

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MEDICINA MOLECULAR
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

Jessika Cristina Bridi

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CAFEÍNA NA LONGEVIDADE DO
NEMATÓDEO *Caenorhabditis elegans***

Belo Horizonte

2014

Jessika Cristina Bridi

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CAFEÍNA NA LONGEVIDADE DO
NEMATÓDEO *Caenorhabditis elegans***

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Dr. Marco Aurélio Romano Silva e coorientação do Dr. Alexandre Guimarães de Almeida Barros.

Belo Horizonte

2014

Bridi, Jessika Cristina.
B852a Avaliação dos efeitos da cafeína na longevidade do nematódeo
Caenorhabditis elegans [manuscrito]. / Jessika Cristina Bridi. -- Belo Horizonte: 2014.
72f.: il.
Orientador: Marco Aurélio Romano Silva.
Co-Orientador: Alexandre Guimarães de Almeida Barros.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Cafeína/farmacologia. 2. Longevidade. 3. Caenorhabditis elegans. 4. Nematóides. 5. Adenosina. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Silva, Marco Aurélio Romano. II. Barros, Alexandre Guimarães de Almeida. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.
NLM: QV 107

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Clara e Euzébio, por todo o apoio, carinho, atenção e amor que me foram transmitidos, mesmo tão longe de casa. Por participar da minha vida acadêmica ativamente, sempre tentar prover o melhor. Ao meu irmão Leandro, pelas palavras de carinho e amor. Aos meus avós, pelo apoio e carinho.

Ao Vini, pelo amor, companheirismo, apoio, compreensão e por ser meu porto seguro, sempre tentando amenizar as durezas de estar longe da família.

Ao Professor Marco Aurélio, por contribuir na minha formação, pela oportunidade, compreensão e confiança concedidos a mim no desenvolvimento deste trabalho. Aos professores, Marcus Vinícius e Débora pelo carinho e atenção.

Ao Alexandre, coorientador e amigo, meu muito obrigada pela valiosa orientação e compreensão, por todas nossas discussões e conversas. Por ter me ensinado a reformular a maneira de pesquisar: qualidade e não quantidade! Obrigada por acreditar no meu trabalho.

Aos amigos do lab, Elizete, Dani, Cinthia, Vitor, Flávia, Érika, António, Gabriel, Danielle, Pati, Simone, Magno, Nancy, Manuel, Célio, Luciene, Karen e Paulo. Por me receberem tão bem e se tornarem amigos tão especiais. Pela alegria de todos os dias, por serem a minha família e claro, pelos ensinamentos e discussões.

A Dani, pela bancada, salvou minha coluna durante as intermináveis horas de trabalho. Muito obrigada.

As minhas gurias, Letícia e Júlia, pela ajuda, amizade e convivência maravilhosa que tivemos durante este período.

A Priscila, minha mãe elegans, obrigada por tudo.

Ao Professor Félix, meu pai científico, que me acolheu e concedeu a oportunidade de aprender muito durante a graduação.

Aos amigos, Klyca, Vagner, Talita e Tiago, pelo carinho e amizade.

A Deus, por tornar esta etapa possível e por colocar tantos anjos na minha vida.

Agradeço ainda a todos que não citei aqui, mas que de alguma forma contribuíram para a conclusão de mais uma etapa.

RESUMO

A cafeína está presente em vários produtos consumidos na dieta, sendo considerada a droga psicoativa mais utilizada em todo o mundo. Em mamíferos, doses baixas de cafeína promovem o antagonismo dos receptores de adenosina, principalmente A_1 e A_{2A} . Estudos em modelos animais sugerem que a cafeína tem impacto positivo na evolução de doenças neuropsiquiátricas como Alzheimer, Parkinson e Huntington e, ainda, em doenças crônicas (como diabetes, doenças inflamatórias e acidente vascular cerebral). Estas doenças são frequentemente associadas ao processo de envelhecimento, que pode ser caracterizado pela deterioração progressiva do organismo.

O nematódeo *Caenorhabditis elegans* é um modelo poderoso para o estudo do envelhecimento, visto que possui características experimentais que permitem explorar os determinantes da longevidade. No verme, o envelhecimento é controlado por diversos fatores como, por exemplo, a via da insulina/IGF-1.

Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição à cafeína na longevidade do nematódeo *Caenorhabditis elegans* e seus determinantes de. Foi verificado que a cafeína aumentou o tempo de vida do verme seguindo padrão dose-dependente. Este efeito, por sua vez, é dependente da exposição à substância durante toda a vida do animal e é mediado, em parte, pela atividade da via insulina/IGF-1. Além disso, a exposição à cafeína retardou o desenvolvimento larval, reduziu o número de progênes viáveis e o comprimento dos animais. Curiosamente, a adenosina foi capaz de reverter o aumento da longevidade promovido pela cafeína e recuperou parcialmente a diminuição do número de progênes. Este fato sugere que, como já observado em mamíferos, a cafeína partilha, se não o mesmo, algum alvo molecular da adenosina.

A elucidação dos mecanismos através dos quais a exposição à cafeína resulta nos fenótipos observados pode revelar novos genes determinantes do processo de envelhecimento. Além disso, devido ao alto consumo mundial de cafeína, se torna necessário conhecer e, inclusive, modular os alvos moleculares, visando o aumento da longevidade.

Palavras-chave: Cafeína. Longevidade. *Caenorhabditis elegans*. Adenosina.

ABSTRACT

Caffeine is present in large amount of products consumed in the diet and it has been considered the most widely used psychoactive drug worldwide. In mammals, low doses of caffeine promote antagonism of adenosine receptors, mainly A_1 and A_{2A} . Studies in animal models suggest that caffeine may positive impact on development of neuropsychiatric diseases like Alzheimer, Parkinson, Huntington and chronic diseases (diabetes, inflammatory diseases and stroke). These pathologies are frequently associated to aging process which can be characterized by the organism progressive deterioration.

The nematode *Caenorhabditis elegans* is a powerful model for aging studies, since it has experimental features which allow to explore the aging determinants. In the worm, aging is controlled by many factors, for instance, the insulin/IGF-1 pathway.

Then, this study aimed to evaluate the effects of exposure to caffeine on the nematode *Caenorhabditis elegans* longevity and their determinants. It was observed that caffeine increased the lifespan following dose-dependent pattern. This effect is reliant on the exposure to this substance throughout the entire the animal life and it is mediated, in part, by insulin/IGF-1 activity. Furthermore, the exposition to caffeine delayed the larval development, reduced the number of offspring and the animals' length. Interestingly, adenosine was able to reverse the increase on longevity promoted by caffeine and partially recovered the decrease of offspring. This fact suggests that, as observed in mammals, caffeine shares, if not the same, some molecular target from adenosine.

The clarification of the mechanisms that the caffeine exposition outcome on the observed phenotypes can disclose new determinant genes from aging process. Moreover, due to the high world caffeine consumption, it becomes necessary to understand and even modulate the molecular targets aiming for higher longevity.

Keywords: Caffeine. Longevity. *Caenorhabditis elegans*. Adenosine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura química da cafeína.....	13
Figura 2 Metabolismo da cafeína em humanos.....	15
Figura 3 Ações de diferentes concentrações de cafeína sobre distintos alvos moleculares.....	17
Figura 4 Representação esquemática dos efeitos bifásicos da cafeína em ratos e humanos.....	19
Figura 5 O nematódeo <i>Caenorhabditis elegans</i>	27
Figura 6 Descrição simplificada da transdução de sinal da via insulina/IGF-1 (IIS) em invertebrados e mamíferos.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Média diária de consumo de cafeína	14
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A₁** - Receptor de adenosina 1
- A_{2A}** - Receptor de adenosina 2A
- A_{2B}** - Receptor de adenosina 2B
- A₃** - Receptor de adenosina 3
- AFD** - Neurônios termosensores AFD
- AKT1 – 2 / PKB1 – 2** - Proteína quinase B, isoforma 1 e 2
- AMPc** - Monofosfato cíclico de adenosina
- EROs** - Espécies reativas de oxigênio
- FoxA** - Fator de transcrição “*Forkhead box A*”
- FoxO** - Fator de transcrição “*Forkhead box O*”
- GABA** - Ácido γ -aminobutírico
- GABA_A** - Receptor Ácido γ -aminobutírico do tipo A
- IIS**- Via insulina/IGF-1
- INS1-38** - Ligantes semelhantes a insulina
- IP₃** - Inositol trifosfato
- IST-1** - Substrato do receptor da insulina
- PDK-1** - Proteína quinase 1 dependente de fosfoinositídeo-3
- PHA-4** - Membro do grupo de fatores de transcrição FoxA
- PIP2** - Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2)
- PIP3** - Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
- PKB1-2** - Proteína quinase B, isoformas 1 e 2
- PTEN** – Proteína fosfatase homóloga a tensina
- Sod-1**- Enzima superóxido dismutase 1
- Sod-2** - Enzima superóxido dismutase 2
- Sod-4** - Enzima superóxido dismutase 4

Sod-5 - Enzima superóxido dismutase 5

A β PP- Precursor da proteína beta-amilóide

A β 1-40 - Proteína beta-amilóide com 40 resíduos de aminoácidos

A β 1-42- Proteína beta-amilóide com 42 resíduos de aminoácidos

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	12
1 Introdução	13
1.1 Cafeína	13
1.1.1 Metabolismo	14
1.1.2 Mecanismos de ação e efeitos biológicos	16
1.1.3 Efeitos da cafeína <i>in vivo</i>	18
1.1.4 Cafeína: implicações da ingestão.....	19
1.2 Envelhecimento	22
1.2.1 Teorias do envelhecimento	22
1.2.1.1 Envelhecimento programado.....	23
1.2.1.2 Envelhecimento por dano ou erro	24
1.3 <i>Caenorhabditis elegans</i>	26
1.3.1 Modelo experimental para estudo da longevidade	29
1.3.2 Fatores que modulam a longevidade no nematódeo	29
1.3.2.1 Via de sinalização da insulina/IGF-1	29
1.3.2.2 Estresse oxidativo	32
1.3.2.3 Reprodução, alimento e temperatura	32
2 Objetivos	34
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
CAPÍTULO II	35
1 Artigo Científico	36
CAPÍTULO III	59
1 Considerações finais	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo científico ao periódico <i>Neurobiology of aging</i>	70
ANEXO B – Declaração de Aprovação	71
ANEXO C – Ata da Defesa	72

CAPÍTULO I

1 Introdução

1.1 Cafeína

A cafeína é uma substância pertencente à classe das metilxantinas. É conhecida quimicamente como 1,3,7 – trimetilxantina (Figura 1). Além da cafeína, a teobromina e a teofilina também pertencem a esta classe. As metilxantinas são classificadas como alcaloides verdadeiros (alcaloides purínicos) em função da sua atividade biológica, distribuição restrita e presença estrutural de nitrogênio heterocíclico (Rates, 2001).

A cafeína apresenta características comuns à classe como a capacidade de modulação das funções cerebrais e bulbares; estimulação do sistema nervoso central, aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial, redução da fadiga com conseqüente melhora no desempenho mental e motor (Spriet, 1995).

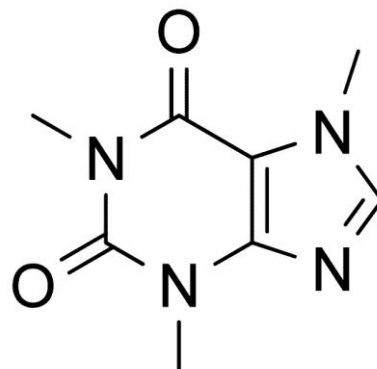


Figura 1 – Fórmula molecular da cafeína (Pohanka e Dobes, 2013)

A cafeína está presente em vários produtos consumidos no cotidiano como café, chás, bebidas energéticas, refrigerantes a base de cola, guaraná, chocolates e, também, combinada com fármacos como dipirona, supressores de apetite e suplementos estimulantes (Fisone, Borgkvist e Usiello, 2004; Fredholm *et al.*, 1999). É encontrada naturalmente em mais de sessenta espécies de plantas; cita-se o café (*Coffea arabica*), guaraná (*Paullinia cupana*), cacau (*Theobroma cacao*), cola (*Cola acuminata*) e erva-mate (*Ilex paraguariensis*) (Moreira, 2013).

Estima-se que 70% da população adulta consome, diariamente, quantidades de cafeína suficientes para afetar as funções cerebrais e o comportamento, sendo

considerada a substância psicoativa mais consumida no mundo (Tabela 1) (Fredholm, 2012).

Tabela 1 - Média diária de consumo de cafeína por indivíduos adultos

País	Adultos (mg/dia)
Dinamarca	390
Finlândia	329
Brasil	300
Suíça	288
França	239
Austrália	232
Canadá	210
Reino Unido	202
Japão	169
Estados Unidos	168
Quênia	50
África do Sul	40
China	16

Fonte: Organização das Nações Unidas (Food and Agriculture organization) de 1995. (Adaptado de Fredholm *et al.*, 1999).

1.1.1 Metabolismo

Em humanos, a cafeína é absorvida primariamente no trato gastrointestinal. Após ingestão oral, 99% da substância é absorvida em aproximadamente 45 minutos (Fisone, Borgkvist e Usiello, 2004; Fredholm *et al.*, 1999). Por apresentar propriedades hidrofóbicas, a cafeína ultrapassa as membranas biológicas e apresenta alto volume de distribuição (Lachance, Marlowe e Waddell, 1983). O pico máximo de concentração plasmática ocorre entre 60 e 90 minutos após ingestão (Bonati *et al.*, 1982; Bracco *et al.*, 1995) e a meia-vida de eliminação é de 5 horas (Charles *et al.*, 2008).

A cafeína tem propriedades farmacocinéticas diferentes quando consumida em altas doses (250-500 mg). Seu *clearance* é significativamente reduzido e a meia-vida de eliminação é prolongada (Heckman, Weil e Gonzalez de Mejia, 2010) devido

à saturação dos metabólitos (Fredholm *et al.*, 1999; Lau, Ma e Falk, 1995). As propriedades farmacocinéticas da cafeína independem da idade, embora, no período neonatal, sua meia-vida seja prolongada devido à imaturidade das vias enzimáticas metabolizadoras hepáticas (citocromo P-450, vias de desmetilação e acetilação) (Aranda *et al.*, 1979).

A cafeína é metabolizada principalmente no fígado. Nos hepatócitos, o processo enzimático de desmetilação gera três metabólitos principais: 3,7-dimetilxantina (teobromina), 1,3-dimetilxantina (teofilina), 1,7-dimetilxantina (paraxantina), sendo que a teofilina e paraxantina possuem atividade farmacológica semelhante à cafeína (Fredholm *et al.*, 1999). Posteriormente, estes metabólitos são transformados em uratos por reações de desmetilação e oxidação (figura 2). Os produtos metabólicos são, então, excretados na urina (Heckman, Weil e Gonzalez de Mejia, 2010). Cerca de 3% da cafeína é excretada na urina na forma inalterada (Heckman, Weil e Gonzalez de Mejia, 2010; Mandel, 2002).

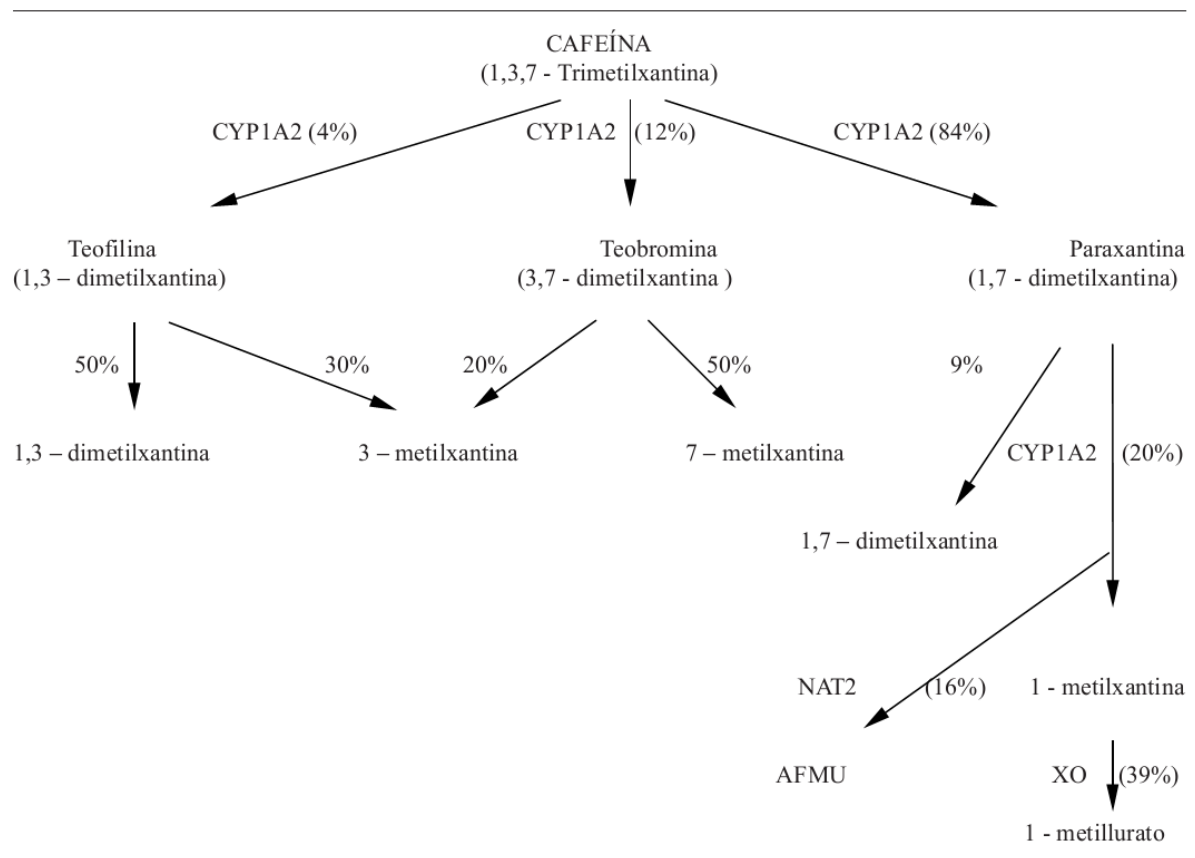


Figura 2. Metabolismo da cafeína em humanos. Os valores expressos em termos percentuais, entre parênteses, representam as quantidades metabolizadas de cada composto (CYP 1A2 – citocromo P450; NAT2 – N-acetiltransferase; XO – xantina oxidase; AFMU – 5-acetilamina-6-formilamina-3-metiluracil) (adaptado de Sinclair e Geiger, 2000).

