI.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00905-x](http://dx.DOI.org/10.1016/s0891-5849(02)00905-x).

[26] Lima ME, Colpo AC, Salgueiro WG, Sardinha GE, Ávila 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;11:10091–104. <http://dx.DOI.org/10.3390/ijerph111010091>.

## 5 DISCUSSÃO

Bebidas cafeinadas são alimentos amplamente consumidos em todo o mundo. Como ponto comum, todas dividem a mesma matriz formada por cafeína e catequinas, apesar de cada extrato apresentar concentrações e estruturas químicas distintas entre si. Inúmeros estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, já descreveram seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, especialmente em processos de inflamação crônica envolvidos na etiologia de diversas DCNTs (SCHROETER et al., 2001; ZERN et al., 2005; KURIYAMA et al., 2006; FRAGA et al., 2019; KOCH et al., 2018). Estes estudos, entretanto, utilizam extratos hidroalcoólicos, diferente da maneira como estas bebidas são habitualmente preparadas e consumidas pela população.

Para o primeiro estudo, com base em testes preliminares, foi escolhida a concentração de 10 µg/mL para os ensaios, pois nesta concentração os extratos exibiram propriedades nutrigenômicas, antioxidantes, genoprotetoras e não citotóxicas.

Neste trabalho, foi investigado o efeito dos extratos na modulação inflamatória de células mononucleares do sangue periférico humano não ativadas (CMSPs-na), neutrófilos humanos e celomócitos granulocíticos do modelo experimental minhoca *Eisenia fétida* através da análise da formação de armadilhas do tipo “NET”, quando expostos a levedura do tipo *Saccharomyces cerevisiae*. Um padrão semelhante de modulação imunológica foi observado entre os diferentes extratos, embora a intensidade das respostas tenha sido, em algumas situações, específica para cada tipo de extrato. Com relação as três principais moléculas bioativas testadas em CMSPs-na, CAF, CAT e THE, os resultados não mostraram diferenças significativas destas, quando comparadas aos extratos.

Analizamos, ainda, o efeito das bebidas na expressão dos genes e nos níveis de citocinas presentes no sobrenadante, uma vez que não há relação entre os dois processos. Na verdade, uma grande parte dessas citocinas, diretamente envolvidas na resposta inflamatória desencadeada por CMSPs, permanece no citoplasma em uma forma inativada. Quando ativadas, pró-interleucinas, como IL-1 $\beta$  e IL-6, são clivadas pela caspase-1 e liberadas no meio extracelular (BERGSBAKEN; FINK; COOKSON, 2009).



Neste contexto, assumimos três resultados possíveis da exposição de CMSPs aos diferentes extratos: (1) Nenhum efeito quando comparados com células controle, sem tratamentos, apenas meio de cultura; (2) Concomitante superexpressão de genes de citocinas e proteínas, indicativas de ativação de estados pró-inflamatórios pelos extratos; (3) Superexpressão dos genes de citocinas, níveis mais baixos de citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante, e níveis mais elevados de IL-10 no sobrenadante do que no grupo controle, indicativos de uma "reserva potencial de resposta inflamatória" desencadeada por extratos em CMSPs-na. Nesse sentido, os resultados poderiam sugerir que as bebidas com matriz de cafeína-catequina seriam capazes de contribuir para a "resposta inflamatória" induzindo aumento nas citocinas de mRNA ou inativo citocinas no citoplasma. Como tal, é possível que, na presença de um antígeno, a resposta inflamatória possa ser mais eficiente, uma vez que poderia ser mais intensa e mais rápida.

Em 2018, um estudo de Homa indicou a ocorrência de ETs, um fenômeno comum em neutrófilos de vertebrados (HOMA, 2018). De fato, células imunológicas de *E. fetida* podem ser obtidas a partir do fluido celômico, que contém muitas moléculas de proteína e células específicas que são genericamente referidas como celomócitos, e são categorizados como amebócitos e eleócitos/cloragócitos (VALEMBOIS; LASSÈGUES; ROCH, 1992; ENGELMAN et al., 2016). Essas células estão envolvidas na formação dos *Brown Bodies* (BB), que são agregados multicelulares associados à produção de ETs em minhocas, e que ajudam a engolfar fagócitos e destroem microorganismos. ETs contêm uma estrutura de DNA que pode ser observada com microscopia de fluorescência. Essas estruturas são semelhantes aos NETs, e são comparáveis a uma teia de aranha, já havendo sido descritas anteriormente em vertebrados, incluindo humanos (HOMA, 2018).

Notavelmente, na resposta imune, os amebócitos resultam através da fagocitose, bem como pela formação de armadilhas extracelulares (ETs), e contêm DNA extracelular (exDNA), histona H3 e componentes da proteína de choque térmico HSP27 (HOMA, 2018). Além destas respostas imunes semelhantes a dos vertebrados, as minhocas passam por um processo de encapsulamento que efetivamente neutraliza substâncias estranhas. No caso de patógenos que são grandes demais para serem fagocitados, há a

formação dos BB, que são estruturas visíveis por microscopia óptica (VALEMBOIS; LASSÈGUES; ROCH, 1992).

Com base nessas informações e nos protocolos publicados anteriormente por vários estudos, realizamos uma análise com base na intensidade da resposta a grandes antígenos (levedura), medida de acordo com o perímetro dos corpos marrons da minhoca. Neste estudo, para provar que estas estruturas apresentam células semelhantes a granulócitos, realizamos estudos de coloração usando um kit panótico. Este kit é amplamente utilizado em laboratórios clínicos, onde a terceira solução de coloração cora núcleos e grânulos celulares, como neutrófilos, em azul-violeta. Posteriormente, observamos que a coloração em microscopia óptica se sobrepôs à coloração de fluorescência, indicando a presença de uma ETweb nas culturas.

A partir deste protocolo padronizado, comparamos a resposta dos celomócitos aos desafios de levedura. Os resultados sugeriram que os extratos podem melhorar a eficiência desta resposta, produzindo maiores corpos marrons. É possível que a ETweb formada também possa ser estendida. No entanto, esta afirmação é baseada em análises qualitativas.