1.1.2 Mecanismos de ação e efeitos biológicos

A cafeína exibe farmacodinâmica complexa. Seu perfil farmacodinâmico é variável, dependendo da concentração (Figura 3). Nas concentrações plasmáticas alcançadas com o consumo de produtos comuns da dieta (café, chá, refrigerantes), a ação farmacológica principal é sobre o sistema purinérgico; a cafeína antagoniza receptores de adenosina (Fredholm e Hedqvist, 1980; Heckman, Weil e Gonzalez de Mejia, 2010). Em concentrações mais altas, a cafeína inibe a atividade de fosfodiesterases, elevando os níveis de AMPc intracelular, e antagoniza receptores GABA_A (Fredholm *et al.*, 1999). Em concentrações ainda mais elevadas, possivelmente tóxicas, provoca liberação de cálcio dos estoques intracelulares, via ação sobre receptores de rianodina e IP3 (Fredholm e Hedqvist, 1980; Mcpherson *et al.*, 1991). Além destes, a cafeína é capaz de interagir com os sistemas acetilcolinérgico, adrenérgico, noradrenérgico, serotoninérgico, dopaminérgico e glutamatérgico de neurotransmissão (Fredholm *et al.*, 1999).

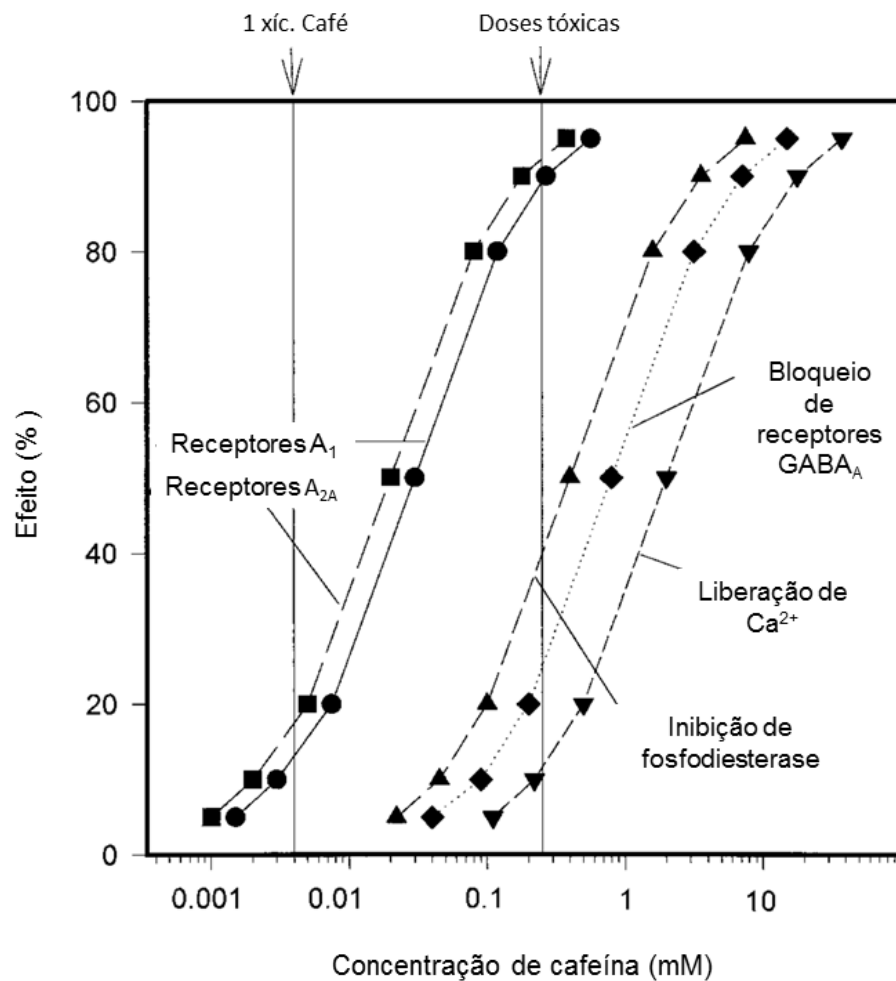


Figura 3 - Ações de diferentes concentrações de cafeína sobre distintos alvos moleculares. Adaptado de (Fredholm *et al.*, 1999)

A adenosina é uma purina que inibe a atividade neuronal em condições fisiológicas (Fisone, Borgkvist e Uziel, 2004). O sistema de sinalização purinérgico utiliza purinas (ATP e adenosina) e pirimidinas (UDP ou UTP) como primeiros mensageiros (Burnstock e Verkhratsky, 2009). As purinas são liberadas de neurônios e células gliais, produzindo efeitos sobre múltiplos sistemas ao se ligarem aos receptores purinérgicos localizados em diversos domínios da superfície das células (Brady *et al.*, 2012). Os principais ligantes para receptores purinérgicos são adenosina, ATP e UTP. O ATP é armazenado em vesículas pelo transportador vesicular de nucleotídeos, fornecendo uma via de liberação exocítica controlada. Também pode ser liberado no espaço extracelular por canais e transportadores. No espaço extracelular, é enzimaticamente hidrolisado gerando adenosina (Brady *et al.*, 2012).

As purinas têm ações nos receptores P1, P2X e P2Y. ATP, ADP, UTP e UDP se ligam principalmente a família P₂. Já a adenosina se liga a quatro receptores (A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃), pertencentes à família P₁ (Brady *et al.*, 2012, p. 382).

Os receptores P1 e P2Y são receptores com sete domínios transmembrana acoplados a proteína G, sendo A₁ à proteína G_i e G_o, A_{2A} à proteína G_S^C e G_{olf}, A_{2B} à proteína G_S^C e A₃ à proteína G₁₃ e G_q. A classe P2X representa os receptores ionotrópicos (catiônicos) sendo composta por sete subunidades P2X1 a P2X7 (Burnstock e Verkhratsky, 2009; Dunwiddie e Masino, 2001)

A adenosina se liga aos receptores A₁ e A_{2A} com alta afinidade (~70 nM e ~150 nM, respectivamente). Já a afinidade de ligação dos receptores A_{2B} e A₃ é muito baixa (~5100 nM e ~6500 nM, respectivamente), assim, em condições fisiológicas, a cafeína antagoniza com grande facilidade os receptores A₁ e A_{2A}, sendo desprezível o antagonismo pela cafeína através dos receptores A_{2B} e A₃ (Dunwiddie e Masino, 2001; Feoktistov e Biaggioni, 1997; Fisone, Borgkvist e Usiello, 2004; Fredholm *et al.*, 1999; Jacobson, 1998).

1.1.3 Efeitos da cafeína *in vivo*

Em humanos e modelos experimentais, os efeitos da cafeína são heterogêneos e bifásicos (figura 4) (Fredholm, 2012; Fredholm *et al.*, 1999). Doses baixas de cafeína exercem efeitos predominantemente estimulantes. Em animais, isto se manifesta com o aumento da atividade locomotora. Em humanos, evidências sugerem efeitos antidepressivos e melhora das funções cognitivas (por ex., flexibilidade cognitiva) (Wei *et al.*, 2011). Em doses elevadas, a cafeína leva ao aumento da ansiedade, disforia e confusão mental (figura 3).

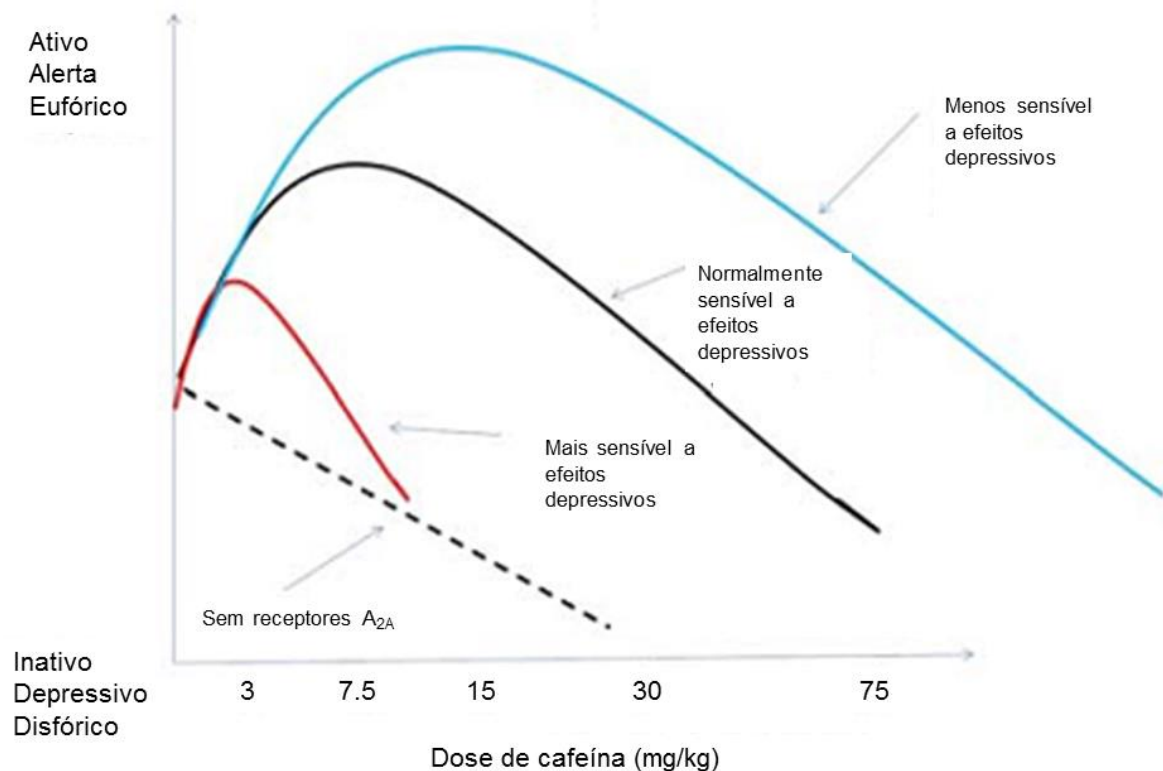


Figura 4 – Representação esquemática dos efeitos bifásicos da cafeína em ratos e humanos. Em doses baixas, a cafeína é predominantemente estimuladora. Em doses mais elevadas, no entanto, existem vários efeitos negativos, incluindo o aumento da ansiedade, disforia e confusão. Adaptado de (Fredholm *et al.*, 2012).

1.1.4 Cafeína: implicações da ingestão

Ao longo das últimas décadas, estudos vêm demonstrando os benefícios do consumo de cafeína em modelos animais e humanos (Cunha e Agostinho, 2010; Freedman *et al.*, 2012). Estudos epidemiológicos recentes revelaram que a ingestão de cafeína reduz o risco de doenças degenerativas como doença de Parkinson, Alzheimer e Huntington (Chen *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Simonin *et al.*, 2013). Um estudo recente realizado por Liu e colaboradores (2012) abordou a relação entre o consumo de cafeína e o risco de desenvolver doença de Parkinson em 304.980 participantes do sexo masculino e feminino. Os participantes foram divididos em coortes de acordo com a quantidade de cafeína consumida, variando de $\leq 17,4$ mg/dia a $\geq 589,8$ mg/dia. A ingestão de cafeína foi inversamente associada ao risco de desenvolver doença de Parkinson em ambos os sexos.

Estudos demonstraram ainda, que a ingestão regular de cafeína tem relação inversa com o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (Dam *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2007), gliomas (Michaud *et al.*, 2010) e está associada à diminuição da prevalência de câncer de pele não-melanoma em mulheres caucasianas (Abel *et al.*, 2007). O estudo realizado por Dam e colaboradores (2006) com 88.259 mulheres americanas entre 26-46 anos, avaliou a relação do consumo de café e a incidência de diabetes mellitus tipo 2. Os resultados sugerem que o consumo moderado de café, tanto cafeinado quanto descafeinado, reduziu o risco de diabetes tipo 2 em mulheres jovens e de meia idade. O efeito observado neste estudo ocorreu de maneira dependente da concentração de cafeína. As mulheres que consumiam mais de quatro xícaras por dia apresentaram risco relativo de desenvolver diabetes tipo 2 em torno de três vezes menor do que o grupo controle (ausência de consumo de café), após correção para os fatores confundidores (ingestão de bebidas alcoólicas, fumo e etc). Contudo, os resultados observados podem estar relacionados, em parte, a outros componentes do café, já que as mulheres que ingeriram café descafeinado também apresentaram redução do risco de desenvolver diabetes tipo 2. No entanto, essa redução foi menor quando comparada ao consumo de café cafeinado (Dam *et al.*, 2006).

Freedman e colaboradores (2012) avaliaram 229.119 homens e 173.141 mulheres, entre 50 e 71 anos, nos Estados Unidos, entre 1995 e 2008, com a finalidade de estudar a associação do consumo de café e o risco de morte. Utilizando modelos ajustados por idade, o risco de morte foi maior entre os participantes que ingeriram café. Como esses participantes também foram mais propensos a fumar, após o ajuste para tabagismo e outros potenciais confundidores, revelou-se uma associação inversa dependente da dose entre o consumo de café e mortalidade total. No sexo masculino, aqueles que ingeriram 6 ou mais xícaras de café/dia apresentaram risco de morte 10% menor que os que não ingeriram café. Já para as mulheres, este percentual aumentou para 15%. Ainda, houve uma relação protetora do café em relação às principais causas de morte: doenças inflamatórias, diabetes, acidente vascular cerebral, traumas, acidentes, exceto câncer. Os autores especulam que o café contém mais de 1000 compostos que podem alterar processos celulares e assim a mortalidade, dentre estes, a própria cafeína (Freedman *et al.*, 2012).

O potencial da cafeína como substância neuroprotetora e sua associação positiva com a redução de doenças crônicas associada à idade tem motivado inúmeros estudos, utilizando modelos animais, objetivando esclarecer os mecanismos moleculares por trás desses fenótipos (Arendash, Schleif e Rezai-Zadeh, 2006).

Pesquisas utilizando roedores, como experimentais de doenças neurodegenerativas, demonstraram que a administração de cafeína atenuou os processos degenerativos (Cunha e Agostinho, 2010). Ratos transgênicos, com mutações no gene da APP (precursor da proteína β -amilóide) (Dewachter, Dorpe e Spittaels, 2000) apresentam vários aspectos clínico-laboratoriais da doença de Alzheimer como alterações em testes de memória de trabalho. O tratamento crônico (seis meses) com cafeína na dose de 1.5 mg (equivalente a 500 mg em humanos) destes ratos, reduziu disfunções cognitivas avaliadas através de comportamentos de aprendizado espacial, memória de referência e reconhecimento, bem como, diminuiu os níveis dos fragmentos solúveis do peptídeo β -amilóide (Arendash, Schleif e Rezai-Zadeh, 2006). Em cultura de células neuronais dos mesmos animais transgênicos, a cafeína foi capaz de reduzir os níveis dos peptídeos A β 1-40 e A β 1-42 (Arendash, Schleif e Rezai-Zadeh, 2006). Em outro estudo, o tratamento agudo com cafeína reduziu os níveis de β -amilóide no plasma e no liquor de ratos modelo para Alzheimer, contudo, sem afetar a cinética de eliminação da proteína β -amilóide, sugerindo redução na síntese da mesma (Cao *et al.*, 2009). Em animais modelos para a doença de Parkinson o tratamento agudo com cafeína reduziu o comprometimento da memória (Gevaerd *et al.*, 2001)

Recentemente, estudos longitudinais reportaram que o consumo diário de cafeína, equivalente a 3 ou mais xícaras de café, reduz o declínio cognitivo em idosos não demenciados (Gelder e Buijsse, 2006; Ritchie *et al.*, 2007). Um dos estudos reporta que as propriedades psicoestimulantes da cafeína parecem reduzir o declínio cognitivo nas mulheres sem demência, especialmente em idades mais tardias (Ritchie *et al.*, 2007).