A formação de armadilha NET humana induzida pela exposição a leveduras também foi modulada por extratos de bebidas cafeinadas, sugerindo uma melhora na resposta imune. Aqui, é importante notar que, conforme descrito por Kenny et al. (2017), NETs humanos podem ser induzidos por diferentes antígenos, incluindo o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), um potente mitógeno e um robusto indutor da formação de NET, ionóforo de cálcio A23187, nigericina, *Streptococcus* do grupo B e *Candida albicans* e levedura *S. cerevisiae* utilizada aqui. Também é importante notar que a extrusão de NETs por indivíduos saudáveis é importante na defesa do hospedeiro. Portanto, os resultados descritos aqui, com base em neutrófilos humanos, reforça o benéfico papel das bebidas cafeinadas na resposta imunológica humana quando desafiado por patógenos. Este resultado é relevante considerando que, em geral, os efeitos das bebidas funcionais estão associados a prevenção de certas doenças crônicas não transmissíveis, ou como compostos antimicrobianos capazes de matar e/ou inibir a proliferação dos patógenos (KENNY et al., 2017).

Porém, é importante observar as restrições metodológicas deste estudo. Nossos resultados foram obtidos utilizando protocolos *in vitro* para humanos, de modo que algumas diferenças podem ter ocorrido em relação as condições *in vivo*, devido, por exemplo, interação entre moléculas bioativas absorvidas dos compostos e a interação dessas substâncias com outros compostos metabólicos. Nos protocolos de armadilha NET em humanos, foi utilizada uma abordagem não realista, pois é pouco provável que as células leucocitárias humanas entrem em contato com grandes células de levedura. No entanto, o uso de fermento inativo como o antígeno desencadeou uma formação NET-trap semelhante à observada em celomócitos obtidos de minhoca, demonstrando ser um protocolo de avaliação útil dentro de condições experimentais.

Mesmo com estas restrições metodológicas e um modelo experimental não usual usado em investigações sobre alimentos funcionais, os resultados apresentados aqui sugerem que os extratos de bebidas cafeinadas seriam capazes de melhorar a eficiência da resposta anti-inflamatória. Esta melhoria parece ser a de criar uma espécie de reserva imunológica que, na presença de antígenos, pode produzir uma resposta imune mais eficiente contra infecções patogênicas.

O segundo artigo desta tese avaliou os níveis de ON diretamente associados à modulação da resposta imune e aos níveis totais de EROs, carbonilação de proteínas (Pcarb) e lipoperoxidação (LPX). Em relação às questões metodológicas, deve-se destacar que os estudos sobre os mecanismos causais dos alimentos e bebidas sobre as variáveis moleculares, bioquímicas e fisiológicas são geralmente realizados por meio de modelos experimentais *in vitro* devido à dificuldade de coleta de dados em humanos envolvendo questões éticas e operacionais. Entretanto, há evidências consistentes de que a variabilidade interindividual pode afetar a absorção e o metabolismo da cafeína e polifenóis (WILLIAMSON, 2017; BARCELOS et al., 2014; PAN et al., 2018). Assim, na tentativa de diminuir esta limitação, utilizamos um desenho experimental misto *in vivo-in vitro*, no qual amostras de sangue foram coletadas de adultos saudáveis com semelhanças étnicas, de idade e estilo de vida, antes e após a ingestão de meio copo (100mL) de cada uma das cinco bebidas cafeinadas preparadas da forma como são normalmente consumidas. A única diferença diz respeito ao fato de que o consumo tradicional do pó da semente de guaraná torrado pelos ribeirinhos amazônicos

geralmente não envolve a extração por água quente, mas sim a mistura desse pó com mel ou água com açúcar gelada ou em temperatura ambiente (SCHIMPL et al., 2013).

No modelo *in vivo*, foi possível verificar que a ingestão de apenas um copo de 100mL de cada bebida com cafeína por adultos saudáveis pode reduzir a mortalidade celular e os níveis de ON em culturas de CMSP. Esses resultados sugerem que a absorção de moléculas bioativas de cada extrato pode ter um efeito persistente nas células do sistema imunológico. Dados complementares de um protocolo *in vitro* indicaram que esse efeito pode estar envolvido na modulação diferencial de genes de enzimas antioxidantes por cada extrato. Porém, algumas diferenças nesse efeito genômico foram observadas entre os extratos cafeinados, principalmente no que diz respeito ao gene da SOD2. Esses dados devem ser discutidos a partir de dois aspectos relevantes. O primeiro diz respeito às questões metodológicas e o segundo aos resultados deste estudo.

As amostras de sangue foram processadas para obtenção de CMSPs, gerando duas culturas celulares dos mesmos indivíduos para comparar os efeitos dos extratos cafeinados. Os resultados mostraram uma reação persistente do efeito das bebidas após 24 horas no protocolo *in vitro*. No entanto, não podemos descartar a possibilidade de que essa ação tenha sido desencadeada pela falta de metabolismo hepático ou renal agindo sobre essas moléculas em condições *in vitro*, resultando em uma resposta semelhante a uma de situação *in vivo*. No entanto, é difícil avaliar essa questão porque, para tanto, os voluntários teriam que permanecer por 24 horas sem ingerir alimentos ou água, o que não é eticamente aceitável. Além disso, as bebidas testadas são consumidas mais de uma vez por dia. Além disso, alguns indivíduos ingerem mais de um tipo de bebida com cafeína por dia. Um exemplo acontece nas regiões do sul do país, onde o chimarrão é a bebida tradicional, sendo que as pessoas também consomem café.

Outra questão metodológica importante diz respeito à concentração relativamente baixa de CMSPs obtida de cada amostra, o que diminuiu a possibilidade de examinar uma quantidade maior de marcadores oxidativos. Dessa forma, avaliamos os níveis de NO diretamente associados à modulação da resposta imune e aos níveis totais de EROs, Pcarb e LPX. Dado o volume limitado de amostras de sangue, não foi possível estender a análise para marcadores de genotoxicidade ou mesmo quantificar enzimas

antioxidantes. Além disso, não conseguimos obter amostras e dados relacionados à expressão gênica das CMSPs antes e depois da ingestão para bebidas com cafeína.

Conseqüentemente, optou-se por realizar um protocolo complementar em que CMSPs foram suplementados com extratos e moléculas bioativas isoladas para estabelecer seu potencial de ação em genes de enzimas antioxidantes. Apesar dessas limitações, a análise mostrou resultados relevantes quanto à similaridade da ação genômica das bebidas cafeinadas. Por exemplo, os dados corroboram os resultados descritos anteriormente por Alves et al. (2019), mostrando a capacidade antioxidante e genoprotetora desses cinco extratos cafeinados por ensaios não celulares e um efeito imunomodulador.