Apesar do elevado consumo mundial de cafeína e as observações sobre o potencial efeito benéfico em várias doenças crônicas humanas, os mecanismos moleculares pelos quais a cafeína orchestra seus benefícios permanecem pouco esclarecidos.

1.2 Envelhecimento

Uma premissa fundamental da biologia é que cada espécie tem um intervalo de tempo de vida médio determinado. Vários são os fatores que influenciam o *lifespan*, podendo estes serem agrupados em fatores ambientais e genéticos. Por exemplo, épocas de intempéries ambientais reduzem a expectativa de vida de várias espécies. Já as características de determinada espécie, detalhada na carga genética particular, é de extrema relevância; tartarugas podem viver centenas de anos enquanto humanos, nos países com melhores condições de vida, vivem algumas décadas. O tempo de vida não é estático, ele é mutável seguindo a teoria da evolução (Darwin, 1859).

Os organismos passam por diferentes etapas durante o desenvolvimento; fases de maturação/crescimento, reprodução e, finalmente, uma gradual e constante deterioração da capacidade física e mental chamada de envelhecimento. O envelhecimento é marcado pelo aparecimento de várias condições patológicas como câncer, diabetes, acidente vascular cerebral, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Freedman *et al.*, 2012). Tal fato parece ser consequência de uma perda progressiva da capacidade do organismo em manter a homeostase. Dessa forma, esses fatores deletérios se acumulam ao longo dos anos culminando, portanto, na morte (Amrit e May, 2010; Gems e Doonan, 2008).

O fenômeno do envelhecimento foi considerado por muito tempo como um processo inevitável e enfrentado como uma fase sobre a qual não havia absolutamente nenhum controle. No entanto, nas últimas décadas, o estudo do envelhecimento tomou maiores proporções com o advento da gerontologia, a ciência que estuda o envelhecimento. A gerontologia descarta o conceito de que o envelhecimento é um processo estocástico. Ela tem como objetivo fundamental compreender os determinantes do envelhecimento, abordando processos ambientais, genéticos e imunológicos como possíveis moduladores (Amrit e May, 2010).

1.2.1 Teorias do envelhecimento

O aumento da expectativa de vida resultante, principalmente, da capacidade de controle do ambiente (saneamento básico, agricultura de alta produtividade, etc), evidenciou aspectos espécie-específicos do envelhecimento, relacionados a evolução da espécie. Doenças até então de pouca importância epidemiológica, como demências e doenças crônico-degenerativas, vêm ganhando cada vez mais relevância na maioria das populações (Saczynski *et al.*, 2010; World Health Organization, 2005).

Mais de 500 genes envolvidos na longevidade foram identificados nos últimos anos (Magalhães e Budovsky, 2009). Surpreendentemente, a manipulação genética destes genes e suas vias moleculares tem possibilitado aumentar drasticamente o tempo de vida em alguns modelos experimentais, como vermes e moscas (Clancy *et al.*, 2001; Kenyon *et al.*, 1993). Na mosca *Drosophila melanogaster*, mutação com perda-de-função do gene *chico*, que codifica um substrato do receptor de insulina, aumentou a o tempo de vida média em 48% nas moscas homozigotas e 36% nas heterozigotas. Assim, ao longo dos anos, teorias surgiram para explicar os determinantes do processo de envelhecimento (Amrit e May, 2010). As teorias atuais são divididas em três categorias principais:

1.2.1.1 Envelhecimento programado

Estudos sugerem que o envelhecimento é um evento biológico programado, seguindo um “calendário biológico”. Isto pode ser resultado, por exemplo, da modulação de genes que regulam o crescimento e desenvolvimento infantil. Esta regulação vai depender de mudanças na expressão gênica que afeta os sistemas responsáveis pela manutenção, reparação e defesa do organismo (Jin, 2010). Inclui três subcategorias:

A) Longevidade programada

O envelhecimento é o resultado de uma alteração de expressão gênica sequencial, sendo a senescência definida como o tempo no qual os déficits associados a estas alterações aparecem (Davidovic *et al.*, 2010; Jin, 2010).

B) Teoria endócrina

Relógios biológicos agem através de hormônios para controlar o ritmo do envelhecimento. Estudos recentes observaram que o envelhecimento é regulado por hormônios. Uma das vias, evolutivamente conservada, que desempenha papel fundamental na regulação hormonal do envelhecimento é a via da insulina/IGF-1(IIS) (Heemst, 2010).

C) Teoria imunológica

O sistema imune é fundamental na manutenção da homeostase. Sua falha pode, por exemplo, resultar em determinados cânceres (ex., sarcoma de kaposi na síndrome da imunodeficiência adquirida) e doenças metabólicas (ex., diabetes mellitus tipo 2). O sistema imune altera sua atividade ao longo do tempo, o que leva a um aumento da vulnerabilidade a doenças infecciosas e degenerativas, expressão fenotípica do envelhecimento (Jin, 2010). É bem documentado que a eficácia do sistema imunológico sofre um declínio gradual com o avanço da idade. Por exemplo, com o envelhecimento, o perfil de anticorpos se altera, tornando-se menos eficazes. Dessa forma, novas doenças, antes controladas de forma eficaz pelo organismo, surgem provocando estresse celular e morte (Cornelius, 1972). A resposta imune desregulada tem sido associada a doenças cardiovasculares, inflamação, doença de Alzheimer e cancro. Embora não tenham sido estabelecidas relações causais diretas para todos estes efeitos negativos, o sistema imune tem sido, pelo menos, indiretamente sugerido como pivô de tais manifestações (Rozemuller, Gool, van e Eikelenboom, 2005).

1.2.1.2 Envelhecimento por dano ou erro

Esta teoria postula que danos ou erros acumulados, resultantes de variáveis ambientais (ex., radiação UV) ou biológicos (ex., inacurácia das DNAs polimerases), seriam os determinantes do processo de envelhecimento (Jin, 2010). Pode ser subdividida em algumas categorias:

A) Teoria do uso e desgaste

Esta teoria foi introduzida pelo biólogo alemão August Weismann em 1882 que postulou que células e tecidos possuem componentes vitais que sofrem desgaste ao longo do tempo, resultando em disfuncionalidades e aparecendo

fenotipicamente como o envelhecimento e eventualmente a morte (Amrit e May, 2010; Jin, 2010).

B) Teoria da taxa de vida

Esta teoria postula que quando maior a taxa de metabolismo basal de oxigênio de um organismo, menor é sua longevidade, ou seja, as espécies de vida longa ou indivíduos devem apresentar uma taxa metabólica basal mais baixa em comparação com os seus homólogos que vivem por um curto período de vida. Utilizando *Drosophila* como modelo experimental, Loeb e Northrop (1917), propuseram que os animais que eram mantidos em temperaturas altas e com oferta de alimento cresciam e morriam mais rápido que as moscas que eram mantidas em condições basais. Em geral, a teoria é útil para explicar o envelhecimento, contudo, não é completamente adequada para explicar o tempo de vida máximo (Hulbert e Pamplona, 2007). Há várias razões para tal: 1) a prática de exercícios e sua associação com o aumento da taxa metabólica não reduz a longevidade de humanos e ratos (Hollozsy *et al.*, 1985); 2) Embora a restrição calórica aumente a *lifespan*, está não o faz pela redução da taxa metabólica (Hulbert e Pamplona, 2007); 3) Mutantes que possuem tempo de vida prolongado (mutantes para a via da insulina/IGF-1) não possuem diminuição da taxa metabólica (Hulbert *et al.*, 2004).

C) Teoria da ligação cruzada

De acordo com esta teoria, com o tempo, o dobramento errado de proteínas e o acúmulo das mesmas danifica células e tecidos. Ao longo do tempo, estes acúmulos atrapalham processos celulares básicos que resultam no fenótipo observado com o envelhecimento. A doença de Alzheimer é um exemplo de patologia. No nematódeo *C. elegans* a expressão constitutiva de proteína β -amilóide especificamente no musculo leva ao depósito intramuscular β -amilóide promovendo paralização do animal e posterior morte (Lublin e Link, 2013). Estudos mostraram que as reações de reticulação estão envolvidas nas mudanças de proteínas e que isto está diretamente relacionadas com a idade (Bjorksten, 1968). O estudo desenvolvido por Bjorksten (1968) e posteriormente confirmado com um número maior de amostras (Bjorksten e Tenhu, 1990), utilizou um microcalorímetro de gravação, o qual mede a quantidade de água que não pode ser congelada em uma

macromolécula. As proteínas reticuladas tendem a possuir maiores quantidades de água não congelada que as não reticuladas.

D) Teoria dos radicais livres

Esta teoria sugere que as espécies reativas de oxigênio (EROs) causam danos aos componentes moleculares da célula, tais como ácidos nucleicos, lipídios, açúcares e proteínas. Isto dá origem a danos cumulativos nas células, e, eventualmente, faz com que estas apresentem perda de função. Alguns estudos demonstram que a sinalização envolvida no processo de geração de EROs é provavelmente a mais importante no desenvolvimento de células senescentes e envelhecimento do organismo (Afanas'ev, 2010). Um destes foi desenvolvido por Sawada e Carlson (1987) que mostraram que existe aumento na produção de superóxido e peroxidação lipídica durante a vida de ratos. Choksi e colaboradores (2007) investigaram a origem da resistência ao estresse oxidativo e longevidade no em ratos da linhagem Ames. Eles constataram que a produção endógena de EROs, em níveis séricos, e isoprostanos (F2) no fígado foram menores em todas as idades, que aparentemente foi a origem da resistência ao estresse.

E) Teoria do dano no DNA das células somáticas

Os danos ao DNA ocorrem continuamente nas células dos organismos vivos (Holmes, Bernstein e Bernstein, 1992; Jin, 2010). Embora a maioria seja reparada, alguns podem passar sem correção e, por fim, acumular. As DNAs polimerases e outros mecanismos de reparação não conseguem corrigir os danos tão rápido quanto eles aparentemente ocorrem (Holmes, Bernstein e Bernstein, 1992). As mutações genéticas ocorrem e se acumulam com a idade, fazendo com que as células deteriorem (Jin, 2010). Por exemplo, danos ao DNA mitocondrial podem conduzir a disfunções mitocondriais que estão associadas a doenças neurodegenerativas (Humphrey e Parsons, 2012; Taylor e Turnbull, 2005).

1.3 *Caenorhabditis elegans*

O verme *Caenorhabditis elegans* é um nematódeo de vida livre, não parasita, predominantemente hermafrodita (Figura 5) (Riddle *et al.*, 1997). Foi descrito por Sydney Brenner em 1965 como modelo experimental para estudos sobre o

desenvolvimento e arquitetura dos organismos multicelulares (Brenner, 1973). Desde então, vem sendo amplamente empregado como modelo para estudo de vários processos biológicos incluindo mecanismos de apoptose, vias de sinalização celular, controle do ciclo celular, regulação gênica, metabolismo, envelhecimento, neurodesenvolvimento, imunologia e determinação sexual (Riddle *et al.*, 1997). Marcos da ciência moderna foram descritos a partir de estudos feitos na plataforma *C. elegans* (Kaletta e Hengartner, 2006). Cita-se a descrição da classe dos microRNAs que rendeu ao Dr. Andrew Fire o nobel de medicina e fisiologia em 2005 (Fire *et al.*, 1998).

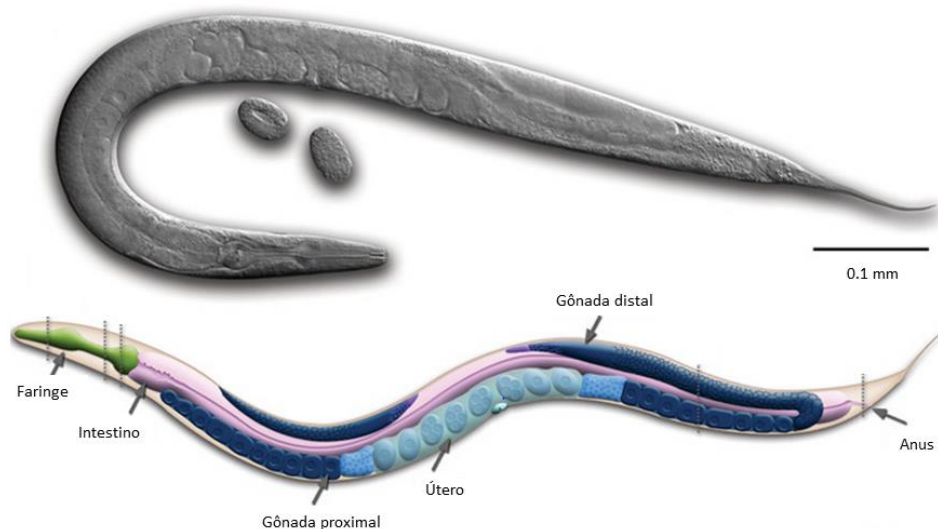


Figura 5 - O nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Adaptada de wormbook. (Fonte: <http://www.wormbook.org/>)

O *C. elegans* é um organismo multicelular sofisticado formado por 959 células que dão origem a órgãos e tecidos incluindo músculos, hipoderme, intestino, sistema reprodutor, glândulas e sistema nervoso. O sistema nervoso contém 302 neurônios e 56 células do tipo glia (Bargmann, 1998; Kaletta e Hengartner, 2006; Riddle *et al.*, 1997).

O verme tem características que o tornam um modelo experimental atraente. Possui ciclo de vida curto (3 dias) composto por quatro mudas larvais até o desenvolvimento completo. Tem dimorfismo sexual composto por hermafroditas (XX) (99,9% da população) e machos (XO) (0,01% da população). Atingida a fase adulta,

os hermafroditas se autofecundam por aproximadamente três a cinco dias, gerando 300-350 progênie. Após a fase reprodutiva, o verme vive, em média, por mais duas semanas quando, então, morre. A predominância de animais hermafroditas na população permite a manutenção de mutações deletérias em homozigose. Já a existência de machos permite o transporte de alelos mutados para outros *backgrounds* genéticos.

O verme é um organismo diploide, com cinco pares de cromossomos somáticos e um par de cromossomos sexuais. Seu genoma está totalmente sequenciado e abriga aproximadamente 20.000 genes até o momento (C. elegans Sequencing Consortium, 1998; Kaletta e Hengartner, 2006). Existe uma surpreendentemente conservação gênica entre vermes e mamíferos. A comparação entre o genoma humano e do *C. elegans* confirmou a presença de vários genes ligados a doenças humanas no verme, o que abre a possibilidade de modelar doenças, muitas vezes raras e letais em modelos vertebrados (C. elegans Sequencing Consortium, 1998; Kaletta e Hengartner, 2006). O conhecimento detalhado da arquitetura genômica e a facilidade técnica para manipulações genéticas levaram a disponibilidade de centenas de alelos mutantes e linhagens transgênicas que englobam vários genes do verme. Isto possibilita o estudo detalhado de processos celulares e seu papel no desenvolvimento e comportamento do organismo.

O verme tem tamanho reduzido (~1 mm de comprimento quando adulto) e, em laboratório, é cultivado em meio a base de ágar e usa como fonte de alimento a bactéria *Escherichia coli*. Estas características proporcionam baixo custo de manutenção quando comparado a outros animais experimentais. Características morfológicas, principalmente a transparência, permitem que técnicas não invasivas de visualização das estruturas celulares e de transcritos marcados com proteínas fluorescentes, mesmo que expressos em uma única célula, sejam empregados (Kaletta e Hengartner, 2006).

Embora seja um modelo avançado para o estudo de mecanismos moleculares, questiona-se até que ponto um verme pode ser usado como modelo de doenças humanas devido à distância evolutiva. Obviamente, não existe correspondência direta entre doenças humanas e fenótipos no verme na maioria dos casos. É irreal esperar que um modelo invertebrado mimetize a patogênese das doenças humanas e seja suficiente para prever a ação e segurança de fármacos. A

principal vantagem do modelo é possibilitar o entendimento das interações moleculares, permitindo, dessa forma, pesquisas em modelos vertebrados ou mesmo clínicas mais embasadas. O *C. elegans* é um modelo para os aspectos moleculares das doenças. Isto significa que havendo correspondentes moleculares no verme, semelhantes aos envolvidos em determinada doença humana, as interações poderão ser estudadas, detalhadas e manipuladas e o conhecimento gerado aplicado no entendimento da doença.

1.3.1 Modelo experimental para estudo da longevidade

O verme *C. elegans* é um modelo poderoso para estudo do envelhecimento (Amrit e May, 2010). Entre as características atraentes para o estudo da longevidade destaca-se o curto tempo de vida que reduz o tempo de análise fenotípica para algumas semanas (Ewbank, 2002; Houthoofd *et al.*, 2003; Kurz *et al.*, 2007).

1.3.2 Fatores que modulam a longevidade no nematódeo

Estudos em modelos biológicos, tais como leveduras, vermes, moscas e ratos, identificaram vários fatores e vias moleculares que alteram o tempo de vida do organismo. Por exemplo, restrição calórica, diminuição da sinalização da via insulina/IGF-1 (IIS), diminuição da taxa da respiração celular mitocondrial, redução da função das células germinativas e baixas temperaturas são fatores que estendem a longevidade (Kenyon, 2010).

Um estudo que avaliou a longevidade de macacos rhesus por 20 anos (Colman *et al.*, 2009), demonstrou que a restrição calórica, sem desnutrição, é capaz de protelar o envelhecimento e aumentar a longevidade destes animais. Já que no período avaliado, 50% dos animais mantidos com dieta normal estavam vivos e na população que foi mantida em restrição calórica o percentual alcançou 80%. Os macacos submetidos a restrição alimentar ainda apresentaram incidência reduzida de diabetes, câncer, doença cardiovascular e atrofia cerebral.

1.3.2.1 Via de sinalização da insulina/IGF-1

A via de sinalização celular da insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina (*insulin-like growth factor* (IGF)) (IIS) é evolutivamente conservada (Figura 6). Através da modulação de fatores de transcrição, a IIS regula o desenvolvimento, crescimento, diferenciação, estado reprodutivo, imunidade inata, resistência ao estresse, metabolismo energético, respostas a mudanças das condições ambientais e disponibilidade de nutrientes de invertebrados e vertebrados (Kaletsky e Murphy, 2010; Kenyon, 2010).

No verme, vários peptídeos semelhantes à insulina são secretados por diversas células, incluindo neurônios, em resposta à alimentação ou percepção sensorial do alimento no ambiente (Heemst, 2010). Estes peptídeos (INS1-38) se ligam no receptor DAF-2, que tem atividade tirosina-quinase (Heemst, 2010). A transdução de sinal pelo receptor, ativa a enzima semelhante a fosfatidilinositol-3-quinase humana AGE-1, a qual fosforila o fosfolípide de membrana 4,5-fosfatidilinositol (PIP2) em 3,4,5-fosfatidilinositol (PIP3) (Wolkow *et al.*, 2002) (Morris, Tissenbaum e Ruvkun, 1996). Este atua como elemento agregador, ativando e atraindo para perto a proteína quinase-1 (PKB1-2) que, então, fosforila e ativa (Paradis, Ailion e Toker, 1999) a proteínas-quinase B (PKB1-2, também conhecida como AKT1-2). PKB1 e 2 dão sequência a via de sinalização, fosforilando e modulando uma série de proteínas *downstream*, entre elas o fator de transcrição DAF-16, um homólogo da família de fatores de transcrição FoxO (Lin *et al.*, 1997; Ogg *et al.*, 1997). A fosforilação de DAF-16 sequestra o fator de transcrição no citoplasma, impedindo assim sua translocação para o núcleo e a transcrição gênica.

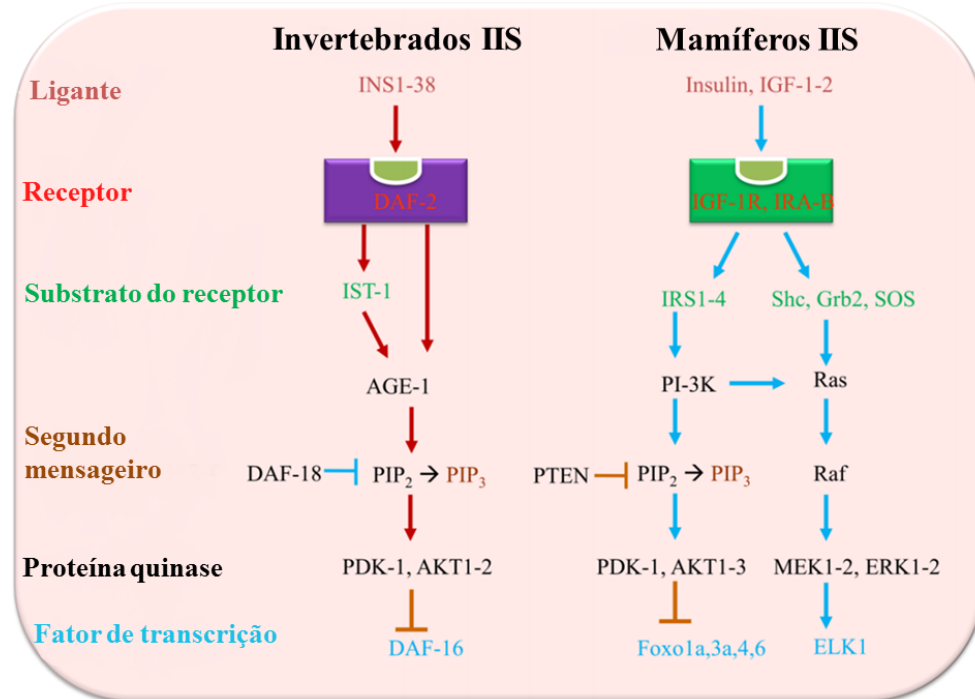


Figura 6 - Descrição simplificada da transdução de sinal da via insulina/IGF-1 (IIS) em invertebrados e mamíferos. Adaptado de (Heemst, 2010).

Vários estudos observaram que mutações com perda-de-função nos genes para *daf-2* e outros componentes da via IIS, aumentam expressivamente a longevidade do verme (Kenyon, 2010). Um trabalho pioneiro realizado por Kenyon e colaboradores (1993), demonstrou que mutações no gene *daf-2* foram capazes de gerar adultos férteis, ativos que viveram duas vezes mais que os animais selvagens. Este aumento de longevidade requeria a atividade de um segundo gene, *daf-16*. A redução de função da via IIS transloca DAF-16 para o núcleo. DAF-16 regula vários genes que protegem a célula contra fatores estressores, codificam peptídeos antimicrobianos e outros capazes de controlar o metabolismo e reprodução, promovendo assim, o aumento da longevidade (Finch e Ruvkun, 2001; Murphy *et al.*, 2003). PIP3 pode ser desfosforilado por DAF-18, homólogo da fosfatase PTEN. Mutações que reduzem a função de *daf-18* eliminam o aumento da longevidade observada em vermes mutantes para *daf-2* e *age-1* (Dorman *et al.*, 1995).

Além de DAF-16, outros fatores cooperam para o aumento da longevidade observado em mutantes de DAF-2, por exemplo, SKN-1, fator de transcrição que também protege contra o dano gerado pelo estresse oxidativo através da mobilização da via conservada de detoxificação de fase 2 (Tullet *et al.*, 2008) e HSF-1, que regula a resposta de choque térmico e também influencia o envelhecimento

(Hsu, Murphy e Kenyon, 2003). Redução da atividade de HSF-1 acelera o envelhecimento dos tecidos e diminui a longevidade do nematódeo (Hsu, Murphy e Kenyon, 2003).

1.3.2.2 Estresse oxidativo

Algumas vias e fatores de transcrição, incluindo IIS e DAF-16, estão estritamente relacionados com a resistência ao estresse oxidativo. Isto ocorre através da regulação da expressão de genes, que codificam enzimas como superóxido-dismutase (SOD) e catalase, enzimas que são responsáveis pela detoxificação de EROs (Back, Braeckman e Matthijssens, 2012).

Estudos mostraram que a redução da ingestão de alimentos em 40-60% mostrou benefícios notáveis para a saúde e expectativa de vida em muitas espécies animais, incluindo o verme *C. elegans* (Houthoofd *et al.*, 2007). Postulava-se que a restrição dietética reduzia a taxa metabólica e, assim, diminuía a produção de EROs e os danos induzidos por estes (Lakowski e Hekimi, 1998). Estudos recentes demonstraram que a menor quantidade de EROs não foi devido a uma menor taxa metabólica e sim pelo aumento da atividade enzimática da catalase (Houthoofd *et al.*, 2002) e SOD (*sod-1*, *sod-2*, *sod-4* e *sod-5*) (Panowski *et al.*, 2007). Enzimas reguladas pelo fator de transcrição FOXA/PHA-4.

Estudos recentes demonstraram que o aumento as alterações da longevidade observadas numa série de condições no verme não podem ser justificadas apenas pela redução no estresse oxidativo (Back, Braeckman e Matthijssens, 2012). No entanto, isto não diminui a importância de mecanismos de defesa contra as EROs que em condições naturais podem ser importantes para garantir uma vida normal e reprodução (Back, Braeckman e Matthijssens, 2012).

1.3.2.3 Reprodução, alimento e temperatura

Vários processos fisiológicos demandam grande quantidade de energia. A reprodução, por exemplo, tem alta demanda energética que gera efeitos marcantes no metabolismo de lipídios, a principal forma de armazenamento de energia dos animais (Hansen, Flatt e Aguilaniu, 2013). Para se reproduzirem, os animais mobilizam suas reservas energéticas. Se a reprodução é reduzida ou suprimida, há

aumento do armazenamento de gordura e, curiosamente, da longevidade. Esta associação entre gasto energético e tempo de vida está bem estabelecida, entretanto, os mecanismos moleculares responsáveis pelo fenótipo permanecem mal compreendidos (Hansen, Flatt e Aguilaniu, 2013).

Esta relação inversa entre reprodução e armazenamento de gordura reflete um inevitável custo energético. Neste cenário, denominado “custo da reprodução”, as reservas energéticas são utilizadas para a reprodução em detrimento da manutenção somática e consequente sobrevivência do organismo (Kirkwood, 1977; Williams, 1966). Alguns estudos observaram que quando as células germinativas do verme são removidas, seu tempo de vida aumenta consideravelmente; isto ocorre, em parte, pela modulação do metabolismo lipídico (Hansen, Flatt e Aguilaniu, 2013).

A quantidade de alimento disponível no meio também está relacionada com a sobrevivência do organismo. Estudos demonstraram que a restrição calórica reduz a fecundidade e aumenta a longevidade. Entretanto a relação direta entre os três elementos permanece pouco compreendida (Chapman e Partridge, 1996; Crawford, Libina e Kenyon, 2007; Holehan e Merry, 1986). A associação entre alimento, reprodução e longevidade provavelmente apresenta carácter seletivo (Crawford, Libina e Kenyon, 2007). Em condições desfavoráveis (restrição alimentar), reproduzir perde importância, considerando a menor chance de sobrevivência da prole, comparado à sobreviver para, assim, procurar locais mais favoráveis para multiplicação. Ainda, o aumento na longevidade visto em modelos de restrição calórica, está relacionado a menor geração de EROs, visto que, há um aumento da expressão de enzimas antioxidantes (Back, Braeckman e Matthijssens, 2012).

A temperatura é outro fator determinante da longevidade. Animais pecilotérmicos, incluindo *C. elegans*, exibem tempo de vida mais longo em baixas temperaturas comparado com temperaturas mais altas (Klass, 1977). No entanto, os mecanismos atuantes que determinam o fenótipo não são conhecidos. Alguns estudos postulam que baixas temperaturas reduzem a velocidade das reações químicas, diminuindo assim, a velocidade do envelhecimento (Lee e Kenyon, 2009; Xiao *et al.*, 2013). Além da diminuição da taxa metabólica, Lee e Kenyon (2009) propuseram que o aumento da longevidade em baixas temperaturas está estritamente relacionado com a atividade dos neurônios termosensores AFD que controlariam a longevidade por sinais neuroendócrinos (Lee e Kenyon, 2009).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da cafeína na longevidade do nematódeo *Caenorhabditis elegans*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os efeitos fenotípicos (longevidade, reprodução, desenvolvimento) no nematódeo após exposição a diferentes concentrações de cafeína;
- Avaliar as implicações da exposição aguda e crônica à cafeína na longevidade;
- Estudar o envolvimento da via IIS no aumento da longevidade gerado pela cafeína;
- Caracterizar a interação entre adenosina e cafeína no verme.

CAPÍTULO II

1 Artigo Científico

Os materiais e métodos utilizados para execução deste trabalho, os resultados e a discussão serão apresentados na forma de artigo científico – submetido ao periódico *Neurobiology of aging*.

Title: DAF-2 is partially required for caffeine lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*

Jessika Cristina Bridi¹, Alexandre Guimarães de Almeida Barros¹, Letícia Reis Sampaio¹, Júlia Castro Damásio Ferreira¹, Felix Alexandre Antunes Soares², Marco Aurélio Romano-Silva^{1*}.

¹ Departamento de Saúde Mental, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, CEP 30130-100 Belo Horizonte, Brazil.

² Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding author: Departamento de Saúde Mental, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, CEP 30130-100 Belo Horizonte, Brazil. Tel: +55 313409 9134.

E-mail address: romanosilva@gmail.com.

Abstract

Caffeine is one of the most widely used psychoactive drug. Studies suggests that caffeine may be protective against many aging associated neuropsychiatric disorders. *Caenorhabditis elegans* has emerged as a powerful model to study aging determinants. Our aim was to evaluate caffeine effects over lifespan in this nematode. Caffeine was able to increase worm's lifespan, at least in part, by inhibition of insulin/IGF-1 pathway. Caffeine also delayed animal's larval development, reduced reproduction and body length. Adenosine reversed some of the caffeine-induced phenotypes suggesting a possible common target. Therefore, elucidation of mechanisms through which caffeine exerts its effects may shed light on new genes determinants of aging process.

Keywords: Caffeine, longevity, *Caenorhabditis elegans*, adenosine

Introduction

Caffeine is a psychoactive substance used worldwide (Fredholm, 2012). It is present in many ordinary products like coffee, tea, soft drinks, chocolate and combined with over-the-counter pills such as aspirin and appetite suppressants (Fisone et al., 2004; Fredholm et al., 1999). Studies have projected that seventy percent of adult population consumes quantities of caffeine capable of affect their brain and behavior in a daily basis (Fredholm, 2012).

Caffeine pharmacodynamics has been ascribed mainly to its antagonism of adenosine receptors (Chen et al., 2010; Fredholm et al., 1999). At low concentrations, caffeine blocks all four humans' adenosine receptors (A1, A2A, A2B and A3) (Chen et al., 2010). Most of its effects appears to be dependent on interactions with A1 and A2A receptors and, to a lesser extent, with A2B and A3 receptors (Chen et al., 2010; Fredholm et al., 1999). At higher concentrations, caffeine has looser interactions and may disturbs calcium release from intracellular stores, inhibit GABAA receptors, the enzymes 5'-nucleotidase and alkaline phosphatase (Chen et al., 2010; Fredholm et al., 1999).

Currently, studies have suggested that chronicle exposure to caffeine may be beneficial in many neuropsychiatric disorders like Alzheimer's and Parkinson's diseases (Ritchie et al., 2007; Souza et al., 2003). This is in part because caffeine may reduce cognitive decline in neurodegenerative disorders (Cunha and Agostinho, 2010). For instance, in an Alzheimer's disease model, mice exposed to caffeine had better cognitive test results and reduced levels of β -amyloid in their brains (Cao et al., 2009; Dall'Igna et al., 2007). In a Parkinson's disease model, caffeine prevented avoidance memory impairment in rats (Gevaerd et al., 2001). In humans, caffeine intake was inversed related to adverse outcomes like diabetes, inflammatory diseases, stroke, injuries and accidents (Freedman et al., 2012). In spite of high consumption of caffeine worldwide and its ascribed potential as modulator of aging, the molecular mechanisms through which caffeine results in those phenotypes remains largely unclear.

As human's lifespan expands, searching for substances capable of reducing aging process has gain major attention. In this context, *Caenorhabditis elegans* has emerged as a powerful model to study aging in the context of an intact animal (Hsin and Kenyon, 2009; Klass, 1983). Many genes have been shown to regulate aging in

worms. Usually they signal in stress-related responses and energy homeostasis (C. J. Kenyon, 2010). For example, loss-of-function mutations in insulin receptor DAF-2 increases *C. elegans* lifespan (Kenyon et al., 1993; Kimura et al., 1997). DAF-2 is activated in response to changes on food availability and stress (Kenyon et al., 1993; Murphy et al., 2003). Ultimately, it modifies activity of many transcription factors like DAF-16, SKN-1, HSF-1 and PQN-1 (Hsu et al., 2003; C. J. Kenyon, 2010; Kimura et al., 1997; Samuelson et al., 2007; Tullet et al., 2008). These transcription factors are responsible for regulate many genes that act cumulatively to produce large extension on lifespan (Amrit and May, 2010; C. J. Kenyon, 2010). Here we used the nematode *C. elegans* to investigate whether and how caffeine changes the aging process.

Results

Caffeine increases worm's lifespan

In order to determine whether caffeine extends worm's lifespan, we exposed animals to different concentrations of it and measured how long they lived (Figure 1) (Table 1). Caffeine increased lifespan at low concentrations. However, it exhibited toxicity at higher concentrations observed as lifespan reduction. Caffeine's induced lifespan extension has been reported previously (Lublin et al., 2011). Although in consonance with this study, in our experiments, animals were exposed to caffeine from L1 larval stage while in the former they start treatment in adult worms. This may justify some differences observed like the magnitude of lifespan increase.

Caffeine delays larval development

Studies suggest that aging is a process that starts early in life (Britton et al., 2008; Felix et al., 2013). For example, premature stressful events in humans may have adverse outcomes late in life (Caraci et al., 2010; Saczynski et al., 2010; Wahlbeck et al., 2001). In *C. elegans* larval development has remarkable effects on lifespan. For example, animals deprived from food at the initial larval stages can enter an alternative development pathway, named dauer, characterized by an increased lifespan (Golden and Riddle, 1984; Kenyon, 2001). Therefore, worm's lifespan seems to result from lifelong processes.

To determine whether caffeine changes worm's development, animals were exposed to different concentrations of it and their larval development evaluated until adulthood (Figure 2). We observed that caffeine delayed worm's larval development.