No primeiro protocolo, a mortalidade celular foi significativamente diferente entre as culturas de CMSPs antes e após a ingestão. A mortalidade celular diminuiu em todos os casos, o que indica que o consumo e a absorção de moléculas bioativas dos extratos podem ter um efeito protetor sobre as CMSPs. Esse efeito pode estar relacionado à diminuição da oxidação de macromoléculas, principalmente do dano ao DNA, que gera apoptose. Infelizmente, essa suposição não foi baseada na análise direta devido à limitação do volume da amostra de sangue. No entanto, considerando dados publicados anteriormente, xantinas e polifenóis poderiam desencadear o processo citoprotetor por meio de suas propriedades antioxidantes (van DAM et al., 2020; PELUSO; SERAFINI, 2017; ALVES et al., 2019, RUSKOVSKA; MAKSIMOVA; MILENKOVIC, 2020; MARTINI et al., 2016, IGLESIAS et al., 2019).

Os extratos cafeinados baixaram os níveis de ON em CMSPs. O ON é considerado uma molécula de ERO que exerce múltiplos efeitos moduladores sobre a inflamação e desempenha um papel crucial na regulação da resposta imune. Geralmente, concentrações elevadas de ON são induzidas pela atividade da enzima iNOS por macrófagos e neutrófilos na presença de um processo inflamatório (GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003; KOBAYASHI, 2010; LIND et al., 2017). Portanto, a redução dos níveis de ON desencadeada por xantinas e polifenóis pode envolver uma ação sequestrante oxidativa direta ou um efeito inibitório sobre a atividade da enzima iNOS (LIND et al., 2017). Hwang et al. (2016) estudaram culturas de células de macrófagos RAW 264.7 com peixe-zebra e encontraram resultados semelhantes. Em ambos os

modelos experimentais, a ativação inflamatória foi induzida pela exposição ao lipopolissacarídeo (LPS). No entanto, a exposição a Caf diminuiu os níveis de ON e regulou negativamente a expressão de genes pró-inflamatórios e iNOS (HWANG et al., 2016).

Além disso, os polifenóis, como as catequinas, podem diminuir os níveis de ON inibindo a enzima iNOS (LIND et al., 2017). Aqui, é essencial destacar que alguns polifenóis induzem a produção de ON pelas células endoteliais, melhorando a circulação e, ao mesmo tempo, suprimindo a expressão de iNOS e diminuindo os níveis de ON pelas células imunes associadas à resposta inflamatória (LIND et al., 2017). Alves et al. (2019) também descreveram a regulação negativa de genes de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) em CMSPs humanas suplementados com diferentes bebidas cafeinadas. Portanto, os resultados deste estudo reforçam o potencial efeito redutor das bebidas cafeinadas nas concentrações de ON. Essa ação pode ser um fator chave associado aos efeitos anti-inflamatórios dessas bebidas (ALVES et al., 2019).

Para melhor compreender os resultados relacionados à modulação da expressão de genes de enzimas antioxidantes por bebidas cafeinadas, é necessário fazer uma breve revisão do papel do ON e outras EROs, principalmente o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que estão associados à resposta inflamatória. As células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos, quando expostas a patógenos ou não patógenos, são agentes pró-inflamatórios que sofrem mudanças marcantes na maneira como lidam com o oxigênio. A interação ON / superóxido é conhecida por ajustar os mecanismos que regulam a vida e a morte em neutrófilos e outras células do sistema imunológico (LIND et al., 2017). Durante uma resposta inflamatória, grandes quantidades de ON formado por iNOS ultrapassam as quantidades fisiológicas de ON, geralmente feito por nNOS ou eNOS e outras EROs, como ânion superóxido e moléculas de peróxido de hidrogênio (LIND et al., 2017).

Inicialmente, a ativação inflamatória envolve um aumento na taxa de captação de oxigênio, o que gera altas moléculas de superóxido e moléculas de peróxido de hidrogênio com atividade microbicida. O aumento nas concentrações de superóxido em macrófagos e outras células do sistema imunológico também envolve a atividade da enzima NADPH-oxidase (LIND et al., 2017).

Todas as células do corpo controlam os níveis de ânion superóxido produzidos durante a fosforilação oxidativa por um sistema antioxidante enzimático. Este sistema inicialmente dismuta o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio pela ação da enzima SOD. Posteriormente, estas moléculas são catalisadas em água pelas enzimas CAT e GPX. Em particular, SOD2 e GPX são enzimas que atuam dentro da mitocôndria para controlar as concentrações dessas moléculas ROS. A SOD1 atua no citoplasma e é a principal enzima antioxidante que catalisa o ânion superóxido as moléculas de peróxido de hidrogênio (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002).

Nesse contexto, pode-se postular que as bebidas cafeinadas podem desencadear a redução dos níveis de ON, principalmente pela ação de Caf. Esse efeito poderia posteriormente desencadear a superexpressão de genes de enzimas antioxidantes, levando a uma diminuição nos níveis de superóxido e moléculas de peróxido de hidrogênio. Esses eventos poderiam atenuar a resposta inflamatória associada à ingestão de bebidas cafeinadas. No entanto, houve algumas especificidades de acordo com a composição química de cada extrato. Esse é o caso dos efeitos crescentes da molécula The no gene SOD2 em concentrações mais altas, como a encontrada no extrato de erva-mate. Esta enzima antioxidante é ativa apenas na mitocôndria. Infelizmente, não foi possível identificar estudos anteriores consistentes mostrando uma associação entre a molécula The e a modulação do gene SOD2. No entanto, uma investigação usando um modelo de nefropatia diabética em ratos tratada com pentoxifilina (PTX), uma xantina derivada da teobromina, descreveu um aumento nos níveis da enzima SOD (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002). Outro estudo mostrou que o extrato de erva-mate, produzido da mesma forma que as pessoas consomem habitualmente a bebida, aumenta a vida útil do nematóide *Caenorhabditis elegans* e reduz as EROs produzidas pela exposição desses animais ao Paraquat®, um pesticida altamente tóxico e reconhecidamente gerador de superóxido (LIMA et al., 2014).

Embora os polifenóis apresentem um importante efeito antioxidante e anti-inflamatório (WILLIAMSON, 2017), nesta investigação, as moléculas isoladas de Cat não desencadearam um forte efeito modulador nos genes de enzimas antioxidantes.