While wild-type animals achieved adult stage at the third day of life, worms exposed to low concentrations of caffeine spent more time to complete development. The phenotype was already detected on the first day. On low caffeine concentrations, adult animals were observed on day five and six for 5 mM and 15 mM caffeine respectively (Figure 2B and 2C). Worms exposed to 30 mM caffeine had accentuated larval development delay and only twenty percent of them reached adult stage on day thirteen. Noteworthy, some worms from this group died or escape from plates. On high caffeine concentrations, worms did not develop beyond first larval stage and died after a couple of days. This outcome was expected considering that high caffeine concentrations exhibits toxicity.

Worm's lifespan extension requires lifelong caffeine exposure

Lifespan results from many processes. Assuming that, one trivial explanation for caffeine-induced increase in lifespan could be that it results from worm's larval development delay. To verify whether caffeine contribution to lifespan extension occurs exclusively during early development, we exposed worms to caffeine during certain larval stages only (Figure 3 and table 2). We chose 5 mM caffeine concentration to perform this experiment because it increases lifespan and do not fully halt development. We observed no lifespan extension when worms were exposed to caffeine only during larval development. Therefore, it is possible that caffeine induced changes in larval development is a distinct outcome from it extension of lifespan. To test this hypothesis, adult worms were exposed to caffeine and their lifespan measured (Figure 3). Curiously, we did not observe lifespan extension. Therefore, worms require exposure to low concentrations of caffeine throughout life to extend lifespan.

Caffeine reduces worm's size and reproduction

Studies suggest that processes that require great amounts of energy have impact on lifespan. These include growth and reproduction (Arantes-Oliveira et al., 2002). To evaluate whether caffeine changes growth and reproduction, complete developed adult animals had their body's size measured and reproductive state assessed through egg-laying phenotype (Figure 4). Caffeine reduced adult worms mean size. Assuming that the energy required to keep a larger worm may negatively affect lifespan, this outcome can justify part of the lifespan extension observed after exposure to caffeine. However, reduced body size resulted from contact with caffeine during larval development only and lifespan extension requires caffeine throughout

worm's life (Figure 4A). Therefore, it may be part of but not essential for caffeine-induced lifespan increase. Caffeine also reduced worm's egg production (Figure 4B). Similar to body's size, reproduction has a large energy cost and may adversely affect lifespan (Mukhopadhyay and Tissenbaum, 2007). Therefore, egg-laying reduction may be an important facet of caffeine-induced lifespan extension.

Caffeine induced lifespan extension is partly dependent on DAF-2 but not on DAF-16

In *C. elegans*, it is well established that loss-of-function mutations on the insulin/IGF-1-like receptor DAF-2 increases lifespan, in part, by activation of the transcription factor DAF-16, a member of the FOXO family (C. Kenyon, 2010; Kimura et al., 1997). To investigate whether caffeine induced lifespan extension depends on insulin/IGF-1 pathway, loss-of-function mutants for both DAF-2 and DAF-16 were exposed to caffeine and their lifespan measured (Figure 5 and table 3). Daf-2 mutants exposed to caffeine showed a significant lifespan increase compared to vehicle-exposed animals of the same genotype. However, the magnitude of it was lesser than that observed for wild type animals (Figure 5A). Therefore, caffeine-induced lifespan increase is partly dependent on DAF-2 signaling. Curiously, *daf-16* loss-of-function mutants exposed to caffeine exhibited a life expectancy similar to that observed for wild type animals (Figure 5B). This suggests that, although DAF-16 is a well-established target of insulin/IGF-1 signaling pathway, it is not necessary for the caffeine induced lifespan increase.

Insulin/IGF-1 signaling phosphorylates DAF-16 and translocate it to cytoplasm, halting its transcriptional activity. To further explore how caffeine's modulates DAF-2 signaling pathway, a transgenic worm bearing DAF-16 tagged with green fluorescent protein (GFP) (*Is[daf-16P::daf-16::GFP; rol-6(su1006)]*) was exposed to it and DAF-16 subcellular location analyzed overtime. Animals exposed to caffeine from birth until L4 larval stage showed DAF-16::GFP nuclear/cytoplasm fluorescence signal slightly bigger than vehicle-treated animals. Curiously, worms exposed to caffeine for a short period of time (30, 60 and 120 minutes) exhibited a significant greater nuclear/cytoplasm fluorescence signal (Figure 6). This suggests that caffeine acutely inhibits insulin/IGF-1 signaling pathway and this process somewhat adapts overtime. Therefore, caffeine somehow inhibits DAF-2 signaling pathway. This phenomenon mimics *daf-2* loss-of-function mutant animals and may partly explain how caffeine increases worm's lifespan.

Adenosine antagonizes caffeine's lifespan increase and brood size reduction

In mammals, caffeine antagonize mainly adenosine receptors A1 and A2A (Cunha and Agostinho, 2010). Therefore, caffeine may interact with targets in worms similar to adenosine receptors. To verify this hypothesis, animals were exposed to both caffeine and adenosine and their lifespan measured (Figure 7 and table 4). Adenosine reversed caffeine-induced lifespan increase. To further explore this interaction, worms also had their reproduction assessed after exposure to caffeine and adenosine (Figure 8). Again, adenosine partly reversed caffeine-induced egg-laying reduction. This suggests that caffeine and adenosine are antagonist in worms similar to what is observed in mammals.

Experimental procedures

Strains and culture conditions

C. elegans strains were maintained at 20°C or 15°C on nematode growth medium (NGM) with *E. coli* OP50 as food source (Brenner, 1974). N2 Bristol was used as wild-type. The mutant strains used in this study were: *daf-16* (*mu86*)I outcrossed 12x, *daf-2*(*e1370*)III outcrossed 4X and TJ356 (Is[*daf-16P*::*daf-16*::GFP; *rol-6*(*su1006*)]). All strains were obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center. For each experiment, synchronized populations were obtained through bleach treatment of gravid adults.

Caffeine and adenosine treatments

Caffeine and adenosine (Sigma-Aldrich) were freshly dissolved in deionized water and added into NGM after autoclaving. After solidification of NGM, plates were seeded with *E. coli* OP50 in the center. Plates were prepared the day before use.

Lifespan assay

Lifespan assays were performed on NGM plates at 20°C (Lin et al., 2001) (Kenyon 1993; Berman & Kenyon 2006). L1 worms (day 0) were transferred to NGM plates supplemented with caffeine and/or adenosine and/or vehicle. Worms were scored every day or every other day and those that failed to respond to a gentle prodding with a platinum wire were scored as dead (Li et al. 2008). Animals were transferred to new plates every day until they ceased laying egg. After reproductive period ended, worms were moved to new plates every week.

Development assay

Worm's developmental stage was evaluated every day until they reached complete development (gravid adults). They were scored as L1, L2, L3, L4 larval stages, young adult (no eggs in uterus) or adult (gravid adults) following body morphology criteria (Altun and Hall, WormAtlas).

Body length

Body length was calculated by measuring the tip-to-tail length of individual adult animals. Digital images were taken using a stereomicroscope fitted with a CCD camera and length measured with NIS-Element AR 3 software (Nikon).

Brood size assays

Each worm was allowed to lay eggs and transferred to fresh NGM plate every 24 h until complete egg laying period. The number of hatched worms was counted after incubation for about 2 days at 20°C (Li et al., 2008). Worms that “exploded”, were “bagged”, or went missing were omitted from the analysis. Twelve worms were used for each treatment condition. The experiment was performed at least three times.

DAF-16 localization assay

DAF-16::GFP animals (*Is[daf-16P::daf-16::GFP; rol-6(su1006)]*) were cultured at 20°C. Worms were exposed to caffeine for different periods of time. Worms were mounted on slides with an agarose pad and paralyzed with azide. Images were taken using suitable excitation and emission filters with a confocal microscope system (Leica SP5) fitted with an argon laser. The relation between fluorescence signal in nucleus and cytoplasm was quantified using image J software. The average fluorescence from six different worm's cells were calculated and used for analyzes (Driver et al., 2013). Each experiment was repeated at least three times and around 17 worms per group were used in each experiment.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad InStat.(Version 5.0 for Macintosh OSX, GraphPad Software, San Diego, CA). The Kaplan-Meier method was applied to calculate survival fractions and log-rank (Mantel-Cox) test was used to compare survival curves. The Bonferroni's post-test correction was applied for multiple comparisons. Student's t-test or one-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-test was used to check for significant differences

between means for other comparisons. P-values lower than 0.05 were considered significant.

Discussion

In this study, we demonstrated that caffeine was able to increase lifespan of the nematode *C. elegans*. Caffeine also interfered with worm's reproduction and development. Whether these phenotypes results from the same molecular mechanism or from distinct ones is not clear. We explored possible pathways related to caffeine-induced phenotypes and found that DAF-2 signaling pathway is important for it. In addition, caffeine was observed to regulate DAF-16, a well-described target of DAF-2 pathway. In spite of that, this transcription factor is not directly related to caffeine-induced extension of lifespan. Over the last years, caffeine has been extensively studied by its effects over aging (Cunha and Agostinho, 2010). This is because caffeine is considered one of the most widely consumed psychoactive drug worldwide (Fredholm et al., 1999). Caffeine intake has been associated to enhancement of longevity in humans and animal models (Freedman et al., 2012) (Lublin et al., 2011). However, the mechanisms underlying this phenotype is not well established.

In our conditions, only worms exposed to caffeine throughout their lives had lifespan extension. Nevertheless, caffeine's exposure early in life affects reproduction, body length and larval developmental rate. These suggest that caffeine's exposure has different outcomes dependent on how much and how long it is supplied. In fact, there is growing accumulation of evidence in humans and rodents suggesting that chronic caffeine's exposure may yield significant health benefits like delaying aging and preventing specific age-associated pathologies (Freedman et al., 2012; Lublin et al., 2011; Prediger et al., 2005).

Aging is a complex process that starts early in life (Britton et al., 2008; Felix et al., 2013). Studies have shown that lifelong events like birth rate and stressful environments are important determinants of healthy aging (Colman et al., 2009). This is because those events are energetic costly and may generate adverse conditions like increased production of reactive oxygen species (Speakman, 2005). For instance, *clk* mutants worms, who are deficient in a hydroxylase involved in the synthesis of ubiquinone, are characterized by slow physiologic rates, delayed larval

development, decreased brood size and increased lifespan. This suggests that increased lifespan may be achieved by decreasing energy expenditure (Van Raamsdonk et al., 2010). In worms, reproduction and larval development are energetic costly processes and determinants of lifespan (Arantes-Oliveira et al., 2002; Jia et al., 2004). Therefore, it is possible that caffeine's disruption of both processes may indirectly affect life expectancy. However, we observed lifespan extension only in worms exposed to caffeine through their whole lives while those phenotypes were present after exposure to caffeine for a short period. Therefore, caffeine's reproduction decrease and development delay may be important for but are not necessary to lifespan extension.

In worms, many genes have been linked to increased longevity (C. J. Kenyon, 2010). Insulin/IGF-1 signaling is a well-established pathway that regulates aging. It regulates several cellular processes responsible for oxidative stress resistance, immunity and energy balance (Amrit and May, 2010). Loss-of-function mutations in *daf-2* increase lifespan in part by activation of the transcription factor DAF-16 (C. Kenyon, 2010; Kimura et al., 1997). To test whether caffeine-induced lifespan extension was dependent on insulin/IGF-1 signalling pathway, we exposed *daf-2* and *daf-16* mutants to it. *Daf-2* mutants partly reversed lifespan increase. This suggests that caffeine may decrease insulin/IGF-1 signaling to reach lifespan extension. Noteworthy, this mechanism is similar to what is observed in long-lived *daf-2* mutants. To characterize how caffeine dialogues with insulin/IGF-1 pathway, we sought to measure DAF-16 transcription factor subcellular localization. DAF-16 is translocated from the nucleus to cytoplasm by DAF-2 activation. In a short time-frame exposure, caffeine significantly increased DAF-16 in the nucleus. This further suggests that caffeine inhibits insulin/IGF-1 pathway. Although, after a while, DAF-16 reduced considerably in the nucleus indicating adaptation of the pathway. Together with the fact that DAF-16 is not necessary for caffeine-induced lifespan extension, we hypothesized that insulin/IGF-1 targets, other than DAF-16, are essential for it. In fact, studies have shown that DAF-16 transcriptional activity is not sufficient to extend lifespan. For example, worms bearing mutated DAF-16 that constitutively localizes in the nucleus have only modest lifespan extension. (Berman and Kenyon, 2006; Lin et al., 2001). Therefore, caffeine-induced lifespan extension is partly dependent on insulin/IGF-1 signaling pathway but not through modulation of DAF-16 transcriptional factor.

In mammals, adenosine receptors (A1 and A2A) are well-established targets of caffeine. Many of the beneficial effects of caffeine are mimicked by specific antagonists of adenosine receptors (Cunha and Agostinho, 2010). Putative orthologs of human adenosine receptors exist in *C. elegans* genome but they have not been isolated yet. We found that adenosine antagonizes some caffeine-induced phenotypes suggesting a possible target in common.

In conclusion, the present study demonstrates that caffeine exhibit a remarkably influence over worm's lifespan in part by modulation of insulin/IGF-1 pathway. Complete elucidation of the molecular mechanisms of it may shed light on new genes determinants of aging.

Acknowledgments

We are very grateful to all members of the Romano-Silva Lab who contributed with this study.

References

Amrit, F., May, R., 2010. Younger for longer: Insulin signalling, immunity and ageing. *Curr Aging Sci* 166–176.

Arantes-Oliveira, N., Apfeld, J., Dillin, A., Kenyon, C., 2002. Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 295, 502–5.

Altun, Z.F. and Hall, D.H. 2012. Handbook of *C. elegans* Anatomy. In *WormAtlas*. <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>

Berman, J.R., Kenyon, C., 2006. Germ-cell loss extends *C. elegans* life span through regulation of DAF-16 by *kri-1* and lipophilic-hormone signaling. *Cell* 124, 1055–1068.

Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94.

Britton, A., Shipley, M., Singh-Manoux, A., Marmot, M.G., 2008. Successful aging: the contribution of early-life and midlife risk factors. *J. Am. Geriatr. Soc.* 56, 1098–105.

Cao, C., Cirrito, J.R., Lin, X., Wang, L., Verges, D.K., Dickson, A., Mamcarz, M., Zhang, C., Mori, T., Gary, W., Holtzman, D.M., Potter, H., 2009. Caffeine suppresses β -amyloid levels in plasma and brain of Alzheimer's transgenic mice. *J Alzheimers Dis* 17, 681–697.

Caraci, F., Copani, A., Nicoletti, F., Drago, F., 2010. Depression and Alzheimer's disease: neurobiological links and common pharmacological targets. *Eur. J. Pharmacol.* 626, 64–71.

Chen, X., Ghribi, O., Geiger, J.D., 2010. Caffeine protects against disruptions of the blood-brain barrier in animal models of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J. Alzheimers. Dis.* 20 Suppl 1, S127–41.

Colman, R.J., Anderson, R.M., Johnson, S.C., Kastman, E.K., Kosmatka, K.J., Beasley, T.M., Allison, D.B., Cruzen, C., Simmons, H. a, Kemnitz, J.W., Weindruch, R., 2009. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325, 201–4.

Cunha, R. a, Agostinho, P.M., 2010. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. *J. Alzheimers. Dis.* 20 Suppl 1, S95–116.

Dall'igna, O.P., Fett, P., Gomes, M.W., Souza, D.O., Cunha, R. a, Lara, D.R., 2007. Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp. Neurol.* 203, 241–5.

Dostal, V., Roberts, C., Link, C., 2010. Genetic mechanisms of coffee extract protection in a *Caenorhabditis elegans* model of β -amyloid peptide toxicity. *Genetics* 186, 857–866.

Driver, R.J., Lamb, A.L., Wyner, A.J., Raizen, D.M., 2013. DAF-16/FOXO regulates homeostasis of essential sleep-like behavior during larval transitions in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 23, 501–6.

Felix, J.F., Voortman, T., van den Hooven, E.H., Sajjad, A., Leermakers, E.T.M., Tharner, A., Jong, J.C.K., Duijts, L., Verhulst, F.C., de Jongste, J.C., Tiemeier, H., Hofman, A., Rivadeneira, F., Moll, H. a, Raat, H., Jaddoe, V.W., Franco, O.H., 2013. Health in children: A conceptual framework for use in healthy ageing research. *Maturitas*.

Fisone, G., Borgkvist, a, Usiello, a, 2004. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell. Mol. life Sci. C.* 61, 857–872.

Fredholm, B.B., 2012. How Drugs can Stimulate Psychic Functions – Using Caffeine as an Example. *Eur. Rev.* 20, 316–323.

Fredholm, B.B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., Zvartau, E.E., 1999. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* 51, 83–133.

Freedman, N.D., Ph, D., Park, Y., Sc, D., Abnet, C.C., Hollenbeck, A.R., 2012. Association of Coffee Drinking with Total and Cause-Specific Mortality — NEJM. *N. Engl. J. Med.* 9–10.

Gevaerd, M.S., Takahashi, R.N., Silveira, R., Cunha, C. Da, Cie, F., 2001. Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats 55, 101–106.

Golden, J., Riddle, D., 1984. The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: Developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Dev. Biol.* 102, 368–78.

Hsin, H., Kenyon, C., 2009. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans* animal is extended . Our findings suggest that germline signals act. *Nature* 399, 362–6.

Hsu, A.-L., Murphy, C.T., Kenyon, C., 2003. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 300, 1142–5.