## 6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos pelos diversos protocolos realizados neste estudo, podemos inferir que os extratos aquosos quentes de bebidas cafeinadas são capazes de modular parâmetros inflamatórios, além de melhorar a resposta imunológica desencadeada pela exposição a patógenos, através da:

- Diminuição dos níveis das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), e aumento dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10;

- Promoção da superexpressão dos genes destas citocinas, sugerindo um aumento nos níveis de mRNAs e/ou de citocinas inativas no citoplasma;

- Os processos de encapsulação de leveduras e formação de NET-traps sugere que os extratos também são capazes de melhorar a resposta imunológica em humanos e minhocas. No entanto, para *E. fetida*, o a intensidade desses resultados varia de acordo com cada extrato;

- Em relação ao protocolo misto *in vivo/in vitro*, foi possível verificar que a ingestão de apenas um copo de 100 mL de cada bebida cafeinada por adultos saudáveis foi capaz de reduzir a mortalidade celular e os níveis de óxido nítrico (ON) em culturas de CMSP, sugerindo que a absorção de moléculas bioativas de cada extrato pode ter um efeito persistente nas células do sistema imunológico;

- Dados complementares obtidos a partir de um protocolo *in vitro* indicaram que esse efeito pode estar envolvido na modulação diferencial de genes de enzimas antioxidantes por cada extrato. Embora com intensidades diferentes, os extratos exibiram alta similaridade na regulação negativa destes genes.

Assim o conjunto destes resultados sugere que as bebidas cafeinadas compartilham, não só componentes bioativos nas suas matrizes químicas, mas também que estes componentes possuem similaridade de ação, modulando não só processos inflamatórios crônicos de baixo grau descritos na literatura, mas também aumentando a competência da inflamação aguda desencadeada por agentes patogênicos. Assim, parece que bebidas cafeinadas são atenuadoras de processos de imunossenescência associados a disfunções e DCNTs prevalentes no envelhecimento biológico.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K; LICHTMANN, A; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 8th Edition, Saunders Ed, 2014.

AHECHU, P. et al. NLRP3 Inflammasome: A Possible Link Between Obesity-Associated Low-Grade Chronic Inflammation and Colorectal Cancer Development. **Frontiers in Immunology**, v.11, n.9:2918, 2018. Doi: 10.3389/fimmu.2018.02918. eCollection 2018.

AKHA, A. A. S. Aging and the immune system: An overview. **Journal of Immunological Methods**, v.463, p.21-26, 2018. Doi: 10.1016/j.jim.2018.08.005.

ALVES, A. O. et al. Caffeinated beverages contribute to a more efficient inflammatory response: Evidence from human and earthworm immune cells. **Food Chemistry Toxicology**, v.134:110809, 2019. Doi: 10.1016/j.fct.2019.110809. Epub 2019 Sep 6.

ATIENZA, M.; ZIONTZ, J., CANTERO, J. L. Low-grade inflammation in the relationship between sleep disruption, dysfunctional adiposity, and cognitive decline in aging. **Sleep Medicine Reviews**, v.42, p.171-183, 2018. Doi: 10.1016/j.smrv.2018.08.002.

BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v.18, p.767–811, 2000. Doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.767

BARBISAN, F. et al. “Xanthine-catechin mixture enhances lithium-induced anti-inflammatory response in activated macrophages in vitro”. **Biomed Research International**, article ID 4151594, 2017. Doi: 10.1155/2017/4151594.

BARCELLINI, W.; FATTIZZO, B. Autoimmune hemolytic anemia, autoimmune neutropenia and aplastic anemia in the elderly. **European Journal of Internal Medicine**, v. 58, p.77-83, 2018. Doi: 10.1016/j.ejim.2018.05.034.

BARCELOS, R. P. et al. Caffeine supplementation modulates oxidative stress markers in the liver of trained rats. **Life Sciences**, v.96, p.40–5, 2014. Doi: 10.1016/j.lfs.2013.12.002.

BARNIG, C. et al. Activation of Resolution Pathways to Prevent and Fight Chronic Inflammation: Lessons From Asthma and Inflammatory Bowel Disease. **Frontiers in Immunology**, v.23, n.10:1699, 2019. Doi: 10.3389/fimmu.2019.01699. eCollection 2019.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiological Reviews**, v.78, n.2, p.547-81, 1998. Doi: 10.1152/physrev.1998.78.2.547.

BERGSBAKEN, T.; FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, n.2, p.99–109, 2009. Doi: 10.1038/nrmicro2070.

BONACCIO, M. et al. Mediterranean diet, dietary polyphenols and low grade inflammation: results from the MOLI-SANI study and on behalf of the MOLI-SANI Study Investigators. **British journal of clinical pharmacology**, v.83, n.1, p.107–113, 2017. Doi: 10.1111/bcp.12924.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on Ilex paraguariensis research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v.136, n.3, p.378-84, 2011. Doi: 10.1016/j.jep.2010.06.032. Epub 2010 Jun 26.

BRESCIANI, G.; CRUZ, I. B. M; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Manganese Superoxide Dismutase and Oxidative Stress Modulation. **Advances in Clinical Chemistry**, v.68, p.87-130, 2015. Doi: 10.1016/bs.acc.2014.11.001.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v.303, n.5663, p.1532-1535, 2004. Doi: 10.1126/science.1092385.

BRINKMANN, V. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. **Journal of Innate Immunology**, v.10, n.5-6, p.414-421, 2018. Doi: 10.1159/000489829. Epub 2018 Jun 15.

CALDER, P. C. et al. Health relevance of the modification of low grade inflammation in ageing (inflammageing) and the role of nutrition. **Ageing Research Reviews**, v.40, p.95-119. Doi: 10.1016/j.arr.2017.09.001.

CASSINI, A. et al. Burden of six healthcare-associated infections on European population health: estimating incidence-based disability-adjusted life years through a population prevalence-based modelling study. **PLoS Medicine**, v.13, n.10:e1002150, 2016. Doi: 10.1371/journal.pmed.1002150.

CASTELO-BRANCO, C.; SOVERAL, I. The immune system and aging: a review. **Gynecological Endocrinology**, v.30, p.16-22, 2014. Doi: 10.3109/09513590.2013.852531.

CEVENINI, E.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C. Inflamm-ageing. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic Care**, v.16, n:1, p.14–20, 2013. Doi:10.1097/MCO.0b013e32835ada13.

CHEN, G. et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **The Journal of Clinical Investigation**, v.130, n.5, p.2620-2629, 2020. Doi: 10.1172/JCI137244.

CHEN, Y. et al. Aging in COVID-19: Vulnerability, immunity and intervention. **Ageing Research Reviews**, 65:101205, 2021. Doi: 10.1016/j.arr.2020.101205. Epub 2020 Oct 31.

CLASSEN, A.; LLOBERAS, J.; CELADA, A. Macrophage Activation: Classical vs. Alternative Macrophages and Dendritic Cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 531, 2009. Doi: 10.1007/978-1-59745-396-7\_3.

CLEGG, A. et al. Frailty in elderly people. **Lancet**, v.381, p.752-62, 2013. Doi: 10.1016/S0140-6736(12)62167-9.