Jia, K., Chen, D., Riddle, D.L., 2004. The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development* 131, 3897–906.

Kenyon, C., 2001. A conserved regulatory system for aging. *Cell* 105, 165–168.

Kenyon, C., 2010. A pathway that links reproductive status to lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1204, 156–62.

Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., Tabtiang, R., 1993. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 5, 225–229.

Kenyon, C.J., 2010. The genetics of ageing. *Nature* 464, 504–12.

Kimura, K., Tissenbaum, H., Liu, Y., Ruvkun, G., 1997. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* (80-277), 942–946.

Klass, M., 1983. A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results. *Mech. Ageing Dev.* 22, 279–286.

Li, J., Ebata, A., Dong, Y., Rizki, G., Iwata, T., Lee, S.S., 2008. *Caenorhabditis elegans* HCF-1 functions in longevity maintenance as a DAF-16 regulator. *PLoS Biol.* 6, e233.

Lin, K., Hsin, H., Libina, N., Kenyon, C., 2001. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat. Genet.* 28, 139–145.

Lublin, A., Isoda, F., Patel, H., Yen, K., Nguyen, L., Hajje, D., Schwartz, M., Mobbs, C., 2011. FDA-approved drugs that protect mammalian neurons from glucose toxicity slow aging dependent on *cbp* and protect against proteotoxicity. *PLoS One* 6, e27762.

Mukhopadhyay, A., Tissenbaum, H. a, 2007. Reproduction and longevity: secrets revealed by *C. elegans*. *Trends Cell Biol.* 17, 65–71.

Murphy, C.T., McCarroll, S. a, Bargmann, C.I., Fraser, A., Kamath, R.S., Ahringer, J., Li, H., Kenyon, C., 2003. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424, 277–83.

Prediger, R.D.S., Batista, L.C., Takahashi, R.N., 2005. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Neurobiol. Aging* 26, 957–64.

Ritchie, K., Carrière, I., de Mendonca, a, Portet, F., Dartigues, J.F., Rouaud, O., Barberger-Gateau, P., Ancelin, M.L., 2007. The neuroprotective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). *Neurology* 69, 536–45.

Saczynski, J.S., Beiser, a, Seshadri, S., Auerbach, S., Wolf, P. a, Au, R., 2010. Depressive symptoms and risk of dementia: the Framingham Heart Study. *Neurology* 75, 35–41.

Samuelson, A. V, Carr, C.E., Ruvkun, G., 2007. Gene activities that mediate increased life span of *C. elegans* insulin-like signaling mutants. *Genes Dev.* 21, 2976–2994.

Souza, D.O., Cunha, R.A., Dall, O.P., Porciu, L.O., Lara, D.R., 2003. Neuroprotection by caffeine and adenosine A_{2A} receptor blockade of β -amyloid neurotoxicity 1207–1209.

Speakman, J.R., 2005. Body size, energy metabolism and lifespan. *J. Exp. Biol.* 208, 1717–30.

Tullet, J.M. a, Hertweck, M., An, J.H., Baker, J., Hwang, J.Y., Liu, S., Oliveira, R.P., Baumeister, R., Blackwell, T.K., 2008. Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell* 132, 1025–38.

Van Raamsdonk, J.M., Meng, Y., Camp, D., Yang, W., Jia, X., Bénard, C., Hekimi, S., 2010. Decreased energy metabolism extends life span in *Caenorhabditis elegans* without reducing oxidative damage. *Genetics* 185, 559–71.

Wahlbeck, K., Forsén, T., Osmond, C., Barker, D.J., Eriksson, J.G., 2001. Association of schizophrenia with low maternal body mass index, small size at birth, and thinness during childhood. *Arch. Gen. Psychiatry* 58, 48–52.

Figures

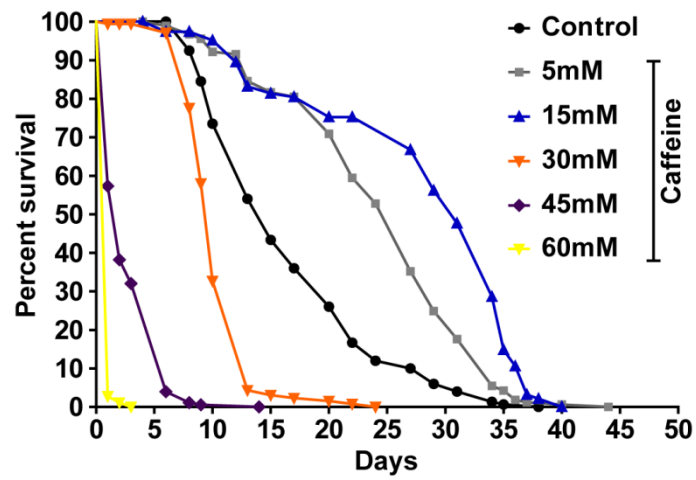


Figure 1 - Caffeine's exposure increases lifespan of wild-type worms

Survival curves of wild-type animals exposed to caffeine. Caffeine's treatment results in lifespan extension at 5 mM and 15 mM. At higher concentrations, caffeine reduces worm's life expectancy. $P < 0.0001$ for each condition compared to control. The experiment was performed three times.

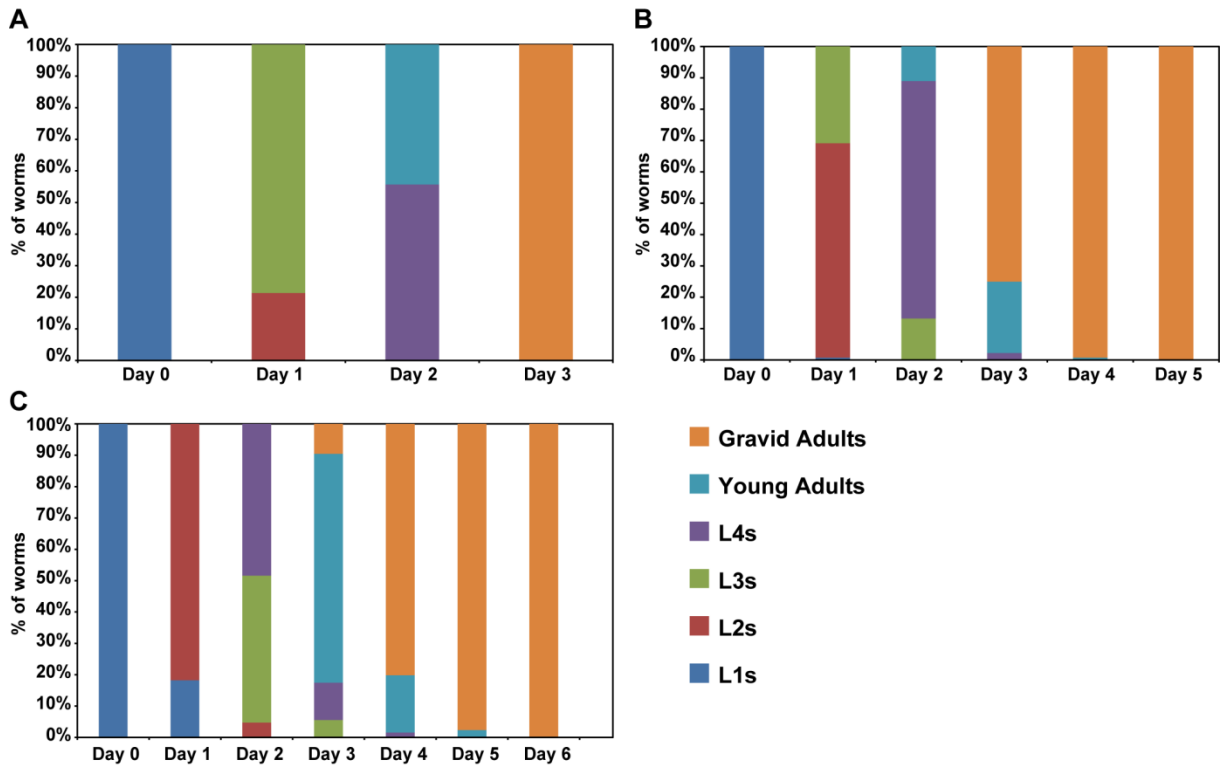


Figure 2 - Caffeine disrupts normal larval development

(A-C) Caffeine delays worm's larval development. L1 wild-type animals exposed to caffeine requires more time to achieve adult stage.

(A) Control animals reaches adult stage within three days (n=131 worms).

(B) Worms exposed to 5 mM caffeine need four days to complete development (n=136 worms).

(C) Worms exposed to 15 mM caffeine exhibited a larger delay on larval development (n=126 worms).

The experiment was performed three times at 20°C.

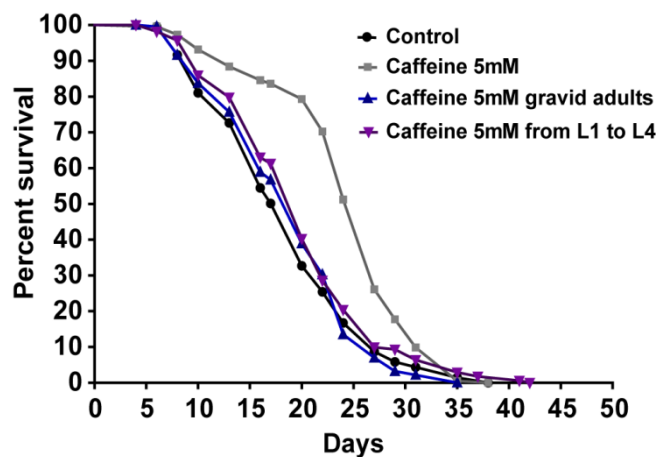


Figure 3 - Worm's lifespan extension requires lifelong caffeine exposure

Survival curves of wild-type animals exposed to 5 mM caffeine for different periods. Worms exposed to caffeine from L1 to L4 larval stages or from adult stage until death have lifespan similar to control animals. Animals exposed to caffeine throughout their lives shows an increased lifespan.

Experiment was performed three times.

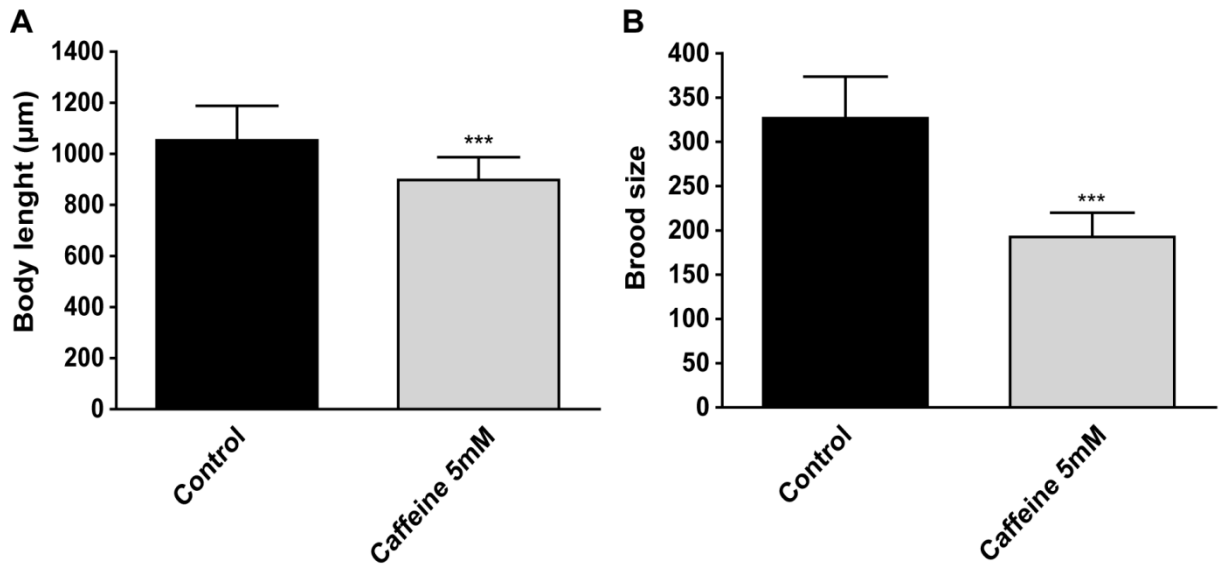


Figure 4. Caffeine reduces worm's size and reproduction

(A-B) Measurements of worm's length and brood size.

(A) Adult animals exposed to 5 mM caffeine from L1 larval stage have a decreased body length (top-to-tail) compared to control worms. Black and gray bars represents control and caffeine exposed animals. Data are showed as mean \pm SD.

*** $p < 0.0001$ compared to control animals, $n = 12$ worms per group

(B) Wild-type worms exposed to 5 mM caffeine shows a sharp reduction on egg-laying compared to control animals. Black and gray bars represents control and caffeine exposed animals. Data are showed as mean \pm SD.

*** $p < 0.0001$ compared to control animals, $n = 22-40$ worms

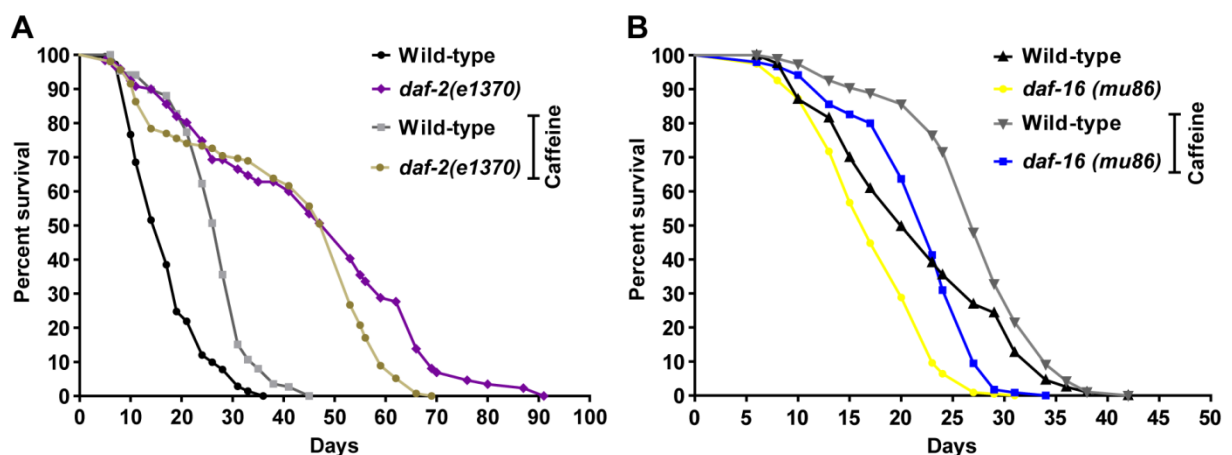


Figure 5 – Caffeine induced lifespan extension is partly dependent on DAF-2 but not on DAF-16

(A-B) Survival curves of *daf-2* and *daf-16* mutants exposed to caffeine.

(A) *daf-2* mutants has a lifelong phenotype compared to wild type. 5 mM caffeine's exposure slightly increases *daf-2* animal's lifespan.

$p = 0.0005$, *daf-2* control animals compared to *daf-2* animals exposed to caffeine.

(B) *daf-16* mutants exposed to 5 mM caffeine has a lifespan increase similar to wild type worms. $p < 0.0001$, *daf-16* control animals compared to *daf-16* animals exposed to caffeine.

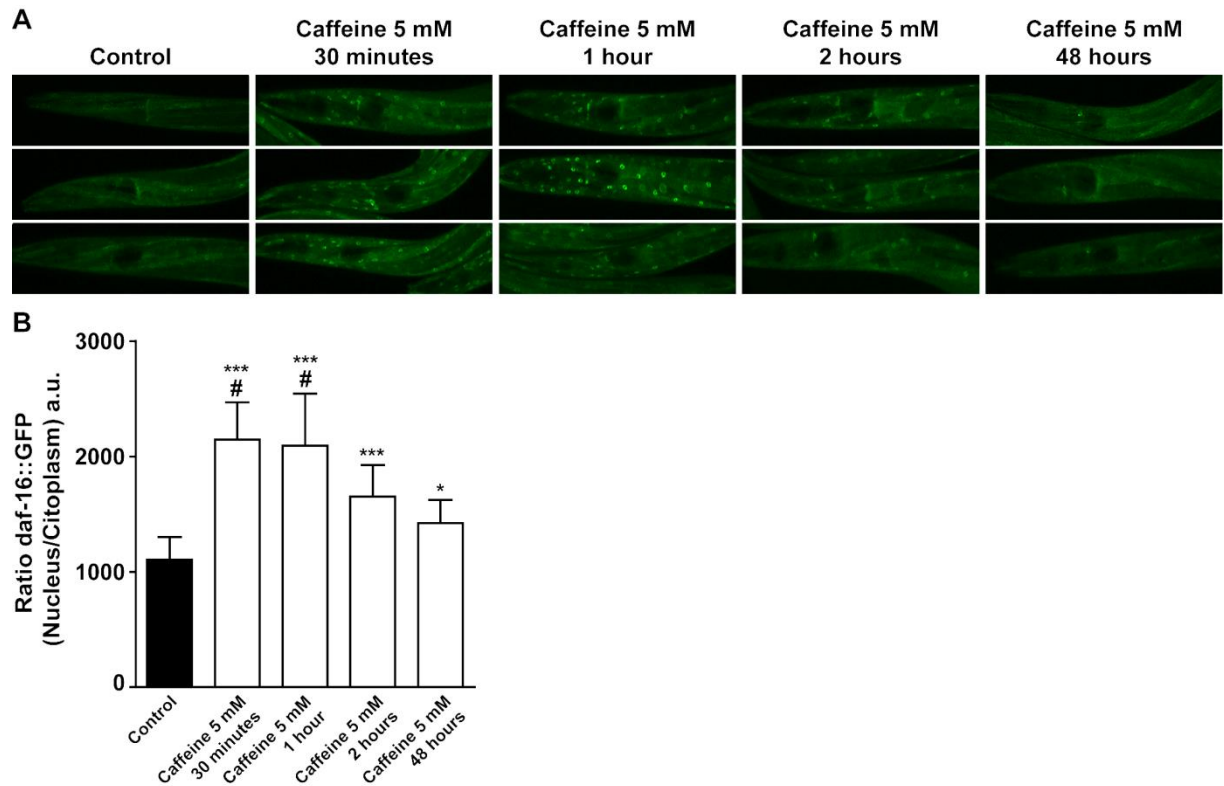


Figure 6. Acute caffeine exposure translocates DAF-16 to nucleus

(A-B) Caffeine's exposure for a short period of time translocates DAF-16 from cytoplasm to nucleus.