CONTE, M. et al. Mitochondria, immunosenescence and inflammaging: a role for mitokines? **Seminars in Immunopathology**, v.42, p.607–617, 2020. Doi: 10.1007/s00281-020-00813-0

CORTÉS-MARTÍN, A. et al. Where to look into the puzzle of polyphenols and health? The postbiotics and gut microbiota associated with human metabotypes. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.64, n.9, p. 1-17, 2020. Doi:10.1002/mnfr.201900952.

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, n.4, p.434-61, 2010.

CRUZ, I. B. M. Genetics of aging and its impact on human longevity: theories and evidences that helps to prevent age-associated diseases. **PAJAR - Pan American Journal of Aging Research**, v.2, n.), p.3-14, 2015. Doi: 10.15448/2357-9641.2014.1.20082.

DELA CRUZ, C. S; KANG, M. Mitochondrial dysfunction and damage associated molecular patterns (DAMPs) in chronic inflammatory diseases. **Mitochondrion**, v.41, p.37-44, 2018. Doi: 10.1016/j.mito.2017.12.001. Epub 2017 Dec 6.

DI IORIO, A. et al. Serum IL-1 $\beta$  levels in health and disease: a population-based study. “The InCHIANTI study”. **Cytokine**, v.22, n.6, p.198-205, 2003. Doi: 10.1016/S1043-4666(03)00152-2.

DORRINGTON, M. G.; BOWDISH, D. M. Immunosenescence and novel vaccination strategies for the elderly. **Frontiers in Immunology**, v.4, n.171, 2013. Doi: 10.3389/fimmu.2013.00171.

DUARTE, T. et al. Ziprasidone, a second-generation antipsychotic drug, triggers a macrophage inflammatory response in vitro. **Cytokine**, v.106, p.101-107, 2018. Doi:

ENGELMANN, P. et al. Phenotypic and functional characterization of earthworm coelomocyte subsets: linking light scatter-based cell typing and imaging of the sorted populations. **Developmental and comparative immunology**, v.65, p.41–52, 2016. Doi: 10.1016/j.dci.2016.06.017.

FABBRI, E. et al. Aging and Multimorbidity: New Tasks, Priorities, and Frontiers for Integrated Gerontological and Clinical Research. **Journal of the American Medical Directors Association**, v.16, n.8, p.640-7, 2015. Doi: 10.1016/j.jamda.2015.03.013. Epub 2015 May 7.

FERRUCCI, L. et al. Serum IL-6 level and the development of disability in older persons. **Journal of American Geriatrics Society**, v.47, n.6, p.639-46, 1999. doi: 10.1111/j.1532-5415.1999.tb01583.x.

FOUGÈRE, B. et al. Inflammation: Accelerator of Biological Aging. **The Journals of Gerontology: Series A**, v.72, n 9, p.1218-1225, 2017. Doi: 10.1093/gerona/glw240.

FRAGA, C. G. et al. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. **Food and Function**, v.10, p.514-528, 2019. Doi: 10.1039/C8FO01997E.

FRANCESCHI, C. et al. Inflammaging. An evolutionary perspective on immunosenescence. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v.908, p.244-54, 2000. Doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x.

FRANCESCHI, C.; CAMPISI, J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. **Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES**, v.69 (Suppl 1):S4-9, 2014. Doi:10.1093/gerona/glu057.

FÜLÖP, T. et al. The Role of Immunosenescence in the Development of Age-Related Diseases. **Revista de Investigación Clínica**,v.68, n.2, p.84-91, 2016.

GOLIA, E. et al. Inflammation and cardiovascular disease: from pathogenesis to therapeutic target. **Current Atherosclerosis Reports**, v.16, n.9:435, 2014. Doi: 10.1007/s11883-014-0435-z.

GROH, L. et al. Monocyte and macrophage immunometabolism in atherosclerosis. **Seminars in Immunopathology**, v.40, n.2, p.203-214, 2018. Doi: 10.1007/s00281-017-0656-7. Epub 2017 Oct 2.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 54, p.469–87, 2003.

HALVERSON, T. W. et al. DNA is an antimicrobial component of neutrophil extracellular traps. **PLoS Pathogens**, 11:e1004593, 2015. Doi: 10.1371/journal.ppat.1004593.

HOMA, J. Earthworm coelomocyte extracellular traps: structural and functional similarities with neutrophil NETs. **Cell and Tissue Research**, v.371, n.3, p.407-414, 2018. Doi: 10.1007/s00441-018-2787-0.

HUSSAIN, T. et al. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016. Doi: 10.1155/2016/7432797.

HWANG, J. H. et al. Caffeine prevents LPS-induced inflammatory responses in RAW264.7 cells and zebrafish. **Chemico-biological Interactions**, v.248, p.1–7, 2016. Doi: 10.1016/j.cbi.2016.01.020.

IGLESIAS, D. E. et al. (+)-Catechin inhibits heart mitochondrial complex i and nitric oxide synthase: Functional consequences on membrane potential and hydrogen peroxide production. **Food & Functional**, v.10, p.2528–37, 2019. Doi: 10.1039/c8fo01843j.

JOSEPH, S. V.; EDIRISINGHE, I.; BURTON-FREEMAN, B. M. Fruit Polyphenols: A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.56, n.3, p.419-444, 2016. Doi: 10.1080/10408398.2013.767221.

KANDOLA, K.; BOWMAN, A.; BIRCH-MACHIN, M. A. Oxidative stress – a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v.37 (Suppl. 2), p.1-8. Doi: 10.1111/ics.12287.

KAWABATA, K.; YOSHIOKA, Y.; TERAOKA, J. Role of intestinal microbiota in the bioavailability and physiological functions of dietary polyphenols. **Molecules**, v. 24, n.2:370, 2019. Doi:10.3390/molecules24020370.

KENNEDY, B. K. et al. Aging: a common driver of chronic diseases and a target for novel interventions. **Cell**, v.159, n.4, p.709-713, 2014. Doi: 10.1016/j.cell.2014.10.039.

KENNY, E. F. et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. **Cell Biology, Immunology and Inflammation**. Elife 6, 2017. Doi: 10.7554/eLife.24437.

KLINKE, K. A.; BOWDISH, D. M. E. Infection in an aging population. **Current Opinion in Microbiology**, v.29, p.63-7, 2016. Doi: 10.1016/j.mib.2015.11.003. Epub 2015 Dec 11.

KOBAYASHI, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v.88, p.1157–62, 2010. Doi: 10.1189/jlb.0310149.