(A) Representative images and (B) fluorescence quantification of *daf-16::gfp* animals exposed to 5 mM caffeine during different periods. Black bar and gray bars represents control and 5 mM caffeine exposure respectively. Data are showed as mean \pm SD from six cells from each worm.

* $p < 0.05$ and *** $p < 0.0001$, caffeine exposed animals compared to control animals.

$p < 0.0001$ animals exposed to caffeine for 30 minutes and 1 hour compared to 48 hours exposed animals

n= 12-17 worms were evaluated in each group.

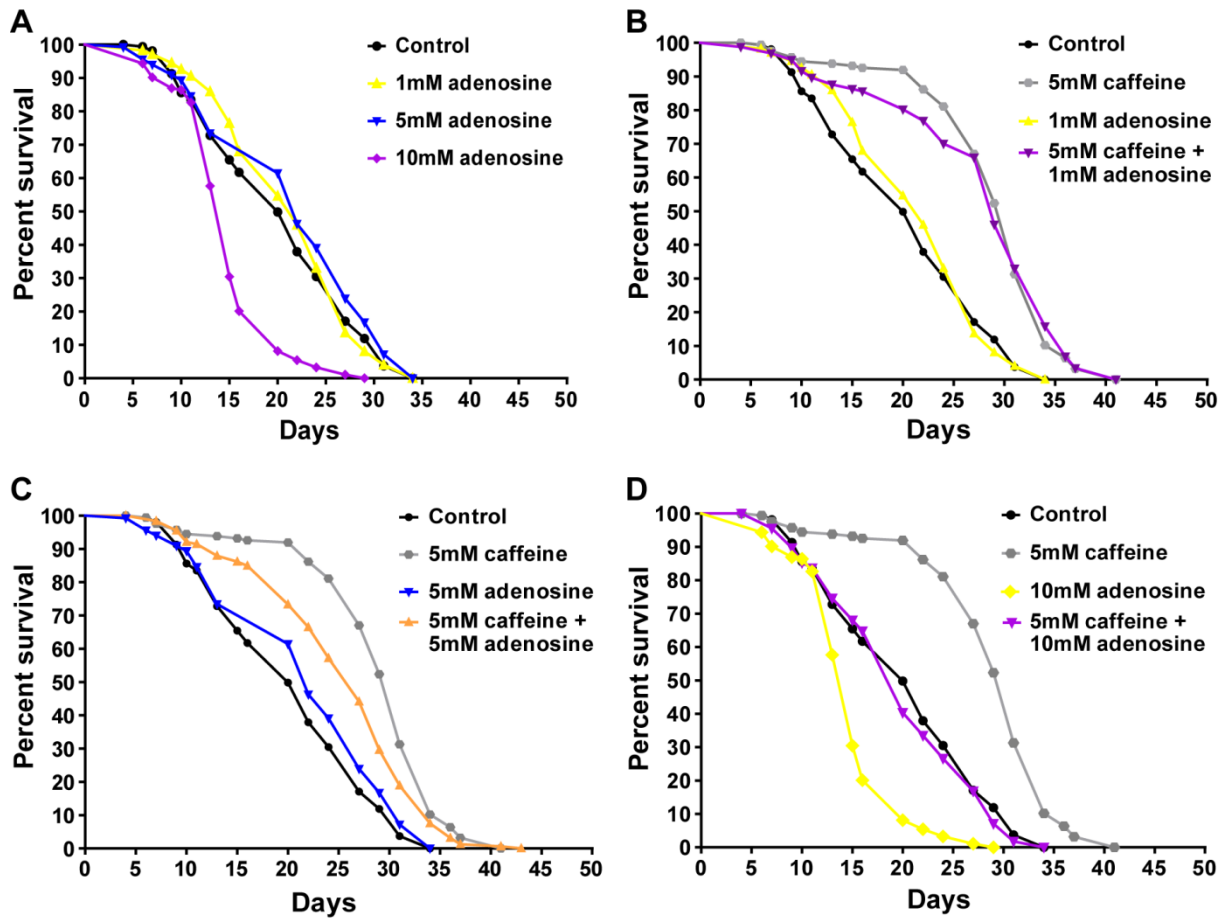


Figure 7: Adenosine partially antagonizes caffeine's lifespan increase

(A-D) Survival curves of wild-type animals exposed to caffeine and/or adenosine.

(A) Animals exposed to different concentrations of adenosine. 10 mM adenosine reduces worm's lifespan. $P < 0.0001$, 10 mM adenosine exposed animals compared to control animals

(B-D) Adenosine partly reverses caffeine induced worm's lifespan extension. For p-values and n please see table 4.

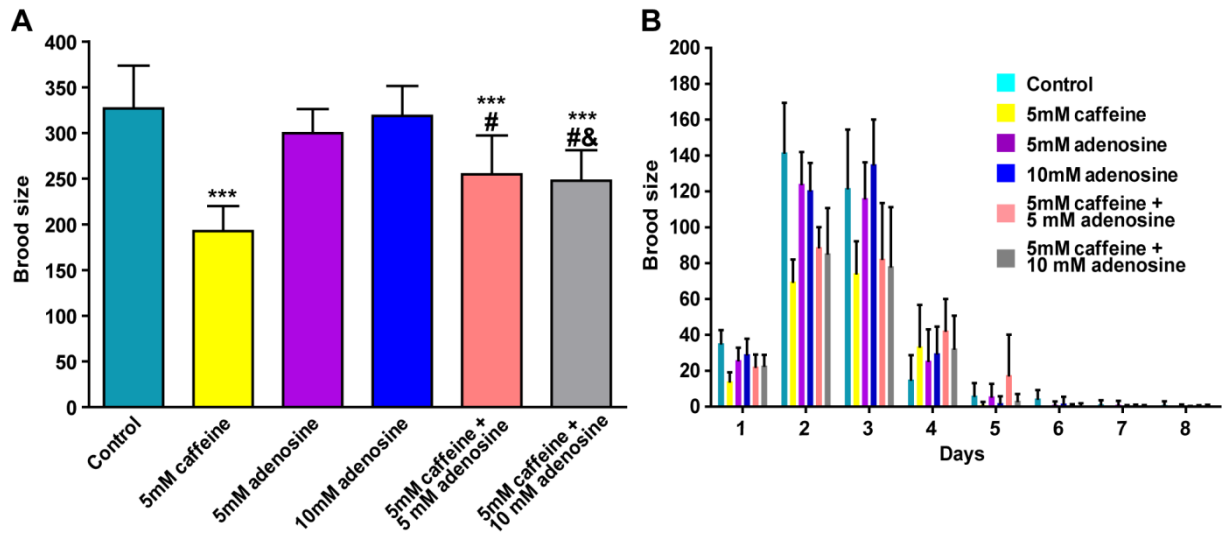


Figure 8. Adenosine partially reverses caffeine's brood size reduction

(A-B) Quantitation of egg-laying phenotypes of animals exposed to caffeine and/or adenosine.

(A) Adenosine partially reversed caffeine induced brood size reduction. Each color represents one condition. Data are showed as mean of twelve animals per group \pm SD.

*** $p < 0.0001$ compared to control group. # $p < 0.001$ compared to 5 mM caffeine treated group. & $p < 0.0001$ compared to 10 mM adenosine group.

(B) Distribution of offspring through fertile period of wild-type worms exposed to caffeine and/or adenosine.

Tables

Table 1: Lifespan of wild-type worms exposed to caffeine

Genotype	Caffeine (mM)	Median lifespan (days)	Number of animals(n) /censored	P value vs. control
Wild-type	-	15	156/33	
	5	27	167/22	<0.0001
	15	31	107/87	<0.0001
	30	10	162/14	<0.0001
	45	2	178/0	<0.0001
	60	1	181/0	<0.0001

Table 2: Lifespan of wild-type worms exposed to caffeine at different stage and time-period

Genotype	Caffeine (mM)	Treatment	Median lifespan (days)	Number of animals(n) /censored	P value vs. control
Wild-type	0	-	20	142/78	
	5	entire lifetime	27	205/22	<0.0001
	5	adult	20	187/41	0.9157
	5	L1 - L4	20	176/48	0.0885

Table 3: Lifespan of wild-type, *daf-2(e1370)* and *daf-16 (mu86)* worms exposed to caffeine since L1

Genotype	Caffeine (mM)	Median lifespan (days)	Number of animals(n) /censored	P value vs. control
Wild-type	-	17	150/39	
	5	28	116/64	<0.0001
<i>daf-2 (e1370)</i>	-	53	103/18	
	5	53	148/58	0.0005
Wild-type	-	20	198/18	
	5	27	186/7	<0.0001
<i>daf-16 (mu86)</i>	-	17	220/7	
	5	23	233/10	<0.0001

Table 4: Lifespan of wild-type worms exposed to caffeine and/ adenosine since L1

Genotype	Caffeine (mM)	Adenosine (mM)	Median lifespan (days)	Number of animals(n) /censored	P value vs. control	P value vs. 5C	P value vs. Adenosine
Wild-type	-	-	20	137/26			
	5	-	31	157/17	<0.0001		
	-	1	22	134/40	0.5304		
	-	5	22	126/10	0.0847		
	-	10	15	185/10	<0.0001		
	5	1	29	147/15	<0.0001	0.8621	<0.0001
	5	5	27	162/25	<0.0001	0.0001	<0.0001
	5	10	20	121/42	0.3993	<0.0001	<0.0001

CAPÍTULO III

1 Considerações finais

Neste trabalho observamos que baixas concentrações de cafeína aumentam a longevidade do verme *C. elegans*. Contudo, este efeito está condicionado à exposição crônica à substância, visto que os animais expostos somente durante o período de desenvolvimento larval ou durante o estágio adulto, evidenciaram tempo de vida similar aos vermes expostos ao veículo. Em contrapartida, animais expostos a altas concentrações de cafeína sequer saíram do estágio larval L1 e apresentaram alta mortalidade, refletindo, possivelmente, toxicidade. A cafeína promoveu outras alterações fenotípicas nos vermes, incluindo atraso no desenvolvimento larval, diminuição do tamanho e da reprodução.

O potencial da cafeína em aumentar a longevidade no *C. elegans* já foi descrito em um estudo (Lublin *et al.*, 2011). Contudo, pouco se sabe sobre os possíveis mecanismos envolvidos. Em humanos, grande coorte recente observou efeitos benéficos do café, incluindo aumento da sobrevida (Freedman *et al.*, 2012).

Como supramencionado, a atividade da via de sinalização DAF-2/DAF-16 (insulina/IGF-1) está intimamente relacionada com o tempo de vida do verme. Esta via é evolutivamente conservada (Heemst, 2010). Para verificar se a cafeína aumenta a longevidade modulando a via IIS, nós expusemos cepas de vermes com mutação de perda-de-função, temperatura sensível, do gene do receptor DAF-2 (Kimura *et al.*, 1997) e outra homocigota para mutação com perda-de-função do fator de transcrição DAF-16 à cafeína. Houve aumento na longevidade dos animais mutantes para DAF-16, sugerindo que o mesmo não é necessário para o aumento da longevidade induzida pela cafeína. Curiosamente, observamos que animais transgênicos expressando DAF-16::GFP, após exposição aguda (2h) à cafeína, exibem aumento expressivo da localização do DAF-16 no núcleo em relação ao citoplasma. Isto sugere que apesar de não ser necessário para o aumento da sobrevida, DAF-16 é modulado pela cafeína. Já os animais mutantes para DAF-2 exibiram aumento da longevidade bem inferior ao observado nos animais controles expostos à cafeína. Isto sugere participação da via IIS no aumento da longevidade induzida pela cafeína.

Em mamíferos, a cafeína tem ação principalmente no sistema purinérgico através do antagonismo dos receptores de adenosina (Cunha e Agostinho, 2010; Fredholm *et al.*, 1999). Até o momento os receptores de adenosina ortólogos no

verme ainda não foram clonados. Para caracterizar se a cafeína tem via de ação comum à adenosina no verme, testamos se a exposição à adenosina reverte os fenótipos induzidos pela cafeína. A adenosina reduziu o aumento de longevidade gerado pela cafeína de maneira concentração dependente. Já com relação à reprodução, a adenosina não foi capaz de aumentar o número de progênes reduzido pela cafeína. Isto sugere que é provável que a farmacodinâmica da cafeína envolva o sistema purinérgico, mas é necessário mais estudos para caracterizar os pontos de interação.

Outra hipótese é que os fenótipos exibidos pelos vermes expostos a cafeína (menor tamanho e redução da reprodução) estão diretamente relacionados ao aumento da longevidade. Isto porque o menor custo energético destes animais, por serem menores e não usarem tanta energia para reprodução permitiria que vivessem mais (Hansen, Flatt e Aguilaniu, 2013). Postulamos que é possível que a cafeína aumente a longevidade dos animais por alterar processos biológicos que reduzem o gasto energético.

Este estudo contribuiu para a caracterização dos efeitos da cafeína no nematódeo *C. elegans*. Em especial, demonstramos que a cafeína é capaz de estender a vida do verme. Sugerimos que os efeitos da cafeína na longevidade são parcialmente mediados através da via IIS e parecem envolver via semelhante ao sistema purinérgico. O esclarecimento futuro destas interações pode elucidar novos genes relacionados a patogênese e terapêutica de doenças crônicas e neurodegenerativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, E. L. *et al.* Daily coffee consumption and prevalence of nonmelanoma skin cancer in Caucasian women. **European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)**, v. 16, n. 5, p. 446–52, out. 2007.
- ALHO, Ana Tereza Di Lorenzo. Caracterização da substância negra humana durante o envelhecimento. 2011. **Tese (Doutorado em Fisiopatologia Experimental) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde-01122011-175727/>>. Acesso em: 2013-12-08.
- AFANAS'EV, I. Signaling and Damaging Functions of Free Radicals in Aging-Free Radical Theory, Hormesis, and TOR. **Aging and disease**, v. 1, n. 2, p. 75–88, out. 2010.
- AMRIT, F.; MAY, R. Younger for longer: Insulin signalling, immunity and ageing. **Curr Aging Sci**, p. 166–176, 2010.
- ARANDA, J. V *et al.* Maturation of caffeine elimination in infancy. **Archives of Disease in Childhood**, v. 54, n. 12, p. 946–949, 1 dez. 1979.
- ARENDASH, G.; SCHLEIF, W.; REZAI-ZADEH, K. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain β -amyloid production. **Neuroscience**, v. 142, p. 941–952, 2006.
- BACK, P.; BRAECKMAN, B. P.; MATTHIJSSSENS, F. ROS in aging *Caenorhabditis elegans*: damage or signaling? **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, p. 608478, jan. 2012.
- BARGMANN, C. I. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* Genome. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2028–2033, 11 dez. 1998.
- BJORKSTEN, J. The crosslinkage theory of aging. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 16, n. 4, p. 408–27, abr. 1968.
- BJORKSTEN, J.; TENHU, H. The crosslinking theory of aging--added evidence. **Experimental gerontology**, v. 25, n. 2, p. 91–5, jan. 1990.
- BRADY, Scott T. Basic Neurochemistry: Principles of molecular, cellular and medical neurobiology, 8 ed. Oxford, UK. **Elsevier**, 2012
- BRENNER, S. The genetics of behaviour. **British medical bulletin**, v. 29, n. 3, p. 269–71, set. 1973.

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. p. 415–447, 2009.

C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science (New York, N.Y.)**, v. 282, n. 5396, p. 2012–8, 11 dez. 1998.

CAO, C. *et al.* Caffeine suppresses β -amyloid levels in plasma and brain of Alzheimer's transgenic mice. **J Alzheimers Dis**, v. 17, n. 3, p. 681–697, 2009.

CHAPMAN, T.; PARTRIDGE, L. Female fitness in *Drosophila melanogaster*: an interaction between the effect of nutrition and of encounter rate with males. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 263, n. 1371, p. 755–9, 22 jun. 1996.

CHEN, J.-F. *et al.* What knock-out animals tell us about the effects of caffeine. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 20 Suppl 1, p. S17–24, jan. 2010.