KOCH, W. et al. Green Tea Quality Evaluation Based on Its Catechins and Metals Composition in Combination with Chemometric Analysis. **Molecules**, 23, 1689, 2018. Doi:10.3390/molecules23071689.

KREWER, C. D. C. et al. Guarana, a supplement rich in caffeine and catechin, modulates cytokines: Evidence from human in vitro and in vivo protocols. **European Food Research and Technology**, v.239, p.49-57, 2014. Doi: 10.1007/s00217-014-2182-3.

KURIYAMA, S. et al. Green Tea Consumption and Mortality Due to Cardiovascular Disease, Cancer, and All Causes in Japan The Ohsaki Study. **Journal of the American Medical Association**, v.296, n.10, 2006. Doi: 10.1001/jama.296.10.1255.

LARBI, A.; FULOP, T. From “truly naïve” to “exhausted senescent” T cells: when markers predict functionality. **Cytometry A**, v.85, p.25-35, 2014. Doi: 10.1002/cyto.a.22351.

LI, Y. et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. **Nutrients**, v.8, n.3:167, 2016. Doi: 10.3390/nu8030167.

LIMA, M. E. et al. Ilex paraguariensis extract increases lifespan and protects against the toxic effects caused by paraquat in caenorhabditis elegans. **International journal of environmental research and public health**, v.11, p.10091–104, 2014. Doi: 10.3390/ijerph111010091.

LIND, M. et al. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? **Biomédecine & pharmacothérapie**, v.93, p.370–5, 2017. Doi: 10.1016/j.biopha.2017.06.036.

MADEIRA, M. H. et al. “Having a coffee break: The impact of caffeine consumption on microglia-mediated inflammation in neurodegenerative diseases”. **Mediators of Inflammation**, article ID 4761081, 2017. Doi: 10.1155/2017/4761081.

MALEKI, S. J.; CRESPO, J. F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v.299:125124, 2019. Doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125124. Epub 2019 Jul 3.

MARTINI, D. et al. Coffee consumption and oxidative stress: A review of human intervention studies. **Molecules**, v.21, 2016. Doi: 10.3390/molecules21080979.

MINIHANE, A. M. et al. Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. **British Journal of Nutrition**, v.114, p.999–1012, 2015. Doi:10.1017/S0007114515002093.

MIRANDA, G. M. D.; MENDES, A. C.; SILVA, A. L. A. Population aging in Brazil: current and future social challenges and consequences. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**. v.19, n.03, 2016. Doi: 10.1590/1809-98232016019.150140.

MISHRA, B. B.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Free phenolics and polyphenol oxidase (PPO): The factors affecting post-cut browning in eggplant (*Solanum melongena*). **Food Chemistry**, v.139, n.1-4, p.105-114, 2013. Doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.074.

MONTGOMERY, R. R.; SHAW, A. C. Paradoxical changes in innate immunity in aging: recent progress and new directions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 98, p.937-43, 2015. Doi: 10.1189/jlb.5MR0315-104R.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v.8, n.12, p.958-69, 2008. Doi: 10.1038/nri2448.

MÜLLER, D. N. et al. Sodium in the microenvironment regulates immune responses and tissue homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v.19, n.4, p.243-254, 2019. Doi: 10.1038/s41577-018-0113-4.

NATSUME, M. Polyphenols: Inflammation. **Current pharmaceutical design**, v.24, n.2, p.191-202, 2018. Doi: 10.2174/1381612823666171109104141.

NEVEU, V. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods, **Database**, 2010, bap024. Doi: 10.1093/database/bap024.

NIKOLICH-ŽUGICH, J. The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system. **Nature Immunology**, v.19, p.10-19, 2018. Doi: 10.1038/s41590-017-0006-x.

OHISHI, T. et al. Anti-inflammatory Action of Green Tea. **Anti-inflammatory and Anti-allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v.15, n.2, p.74-90, 2016. Doi: 10.2174/1871523015666160915154443.

PAN, Y. et al. Polyphenols in Liubao tea can prevent CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage in mice through its antioxidant capacities. **Nutrients**, v.10, p.1–17, 2018. Doi: 10.3390/nu10091280.

PANSARASA, O et al. Altered immune system in frailty: Genetics and diet may influence inflammation. **Ageing Research Reviews**, v.54:100935. Doi: 10.1016/j.arr.2019.100935, 2019. Epub 2019 Jul 18.

PANSARASA, O. et al. Altered immune system in frailty: Genetics and diet may influence inflammation. **Ageing Research Reviews**, v.54:100935, 2019. Doi: 10.1016/j.arr.2019.100935. Epub 2019 Jul 18.

PAWELEC, G. Age and immunity: What is “immunosenescence”? **Experimental Gerontology**, v.105, p.4-9, 2018. Doi: 10.1016/j.exger.2017.10.024

PAWELEC, G.; GOLDECK, D.; DERHOVANESSIAN, E. Inflammation, ageing and chronic disease. **Current Opinion in Immunology**, v.29, p.23-8, 2014. Doi: 10.1016/j.coi.2014.03.007.

PELUSO, I. et al. From Oxidative Stress to Ageing via Lifestyle, Nutraceuticals, Polipharmacy, and Neuropsychological Factors. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Article ID 6352689, 2018. Doi: 10.1155/2018/6352689.

PELUSO, I.; SERAFINI, M. Antioxidants from black and green tea: from dietary modulation of oxidative stress to pharmacological mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, v.174, p.1195–208, 2017. Doi: 10.1111/bph.13649.

ROBINSON, W. H. et al. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. **Nature Reviews: Rheumatology**, v.12, n.10, p.580-592, 2016. Doi: 10.1038/nrrheum.2016.136.

RODRIGUES, L. P. et al. Hallmarks of aging and immunosenescence: Connecting the dots. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v., 59, p.9-21, 2021. Doi: 10.1016/j.cytogfr.2021.01.006.

ROTHWELL, J. A. et al. Phenol-Explorer 2.0: a major update of the Phenol-Explorer database integrating data on polyphenol metabolism and pharmacokinetics in humans and experimental animals, **Database**, 2012, bas031. Doi: 10.1093/database/bas031.

ROTHWELL, J. A. et al. Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content, **Database**, 2013, bat070. Doi: 10.1093/database/bat070.

RUSKOVSKA, T.; MAKSIMOVA, V.; MILENKOVIC, D. Polyphenols in human nutrition: From the in vitro antioxidant capacity to the beneficial effects on cardiometabolic health and related inter-individual variability - An overview and perspective. **British Journal of Nutrition**, v.123, p.241–54, 2020. Doi: 10.1017/S0007114519002733.