CHOKSI, K. B. *et al.* Lower levels of F2-isoprostanes in serum and livers of long-lived Ames dwarf mice. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 364, n. 4, p. 761–4, 28 dez. 2007.

CLANCY, D. J. *et al.* Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. **Science (New York, N.Y.)**, v. 292, n. 5514, p. 104–6, 6 abr. 2001.

COLMAN, R. J. *et al.* Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. **Science (New York, N.Y.)**, v. 325, n. 5937, p. 201–4, 10 jul. 2009.

CORNELIUS, E. Increased incidence of lymphomas in thymectomized mice--evidence for an immunological theory of aging. **Experientia**, v. 28, n. 4, p. 459, 15 abr. 1972.

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

CRAWFORD, D.; LIBINA, N.; KENYON, C. *Caenorhabditis elegans* integrates food and reproductive signals in lifespan determination. **Aging cell**, v. 6, n. 5, p. 715–21, out. 2007.

CUNHA, R. A.; AGOSTINHO, P. M. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 20 Suppl 1, p. S95–116, jan. 2010.

DAM, R. VAN *et al.* Coffee, Caffeine, and Risk of Type 2 Diabetes A prospective cohort study in younger and middle-aged US women. **Diabetes Care**, v. 29, n. 2, p. 398–403, 1 fev. 2006.

DAVIDOVIC, M. *et al.* Old age as a privilege of the “selfish ones”. **Aging and disease**, v. 1, n. 2, p. 139–46, out. 2010.

DARWIN, Charles. A origem das Espécies, 1809-1882. Tradução Eugênio Amado, Belo Horizonte. **Editora Itatiaia**, 2002.

DEWACHTER, I.; DORPE, J. VAN; SPITTAELS, K. Modeling Alzheimer’s disease in transgenic mice: effect of age and of presenilin1 on amyloid biochemistry and pathology in APP/London mice. **Exp Gerontol**, v. 35, n. 6-7, p. 831–841, set. 2000.

DORMAN, J. *et al.* The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 141, n. 4, p. 1399–406, 1995.

DU, Y. *et al.* Association of serum caffeine concentrations with serum glucose levels in caffeine-drug users and non-users - results of German National Health Surveys. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 9, n. 5, p. 756–8, set. 2007.

DUNWIDDIE, T.; MASINO, S. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annual review of neuroscience**, p. 31–55, 2001.

EWBANK, J. J. Tackling both sides of the host-pathogen equation with *Caenorhabditis elegans*. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 4, n. 2, p. 247–56, fev. 2002.

FEOKTISTOV, I.; BIAGGIONI, I. Adenosine A2B receptors. **Pharmacological reviews**, v. 49, n. 4, 1997.

FINCH, C. E.; RUVKUN, G. The genetics of aging. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 2, p. 435–62, 28 jan. 2001.

FIRE, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806–11, 19 fev. 1998.

FISONE, G.; BORGKVIST, A; USIELLO, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. **Cellular and molecular life sciences CMLS**, v. 61, n. 7-8, p. 857–872, abr. 2004.

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

FREDHOLM, B. B. How Drugs can Stimulate Psychic Functions – Using Caffeine as an Example. **European Review**, v. 20, n. 03, p. 316–323, 2 maio. 2012.

FREDHOLM, B.; HEDQVIST, P. Modulation of neurotransmission by purine nucleotides and nucleosides. **Biochemical pharmacology**, v. 29, p. 1635–1643, 1980.

FREEDMAN, N. D. *et al.* Association of Coffee Drinking with Total and Cause-Specific Mortality — NEJM. **New England Journal of Medicine**, p. 9–10, 2012.

GELDER, B. VAN; BUIJSSE, B. Coffee consumption is inversely associated with cognitive decline in elderly European men: the FINE Study. **European journal of clinical Nutrition**, v. 61, n. 2, p. 226–32, fev. 2006.

GEMS, D.; DOONAN, R. The Nematode *Caenorhabditis elegans*: Oxidative Stress and Aging in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. p. 81–108, 2008.

GEVAERD, M. S. *et al.* Caffeine reverses the memory disruption induced by intranigral MPTP-injection in rats. **Brain research bulletin**, v. 55, n. 1, p. 101–106, 2001.

HANSEN, M.; FLATT, T.; AGUILANIU, H. Reproduction, fat metabolism, and life span: what is the connection? **Cell metabolism**, v. 17, n. 1, p. 10–9, 8 jan. 2013.

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

HEEMST, D. VAN. Insulin, IGF-1 and longevity. **Aging and Disease**, v. 1, n. 2, p. 147–57, out. 2010.

HOLEHAN, A. M.; MERRY, B. J. The experimental manipulation of ageing by diet. **Biological Reviews**, v. 61, n. 4, p. 329–368, nov. 1986.

HOLLOSZY, J. O. *et al.* Effect of voluntary exercise on longevity of rats. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 59, n. 3, p. 826–31, set. 1985.

HOLMES, G. E.; BERNSTEIN, C.; BERNSTEIN, H. Oxidative and other DNA damages as the basis of aging: a review. **Mutation research**, v. 275, n. 3-6, p. 305–15, set. 1992.

HOUTHOOFD, K. *et al.* Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in *Caenorhabditis elegans*. **Experimental gerontology**, v. 37, n. 12, p. 1371–8, dez. 2002.

HOUTHOOFD, K. *et al.* Life extension via dietary restriction is independent of the Ins/IGF-1 signalling pathway in *Caenorhabditis elegans*. **Experimental Gerontology**, v. 38, n. 9, p. 947–954, 2003.

HOUTHOOFD, K. *et al.* Dietary restriction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Interdisciplinary topics in gerontology**, v. 35, p. 98–114, jan. 2007.

HSU, A.-L.; MURPHY, C. T.; KENYON, C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. **Science (New York, N.Y.)**, v. 300, n. 5622, p. 1142–5, maio. 2003.

HULBERT, A. J. *et al.* Metabolic rate is not reduced by dietary-restriction or by lowered insulin/IGF-1 signalling and is not correlated with individual lifespan in *Drosophila melanogaster*. **Experimental gerontology**, v. 39, n. 8, p. 1137–43, ago. 2004.

HULBERT, A.; PAMPLONA, R. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. **Physiological reviews**, p. 1175–1213, 2007.

HUMPHREY, D.; PARSONS, R. Alternative oxidase rescues mitochondria-mediated dopaminergic cell loss in *Drosophila*. **Human molecular genetics**, v. 21, n. 12, p. 2698–2712, 2012.

JACOBSON, K. Adenosine A₃ receptors: novel ligands and paradoxical effects. **Trends in pharmacological sciences**, v. 19, n. 5, p. 184–191, 1998.

JIN, K. Modern Biological Theories of Aging. **Aging and disease**, v. 1, n. 2, p. 72–74, 1 out. 2010.

KALETSKY, R.; MURPHY, C. T. The role of insulin/IGF-like signaling in *C. elegans* longevity and aging. **Disease models mechanisms**, v. 3, n. 7-8, p. 415–419, 2010.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 387–398, maio. 2006.

KENYON, C. *et al.* A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. **Nature**, v. 363, n. 1, p. 225–229, 1993.

KENYON, C. J. The genetics of ageing. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 504–12, 25 mar. 2010.

KIMURA, K. *et al.* *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 277, n. 5328, p. 942–946, 15 ago. 1997.

KIRKWOOD, T. B. Evolution of ageing. **Nature**, v. 270, n. 5635, p. 301–4, 24 nov. 1977.

KLASS, M. R. Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span. **Mechanisms of ageing and development**, v. 6, n. 6, p. 413–29, 1977.

KURZ, C. L. *et al.* *Caenorhabditis elegans* *pqp-5* is involved in resistance to bacterial infection and heavy metal and its regulation requires TIR-1 and a p38 map kinase cascade. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 363, n. 2, p. 438–43, 16 nov. 2007.

LACHANCE, M. P.; MARLOWE, C.; WADDELL, W. J. Autoradiographic disposition of [1-methyl-¹⁴C]- and [2-¹⁴C]caffeine in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 71, n. 2, p. 237–241, nov. 1983.

LAKOWSKI, B.; HEKIMI, S. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 22, p. 13091–6, 27 out. 1998.

LAU, C.; MA, F.; FALK, J. Oral and IP caffeine pharmacokinetics under a chronic food-limitation condition. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 1995.

LEE, S.-J.; KENYON, C. Regulation of the longevity response to temperature by thermosensory neurons in *Caenorhabditis elegans*. **Current biology: CB**, v. 19, n. 9, p. 715–22, 12 maio. 2009.

LIN, K. *et al.* *daf-16*: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 278, n. 5341, p. 1319–22, 14 nov. 1997.

LIU, R. *et al.* Caffeine intake, smoking, and risk of Parkinson disease in men and women. **American journal of epidemiology**, v. 175, n. 11, p. 1200–7, 1 jun. 2012.

LOEB, J.; NORTHROP, J. On the influence of food and temperature upon the, duration of life. **The Journal of biological chemistry**, 1917.

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

LUBLIN, A. L.; LINK, C. D. Alzheimer ' s disease drug discovery : in vivo screening using *Caenorhabditis elegans* as a model for β -amyloid peptide-induced toxicity. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 10, n. 1, p. e115–e119, 2013.

MAGALHÃES, J. DE; BUDOVSKY, A. The Human Ageing Genomic Resources: online databases and tools for biogerontologists. **Ageing cell**, v. 8, n. 1, p. 65–72, 2009.

MANDEL, H. G. Update on caffeine consumption, disposition and action. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 9, p. 1231–1234, 2002.

MCPHERSON, P. S. *et al.* The Brain Ryanodine Receptor: a caffeine-sensitive calcium release channel. **Neuron** : v. 7, p. 17–25, 1991.

MICHAUD, D. S. *et al.* Coffee and tea intake and risk of brain tumors in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort study 1 – 3. p. 1145–1150, 2010.

Miller RA. The Biology of Aging and Longevity. In: McGraw Hill, editor. **Principles of Geriatric Medicin and Gerontology**. Columbs, 2003: 3-15.

MORRIS, J. Z.; TISSENBAUM, H. A.; RUVKUN, G. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 382, n. 6591, p. 536–9, 8 ago. 1996.

MURPHY, C. T. *et al.* Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 424, n. 6946, p. 277–83, 17 jul. 2003.

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

ORGANIZATION, W. H. Preventing Chronic Diseases-A Vital Investment: **WHO Global Report**. 2005.

PANOWSKI, S. H. *et al.* PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of *C. elegans*. **Nature**, v. 447, n. 7144, p. 550–5, 31 maio. 2007.

PARADIS, S.; AILION, M.; TOKER, A. A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Genes & Development**, p. 1438–1452, 1999.

POHANKA, M.; DOBES, P. Caffeine inhibits acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 5, p. 9873–82, jan. 2013.

RATES, S. M. K. Metilxantinas in: SIMÕES, C. M. O. *et al* (org), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2. ed. ver. Porto Alegre: Florianópolis: **Ed. da UFRGS, Ed. da UFSC**, 2000

RIDDLE, D. L.; *et al.* **C. elegans II**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19997/>>. Acesso em: 8 dez. 2013

RITCHIE, K. *et al.* The neuroprotective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). **Neurology**, v. 69, n. 6, p. 536–45, 7 ago. 2007.

ROZEMULLER, A. J. M.; GOOL, W. A. VAN; EIKELENBOOM, P. The neuroinflammatory response in plaques and amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: therapeutic implications. **Current drug targets. CNS and neurological disorders**, v. 4, n. 3, p. 223–33, jun. 2005.

SAWADA, M.; CARLSON, J. C. Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the lifetime of the rat. **Mechanisms of ageing and development**, v. 41, n. 1-2, p. 125–37, nov. 1987.

SIMONIN, C. *et al.* Neurobiology of Disease Association between caffeine intake and age at onset in Huntington ' s disease. **Neurobiology of Disease**, v. 58, p. 179–182, 2013.

SINCLAIR, C. J.; GEIGER, J. D. Caffeine use in sports. A pharmacological review. **The Journal of sports medicine and physical fitness**, v. 40, n. 1, p. 71–9, mar. 2000.

SPRIET, L. L. Caffeine and performance. **International journal of sport nutrition**, v. 5 Suppl, p. S84–99, jun. 1995.

TAYLOR, R.; TURNBULL, D. Mitochondrial DNA mutations in human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 5, p. 389–402, 2005.

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

WEI, C. J. *et al.* Selective inactivation of adenosine A(2A) receptors in striatal neurons enhances working memory and reversal learning. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 18, n. 7, p. 459–74, jan. 2011.

WILLIAMS, G. Natural Selection, the Costs of Reproduction, and a Refinement of Lack's Principle. **The American Naturalist**, v. 100, n. 916, p. 687 – 690, 1966.

WOLKOW, C. A *et al.* Insulin Receptor Substrate and p55 Orthologous Adaptor Proteins Function in the *Caenorhabditis elegans* daf-2 Insulin Receptor Substrate and p55 Orthologous Adaptor Proteins Function in the *Caenorhabditis elegans* daf-2 / Insulin-like Signaling Pathway. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49591–7, 20 dez. 2002.

XIAO, R. *et al.* A genetic program promotes *C. elegans* longevity at cold temperatures via a thermosensitive TRP channel. **Cell**, v. 152, n. 4, p. 806–17, 14 fev. 2013.

ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo científico ao periódico *Neurobiology of aging*

Elsevier Editorial System(tm) for Neurobiology of Aging
Manuscript Draft

Manuscript Number: NBA-13-1158

Title: DAF-2 is partially required for caffeine lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*

Article Type: Regular Article

Section/Category: Model Systems

Keywords: Caffeine, longevity, *Caenorhabditis elegans*, adenosine

Corresponding Author: Ms. Jessika Cristina Bridi,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Minas Gerais

First Author: Jessika Cristina Bridi

Order of Authors: Jessika Cristina Bridi; Alexandre G Barros, M.D., Ph.D.; Leticia R Sampaio; Julia C Ferreira; Felix A Soares, Ph.D.; Marco Aurelio Romano-Silva, M.D., Ph.D.

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Caffeine is one of the most widely used psychoactive drug. Studies suggests that caffeine may be protective against many aging associated neuropsychiatric disorders. *Caenorhabditis elegans* has emerged as a powerful model to study aging determinants. Our aim was to evaluate caffeine effects over lifespan in this nematode. Caffeine was able to increase worm's lifespan, at least in part, by inhibition of insulin/IGF-1 pathway. Caffeine also delayed animal's larval development, reduced reproduction and body length. Adenosine reversed some of the caffeine-induced phenotypes suggesting a possible common target. Therefore, elucidation of mechanisms through which caffeine exerts its effects may shed light on new genes determinants of aging process.

ANEXO B – Declaração de Aprovação



FOLHA DE APROVAÇÃO

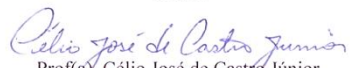
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CAFEÍNA NA LONGEVIDADE DO MODELO EXPERIMENTAL *Caenorhabditis elegans*

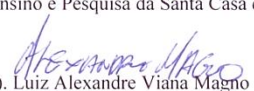
JESSIKA CRISTINA BRIDI

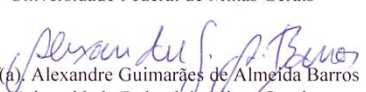
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

Aprovada em 20 de janeiro de 2014, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Marco Aurélio Romano Silva - Orientador
UFMG

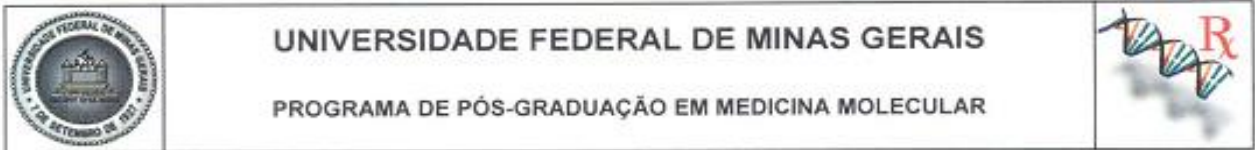

Prof(a). Célio José de Castro Júnior
Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de BH


Prof(a). Luiz Alexandre Viana Magno
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof(a). Alexandre Guimarães de Almeida Barros
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 20 de janeiro de 2014.

ANEXO C – Ata da Defesa



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA JESSIKA CRISTINA BRIDI - 2012652586

Realizou-se, no dia 20 de janeiro de 2014, às 13:30 horas, Sala 526, Faculdade de Medicina - Av Professor Alfredo Balena, nº190, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CAFEÍNA NA LONGEVIDADE DO MODELO EXPERIMENTAL Caenorhabditis elegans*, apresentada por JESSIKA CRISTINA BRIDI, número de registro 2012652586, graduada no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Marco Aurélio Romano Silva - Orientador (UFMG), Prof(a). Célio José de Castro Júnior (Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de BH), Prof(a). Luiz Alexandre Viana Magno (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Alexandre Guimarães de Almeida Barros (Universidade Federal de Minas Gerais).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 20 de janeiro de 2014.


 Prof(a). Marco Aurélio Romano Silva (Doutor)


 Prof(a). Célio José de Castro Júnior (Doutor)


 Prof(a). Luiz Alexandre Viana Magno (Doutor)


 Prof(a). Alexandre Guimarães de Almeida Barros (Doutor)