SAQIB, U. et al. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. **Oncotarget**, v.9, n.25, p.17937-17950, 2018. Doi: 10.18632/oncotarget.24788.

SCHIMPL, F. C. et al. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v.150, n1. P.14-31, 2013. Doi: 10.1016/j.jep.2013.08.023.

SCHIMPL, F. C. et al. Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v.150, n.1, p.14-31, 2013. Doi: 10.1016/j.jep.2013.08.023.

SCHROTER, H. et al. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.103, n.4, p.1024-9, 2006. doi: 10.1073/pnas.0510168103. Epub 2006 Jan 17.

SOLANA, R et al. Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. **Seminars in Immunology**, v.24, p.331-41, 2012. Doi: 10.1016/j.smim.2012.04.008.

SOLLBERGER, G.; TILLEY, D. O.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. **Developmental Cell**, v.44, n.5, p.542-553, 2018. Doi: 10.1016/j.devcel.2018.01.019.



SØRENSEN, O. E.; BORREGAARD, N. Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils. **Journal of Clinical Investigation**, v.126, n.5, p.1612-20, 2016. Doi: 10.1172/JCI84538. Epub 2016 May 2.

SOYSAL, P. et al. Inflammation and frailty in the elderly: A systematic review and meta-analysis. **Ageing Research Reviews**, v.31, p.1-8, 2016. Doi: 10.1016/j.arr.2016.08.006.

STEINBERG, B. E.; GRINSTEIN, S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment**, v.27, n.379:pe11, 2007. Doi: 10.1126/stke.3792007pe11.

TAHAGHOGHI-HAJGHORBANI, S. et al. The role of dysregulated immune responses in COVID-19 pathogenesis. **Virus Research**, v.290:198197, 2020. Doi: 10.1016/j.virusres.2020.198197. Epub 2020 Oct 16.

TAKEI, K. et al. The Synaptic Vesicle Cycle: A Single Vesicle Budding Step Involving Clathrin and Dynamin. **The Journal of Cell Biology**, v.133, n.6, p.1237-1250, 1996. Doi: 10.1083/jcb.133.6.1237.

TONET, A. C.; NÓBREGA, O. T. Imunossenescência: a relação entre leucócitos, citocinas e doenças crônicas. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v.11, n.2, p. 259-273, 2008.

UNITED NATIONS SECRETARIAT, E.S.A. **World Population Prospects: The 2017 Revision**, Key Findings and Advance Tables, 2017.

VALEMBOIS, P.; LASSÈGUES, M.; ROCH, P. Formation of brown bodies in the coelomic cavity of the earthworm *Eisenia fetida andrei* and attendant changes in shape and adhesive capacity of constitutive cells. **Developmental and comparative immunology**, v.16, n.2-3, p.95-101, 1992. Doi: 10.1016/0145-305x(92)90010-a.

van DAM, R. M., HU, F. B., WILLETT, W. C. Coffee, Caffeine, and Health. **The New England Journal of Medicine**, v.383, p.369-78, 2020. Doi: 10.1056/NEJMra1816604.

VARADHAN, R. et al. Simple Biologically Informed Inflammatory Index of Two Serum Cytokines Predicts 10 Year All-Cause Mortality in Older Adults. **The Journals of Gerontology: Series A**, v.69A, n.2, p.165-173, 2014. Doi: 10.1093/gerona/glt023.

VIRTUOSO, J. F. et al. Grip strength and physical fitness: a predictive study with active elderly. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v.17, n.4, p.775-784, 2014. Doi: 10.1590/1809-9823.2014.13183.

WEISKIRCHEN,S.; WEISKIRCHEN, R. Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy? **Advances in Nutrition**, v.7, n.4, p.706–718, 2016. Doi: 10.3945/an.115.011627.

WEYH, C. et al. Physical Activity and Diet Shape the Immune System during Aging. **Nutrients**, v.12, n.3:622, 2020. Doi: 10.3390/nu12030622.

WEYH, C.; KRÜGER, K.; STRASSER, B. Physical activity and diet shape the immune system during Aging. **Nutrients**. v.12, n.3:622, 2020. Doi: 10.3390/nu12030622.

WILLIAMSON, G. The role of polyphenols in modern nutrition. **Nutrition Bulletin**, v.42, p.226–35, 2017. Doi: 10.1111/nbu.12278.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Envelhecimento ativo: uma política de saúde**. World Health Organization; tradução Suzana Gontijo. – Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2005. 60p.: il.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. A. Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature*, v.496, p.445-455, 2013. Doi: 10.1038/nature12034.

YAHFOUFI, N. et al. The immunomodulatory and anti-Inflammatory role of polyphenols. **Nutrients**, v.10, n.11:1618, 2018. Doi: 10.3390/nu10111618.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v.33, p.337–49, 2002. Doi: 10.1016/s0891-5849(02)00905-x.

ZERN, T. L. et a. Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. **Journal of Nutrition**, v.135, n.8, p.1911–1917, 2005. Doi: 10.1093/jn/135.8.1911.

ZHAO, Y. et al. “The beneficial effects of quercetin, curcumin, and resveratrol in obesity”. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017. Doi: 10.1155/2017/1459497.

ZUO, L. et al. Inflammaging and Oxidative Stress in Human Diseases: From Molecular Mechanisms to Novel Treatments. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, n.18:4472, 2019. Doi: 10.3390/ijms20184472.

## ANEXO 1

## ARTIGO

ALVES, A. O. et al. Caffeinated beverages contribute to a more efficient inflammatory response: Evidence from human and earthworm immune cells. **Food Chemistry Toxicology**, v.134:110809, 2019. Doi: 10.1016/j.fct.2019.110809. Epub 2019 Sep 6.



Caffeinated beverages contribute to a more efficient inflammatory response:  
Evidence from human and earthworm immune cells



Audrei de Oliveira Alves<sup>a,b</sup>, Grazielle Castagna Cezimbra Weis<sup>a,c</sup>, Taís Cristina Unfer<sup>d</sup>, Charles Elias Assmann<sup>a,e</sup>, Fernanda Barbisan<sup>a,f</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>a</sup>, Bruna Chitolina<sup>a</sup>, Thiago Duarte<sup>a</sup>, Euler Esteves Ribeiro-Filho<sup>g</sup>, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte<sup>b</sup>, Aline Boligon<sup>a</sup>, Eduardo Vélez-Martin<sup>h</sup>, Taís Vidal Palma<sup>c</sup>, Cinthia Melazzo de Andrade<sup>e</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>a,b,f,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, SE, Brazil

<sup>e</sup> Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>f</sup> Programa de Pós-Graduação em Gerontologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

<sup>g</sup> Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Universidade Federal do Amazonas, AM, Brazil

<sup>h</sup> Ilex Consultoria Científica, Porto Alegre, RS, Brazil

## ANEXO 2

## CAPÍTULO DE LIVRO

CADONÁ, F. C. et al. Functional and Medicinal Properties of Caffeine-Based Common Beverages. In: Alexandru Grumezescu; Alina-Maria Holban. (Org.). **Caffeinated and Cocoa Based Beverages**. 1ed. Cambridge: Elsevier, 2019, v. 8, p. 1-46. Doi: 10.1016/B978-0-12-815864-7.00001-5

## 1

## FUNCTIONAL AND MEDICINAL PROPERTIES OF CAFFEINE- BASED COMMON BEVERAGES

Francine Carla Cadoná\*, Grazielle Castagna Cezimbra Weis<sup>†,\*</sup>, Charles Elias Assmann<sup>†,§</sup>, Audrei de Oliveira Alves<sup>†,¶</sup>, Beatriz da Silva Rosa Bonadiman<sup>†,¶</sup>, Alencar Kolinski Machado<sup>||</sup>, Marco Aurélio Echart Montano\*, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>†,§,¶</sup>

\*Graduate Program in Biosciences and Health, University of the West of Santa Catarina, Joaçaba, SC, Brazil <sup>†</sup>Biogenomics Laboratory, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil <sup>‡</sup>Graduate Program of Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil <sup>§</sup>Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil <sup>¶</sup>Graduate Program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil <sup>||</sup>Franciscan University, Santa Maria, RS, Brazil

**ANEXO 3****CAPÍTULO DE LIVRO**

ASSMANN, C. E. et al. The Potential Clinical Relevance of Amazonian Fruits and Seeds and their Bioactive Compounds on Psychiatric Disorders and Neuropathologies. In: Danik M. Martirosyan; Uma Naidoo. (Org.). **Functional Foods and Mental Health**. 1ed. Dallas: Food Science Publisher, 2019, v. 7, p. 1-448.

---

Functional Foods and Mental Health – 2019

First Edition

# 15

---

## **The Potential Clinical Relevance of Amazonian Fruits and Seeds and their Bioactive Compounds on Psychiatric Disorders and Neuropathologies**

Charles Elias Assmann<sup>1</sup>, Grazielle Castagna Cezimbra Weis<sup>1</sup>, Audrei de Oliveira Alves<sup>1</sup>,  
Beatriz da Silva Rosa Bonadiman<sup>2</sup>, Vera Maria Melchior Morsch<sup>1</sup>, Maria Rosa Chitolina<sup>1</sup>,  
Euler Esteves Ribeiro<sup>3</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>1</sup>

## ANEXO 4

### CAPÍTULO DE LIVRO

ASSMANN et al. Anthocyanins and Flavonols: Therapeutic Implications of Natural Compounds on Cancer. In: Chakraborti S.; Ray B.K.; Roychowdhury S.. (Org.). **Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Mechanistic Aspects**. 1ed.Singapore: Springer, 2021, v. 1, p. 1-14. Doi: 10.1007/978-981-15-4501-6\_139-1.




---

## Anthocyanins and Flavonols: Therapeutic Implications of Natural Compounds on Cancer

Therapeutic implications in ROS induced cancer

Charles Elias Assmann, Grazielle Castagna Cezimbra Weis, Jéssica Righi da Rosa, Beatriz da Silva Rosa Bonadiman, Audrei de Oliveira Alves, Felipe Tecchio Borsoi, and Margarete Dulce Bagatini

### Contents

Introduction .....	2
Anthocyanins and Anthocyanidins: General Overview .....	3
Cyanidin and Cyanidin-3-O-Glicoside .....	5
Delphinidin and Delphinidin-3-O-Glucoside .....	7
Flavonols: General Overview .....	8
Kaempferol .....	9
Quercetin .....	9
Conclusion .....	11
References .....	11

## ANEXO 5

### CAPÍTULO DE LIVRO

DA SILVA ROSA BONADIMAN, B. et al. Effects of caffeic acid on oxidative balance and cancer. **Cancer**. 2ed.: Elsevier, 592p, 2021. p. 291-300.

---

#### Chapter 26

## Effects of caffeic acid on oxidative balance and cancer

Beatriz da Silva Rosa Bonadiman<sup>a</sup>, Grazielle Castagna Cezimbra Weis<sup>b</sup>, Jéssica Righi da Rosa<sup>b</sup>, Charles Elias Assmann<sup>c</sup>, Audrei de Oliveira Alves<sup>d</sup>, Pâmela Longhi<sup>e</sup>, and Margarete Dulce Bagatini<sup>f</sup>

<sup>a</sup>Department of Biological Science: Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil. <sup>b</sup>Department of Technology and Food Science, Rural Science Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. <sup>c</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, PPGBTox, CCNE, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. <sup>d</sup>Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. <sup>e</sup>Department Life Science and Health, University of the West of Santa Catarina, Xanxerê, SC, Brazil. <sup>f</sup>Academic Coordination, Campus Chapecó, Federal University of Fronteira Sul, Chapecó, SC, Brazil

## ANEXO 6

## ARTIGO DE REVISÃO

ASSMANN et al. Amazon-derived nutraceuticals: promises to mitigate chronic inflammatory states and neuroinflammation. **Neurochemistry international**, v. 148, p. 105085, 2021. Doi: 10.1016/j.neuint.2021.105085.

Neurochemistry International 148 (2021) 105085



## Amazon-derived nutraceuticals: Promises to mitigate chronic inflammatory states and neuroinflammation

Charles Elias Assmann<sup>a,1</sup>, Grazielle Castagna Cezimbra Weis<sup>b,1</sup>, Jéssica Righi da Rosa<sup>b</sup>, Beatriz da Silva Rosa Bonadiman<sup>c</sup>, Audrei de Oliveira Alves<sup>d</sup>, Maria Rosa Chitolina Schetinger<sup>a</sup>, Euler Esteves Ribeiro<sup>e</sup>, Vera Maria Melchior Morsch<sup>a,\*,†</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>d,f,†</sup>

<sup>a</sup> Post-Graduate Program in Biological Sciences, Toxicological Biochemistry, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Post-Graduate Program in Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

<sup>c</sup> Post-Graduate Program in Biochemistry, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil

<sup>d</sup> Post-Graduate Program in Pharmacology, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

<sup>e</sup> Third Age Open University (UnATI), Manaus, AM, Brazil

<sup>f</sup> Post-Graduate Program in Gerontology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil