

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho” - Instituto de Biociências
Campus Botucatu, SP
Programa de Pós-graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE DISFUNÇÕES
DA PELE E DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS A PARTIR DA DIETA
ENRIQUECIDA COM O SUBPRODUTO DO CAFÉ (*Coffea arabica*)

MARIANA NAKABARA GAROZZO
ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CLAUDIO DI STASI

Botucatu, SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho” - Instituto de Biociências
Campus Botucatu, SP
Programa de Pós-graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE DISFUNÇÕES
DA PELE E DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS A PARTIR DA DIETA
ENRIQUECIDA COM O SUBPRODUTO DO CAFÉ (*Coffea arabica*)

MARIANA NAKABARA GAROZZO
ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CLAUDIO DI STASI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Biomoleculares e Farmacológicas do Instituto de Biociências de Botucatu e Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Botucatu, SP

2024

G237m

Garozzo, Mariana Nakabara

Modulação da expressão gênica de marcadores de disfunções da pele e de doenças neurodegenerativas a partir da denta enriquecida com o subproduto do café (*Coffea arabica*) / Mariana Nakabara

Garozzo. -- Botucatu, 2024

53 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

1. Expressão gênica. 2. Intestino. 3. Subproduto do café. 4. Pele. 5. Cérebro. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Modulação da expressão gênica de marcadores de disfunções da pele e de doenças neurodegenerativas a partir da dieta enriquecida com o subproduto do café (*Coffea arabica*)

AUTORA: MARIANA NAKABARA GAROZZO

ORIENTADOR: LUIZ CLAUDIO DI STASI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO DI STASI (Participação Presencial)
Departamento de Biofísica e Farmacologia / Instituto de Biociências de Botucatu UNESP

Prof. Dr. ANA ELISA VALENCISE QUAGLIO (Participação Presencial)
P&D / Verum Brasil Comércio Alimentício

Prof^ª. Dr^ª. ELLEN TANUS RANGEL (Participação Presencial)
Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Goiás

Botucatu, 05 de dezembro de 2024

FLÁVIA DANIELI MARTINS GODINHO
Assistente Técnico Administrativo I da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

“Happiness only real when shared”

- Alexander Supertramp

DEDICATÓRIA

*À minha invencível mãe, Erika;
Ao meu dedicado pai, Daniel;
E a todos os Professores que já
cruzaram o meu caminho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, por todo suporte e estrutura concedido durante a minha criação, principalmente aos meus pais, Erika e Daniel, meus avós Yurico, Filippo e Arlete, e minha irmã Fernanda. Sou privilegiada de ter crescido ao lado de vocês.

Agradeço ao Professor Luiz Claudio Di Stasi, pela oportunidade, confiança e orientação durante o processo mais desafiador e engrandecedor da minha vida até hoje. Que eu tenha sido tão boa aluna quanto o senhor é como orientador.

Agradeço aos meus grandes amigos Eduardo, Carolina, Matheus, Kevin, Luca, Rafael, Nicholas, Heloisa, Isadora, Pedro e Estevam, que tanto estiveram presentes na construção de uma jornada universitária prazerosa. A vida com vocês é mais colorida.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório FitoFarmaTec, Juliana, Bruna, Julia, Gabriela, Beatriz, Fabio, Vinícius, Yuri, Ana, Laís, Erika, Luíz, Tainan, e Nathalia pelas colaborações, ensinamentos, conversas e experiências. Trabalhar com vocês torna o processo acadêmico curiosamente leve e divertido.

Agradeço a Makaila e Xavier, meus animais de estimação, que foram minha principal companhia tanto em momentos de estudo, como em momentos de descanso, por me mostrarem um amor puro e genuíno desatado de questões humanas.

Agradeço a UNESP, que me mostrou a vantajosa vida de morar em Botucatu e realizou o sonho de me tornar uma profissional feliz e satisfeita no exercício de um trabalho altruísta como bióloga.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço ao CNPQ, pelo projeto do edital MAI/DAI em parceria com a UNESP.

Agradeço à Fapesp e à empresa Verum Ingredients do Brasil pelo suporte via projeto PIPE-FAPESP, no qual aprendi a ser pesquisadora.

PRÓLOGO

Nascida na capital de São Paulo e cercada por todas as oportunidades que a cidade grande oferece, segui a vocação de bióloga após muitas dúvidas sobre o que fazer e quem se tornar durante a vida. Ingressei em 2018 no curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho e me mudei para Botucatu, encontrando na cidade um inesperado lar. Me formei no Bacharelado e Licenciatura Plena, tendo me aproximado especialmente da Educação, da Biologia Marinha e finalmente da Farmacologia, onde encontrei as principais oportunidades de realizar todas as minhas ambições. Valorizo as ideias críticas que têm intenção de transformar a sociedade e sigo aproveitando as oportunidades que me aparecem, tendo sempre em mente: a Ciência nos traz a luz, e a Educação nos traz a liberdade.

Atividades realizadas durante o Mestrado (2022-2024)

Disciplinas cursadas

Disciplinas cursadas	Ano	Carga Horária	Conceito
Bases e Atualizações em Farmacologia e Biotecnologia	2022	45	A
Seminários em Biofísica	2022	90	A
Interação microbiota e sistema imune de mucosas	2023	60	A
Ciência e Sociedade	2023	60	A
Tópicos Especiais em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas - Screener: um jogo educacional sobre a descoberta e Desenvolvimento de Fármacos e medicamentos	2023	45	A
Total		300 h	

Participação em eventos científicos

Evento	Ano
XXII Jornada de Nutrição da Unesp de Botucatu	2023
IX Simpósio de Plantas Medicinais no Vale do São Francisco	2023
3rd Internacional Conference on Natural Products and Human Health	2023

III France-Brazil Meeting on Natural Products	2023
Semana de Estudos Agropecuários e Florestais de Botucatu	2023
I Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas	2023

Trabalhos apresentados em eventos científicos

GAROZZO, MN; PETRY, JCA; HENRIQUE, LJA; ALMEIDA, NS; JUNIOR, LDA; QUAGLIO, AEV; DIAS, RLA; DI STASI, LC. Atividade moduladora do subproduto do café (*Coffea arabica*) na microbiota intestinal em camundongos. IX Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco e 3rd France-Brazil Meeting on Natural Products. Setembro de 2023.

HENRIQUE, LJA; ALMEIDA, NS; PETRY, JCA; GAROZZO, MN; QUAGLIO, AEV; DI STASI, LC. Modulação da microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 pela suplementação dietética com farinha do caroço de açaí (*Euterpe oleracea mart.*). XXVII Congresso Brasileiro de Nutrologia. Outubro de 2023.

HENRIQUE, LJA; ALMEIDA, NS; PETRY, JCA; GAROZZO, MN; COSTA, EF; QUAGLIO, AEV; DI STASI, LC. Atividade moduladora pela dieta suplementada com o caroço de *Euterpe oleracea mart.* E seus efeitos em marcadores de desordens cutâneas. XXVII Congresso Brasileiro de Nutrologia. Outubro de 2023.

ALMEIDA, NS; HENRIQUE, LJA; PETRY, JCA; GAROZZO, MN; QUAGLIO, AEV; DI STASI, LC. Modulação da microbiota intestinal pela suplementação da farinha de *Musa spp AAA* em camundongos C57BL/6. XXVII Congresso Brasileiro de Nutrologia. Outubro de 2023.

GAROZZO, MN. Modulação da expressão gênica de marcadores da pele na dieta enriquecida com subproduto do café (*Coffea arabica*). Novembro de 2023.

Formação complementar

Mini-curso: Determinação estrutural de produtos naturais. Alcaloides Isoquinolínicos. Carga horária de 4 horas. Presencialmente na Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), PE, Brasil. Agosto de 2023.

Mini-curso: PD&I de Fitoterápicos do bioma cerrado. Carga horária de 4 horas. Presencialmente na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), MS, Brasil. Outubro de 2023.

Curso: Além da madeira: explorando o potencial farmacológico, social e empreendedor. Carga horária de 22h. Presencialmente na Universidade Estadual Paulista (UNESP), SP, Brasil. Novembro de 2023.

Colaboração em outros projetos de Pesquisa

Fermentação in vitro no mapeamento da atividade prebiótica em produtos de origem vegetal (Fabio Perez Ferraz de Mello – Tese de Doutorado)

Modulação da microbiota intestinal pela dieta enriquecida com o caroço de *Euterpe oleracea Mart.* e seus efeitos em marcadores de disfunções neurodegenerativas e dermatológicas (Laís Janaína Aparecida Henrique – Tese de Doutorado em andamento)

Desenvolvimento de fibra prebiótica derivada de subproduto da cadeia agrícola brasileira: polpa de *Coffea arabica* (Julia da Costa Aguiar Petry – Dissertação de Mestrado)

Modulação da microbiota intestinal pela *Musa spp* AAA e seus efeitos em marcadores de doenças da pele (Nathalia Soares de Almeida – Tese de Doutorado em andamento)

Outras atividades

Tutoria da disciplina de Inglês no Cursinho Popular Atena, do Instituto de Biociências de Botucatu. Março a dezembro de 2023.

Tutoria da disciplina de Biologia (frentes de Zoologia e Fisiologia) no Cursinho Popular Atena, do Instituto de Biociências de Botucatu. Início em março de 2024.

RESUMO

O café é uma planta de alto valor econômico e cultural devido a bebida que se prepara a partir de sua semente. Do plantio à bebida, partes do seu fruto como casca e polpa, tornam-se descarte e muitos compostos bioativos são desperdiçados. Na busca de diminuir este desperdício e o impacto ambiental gerado pelo descarte, a indústria farmacêutica é vista como grande potencial na pesquisa para a transformação desse resíduo em um subproduto de valor agregado na área da saúde. Neste contexto, o subproduto do café torna-se material de estudos a partir da sua implementação na dieta, e a sua digestão é avaliada em dois eixos do organismo que estão diretamente ligados ao intestino: eixo Intestino-Pele e eixo Intestino-Cérebro. Para que os estudos sobre a interferência do subproduto do café, por meio da digestão, interagissem nos eixos citados, foram utilizadas amostras de intestino, pele e cérebro de camundongos e análises de expressão gênica de genes previamente selecionados com atividades conhecidas em processos inflamatórios e disfuncionais da pele e em processos neurodegenerativos no cérebro. Dos 368 genes avaliados, 16 apresentaram resultados estatísticos significativos, sendo 8 no intestino, *Cldn4*, *Pax3*, *Psen2*, *Jun*, *Prss8*, *Sirt1*, *Tgm1* e *Tyr*; 4 na pele: *Hsp90aa1*, *Panx3*, *Cdk11* e *Muc1*; e 4 no cérebro, *Acss2*, *IL-6*, *Tgm1* e *Tgm5*. Destes resultados, o subproduto do café demonstrou uma atividade mais benéfica em relação ao cérebro e a marcadores de doenças neurodegenerativas do que nos marcadores dermatológicos e intestinais.

Palavras-chave: Subproduto do café; Intestino, Pele, Cérebro, Expressão gênica.

ABSTRACT

Coffee is a plant of high economic and cultural value due to the beverage made from its seeds. From planting to the drink, parts of its fruit, such as the skin and pulp, become waste, and many bioactive compounds are discarded. To reduce this waste and the environmental impact caused by disposal, the pharmaceutical industry is seen as a major potential player in researching the transformation of this waste into a value-added by-product in the health sector. In this context, the coffee by-product becomes the subject of studies focused on its implementation in the diet, with digestion being evaluated through two axes of the body that are directly linked to the intestine: the Gut-Skin Axis and the Gut-Brain Axis. To study how the coffee by-product influences these axes through digestion, samples from the intestine, skin, and brain of mice were used, along with gene expression analyses of previously selected genes known for their roles in inflammatory processes and dysfunctions in the skin and neurodegenerative processes in the brain. Out of the 368 genes evaluated, 16 showed statistically significant results, with 8 in the intestine, *Cldn4*, *Pax3*, *Psen2*, *Jun*, *Prss8*, *Sirt1*, *Tgm1* and *Tyr*; 4 in the skin, *Hsp90aa1*, *Panx3*, *Cdk11* e *Muc1*; and 4 in the brain, *Acss2*, *IL-6*, *Tgm1* e *Tgm5*. These results indicated that the coffee by-product exhibited more beneficial activity concerning the brain and markers of neurodegenerative diseases than with dermatological and intestinal markers.

Keywords: Coffee byproduct; Intestine; Skin; Brain; Gene expression.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVO.....	17
2.1 Objetivos específico.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Produto teste.....	18
3.2 Delineamento experimental.....	18
3.3 Análises de expressão gênica.....	19
3.3.1 Extração de RNA e quantificação.....	28
3.3.2. Transcrição reversa e PCR quantitativo.....	28
3.3.3. Normalização dos dados e cálculo dos valores de Foldchange.....	28
3.4. Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Dados clínicos.....	29
4.2. Influência da intervenção dietária com <i>Coffea arabica</i> na expressão gênica de marcadores do Intestino.....	30
4.3 Sobre a expressão gênica de marcadores analisados na Pele.....	31
4.4. Sobre a expressão gênica de marcadores analisados no Cérebro.....	32
5. DISCUSSÃO.....	33
6. CONCLUSÃO.....	46

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INTRODUÇÃO

O café (*Coffea arabica*, Rubiaceae) é uma planta mundialmente conhecida devido a bebida que se produz a partir da sua semente. No Brasil, ele se apresenta como um produto essencial tanto em âmbito econômico quanto sociocultural, de forma que é onde se instala a sua maior produção agrícola e seu segundo maior consumo (GUERRA *et al.*, 2021). Do plantio à bebida, encontram-se diversos processos que se caracterizam na comercialização de um produto de alta qualidade e rentabilidade (CORADI; BORÉM; OLIVEIRA, 2008). A lavagem, estocagem e transporte no pós-colheita são essenciais na manutenção da integridade dos frutos, que podem acarretar processos de fermentação ou de desenvolvimento de fungos se realizados de forma indevida (REZENDE, 2013). Após esta fase, os frutos selecionados passam por vias de processamento como a via seca, ou via úmida, para a formação inicial do grão de café que será comercializado (DURÁN *et al.*, 2016). Tanto na via seca, como na via úmida, há a perda de substâncias ou compostos dos frutos, como efluentes líquidos da polpa e a casca (REZENDE, 2013). Em adição, é importante ressaltar que a quantidade de resíduos agroindustriais gerados durante toda a cadeia produtiva do café pode resultar em um não aproveitamento de 30% a 40% dos produtos. Essa colocação se torna problemática quando se pensa em questões ambientais, principalmente quando relacionado ao seu descarte, que se torna poluente. Assim, é de interesse governamental e industrial planejar de modo mais efetivo o seu manuseio, bem como encontrar uma finalidade útil ao devido resíduo, tornando-o em um subproduto (ELLEN *et al.*, 2020). No caso do café, considerando principalmente os resíduos de casca, pode-se estimar uma quantidade muito próxima a de comercialização do próprio grão (30 milhões de sacas por ano). Entretanto, este resíduo apresenta constituintes moleculares bioativos que poderiam ser transformados em muitos produtos de alto valor agregado se explorado seu uso em diferentes indústrias (SOCCOL, 2000).

É nesta lacuna que a indústria farmacêutica se apresenta como grande potência na busca científica pela utilização do subproduto do café como matéria prima na elaboração de cosméticos ou medicamentos (VALENTE, 2015). Acrescenta-se, ainda, a ideia de que a implementação do uso de produtos naturais na saúde destaca-se quando comparado ao uso de medicamentos alopáticos sintéticos, que podem apresentar efeitos adversos indesejáveis no organismo (PAL; SHUKLA, 2003). O uso de produtos naturais, principalmente derivados de plantas, estão sendo altamente recomendados como aliados na manutenção da boa saúde, bem como na prevenção de doenças ao longo da vida

(PUGLIA; LAURO, 2019; EKOR, 2014). Nesse sentido, unem-se as ideias de redução de resíduos agrícolas para diminuição da interferência poluente no meio ambiente, com o potencial da indústria farmacêutica e alimentícia em explorar o uso de subprodutos em suas pesquisas e o interesse populacional de consumir produtos naturais na busca de uma vida mais saudável. Concordantemente, utilizar o subproduto do café como objetivo de estudo não apenas concretiza a íntima relação destas colocações, mas também destaca a propriedade da pesquisa científica brasileira no assunto, devido ao seu altíssimo consumo e produção (DURÁN et al., 2016). Uma das possibilidades de colocar este tipo de estudo em prática é a partir do uso do subproduto do café por meio de sua implementação na dieta, já que a ingestão é o principal processo de absorção dos nutrientes de interesse. O intestino, portanto, é um órgão intrinsecamente necessário de ser estudado neste trabalho.

O intestino é um órgão do trato gastrointestinal dividido em duas grandes porções: delgado e grosso. O intestino delgado é dividido em três segmentos sendo eles duodeno, jejuno e íleo, e realiza funções de término de digestão, secreções endócrinas e absorção de nutrientes. Já o intestino grosso (Figura 1) está relacionado a absorção de água, formação das fezes e secreção de muco, e apresenta características importantes como presença da microbiota intestinal (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1995). Das porções anatômicas e fisiológicas do intestino grosso, pode-se destacar ceco, cólon e o reto (ELLIS; MAHADEVAN, 2014).

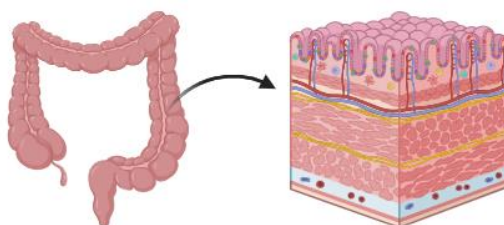


Figura 1: Ilustração esquemática da anatomia do intestino grosso e recorte dos principais tecidos e tipos celulares, realizados no aplicativo BioRender.

A microbiota intestinal é um grande conjunto de microrganismos presentes principalmente no intestino grosso, incluindo vírus, fungos, arqueias e especialmente bactérias, que participam ativamente de funções regulatórias no organismo hospedeiro como funções digestivas, imunes, hormonais e até manutenção da funcionalidade de órgãos distantes (DI VINCENZO et al., 2023; CALATAYUD et al., 2020). A relação mutualística entre a microbiota e o hospedeiro permite que o organismo se mantenha em homeostase se não apresentar processo de disbiose, em que esta microbiota apresenta

desequilíbrio na diversidade de microrganismos benéficos e patogênicos (ÁLVAREZ et al., 2021; SINHA; LIN; FERENCZI, 2021).

Além do intestino, um segundo destaque deste estudo procura clarear a relação entre intestino e pele (Figura 2), devidos as semelhanças entre esses órgãos, de modo que ambos são interface do organismo com o meio ambiente, e possuem características comuns como tecidos altamente vascularizados e presença de comunidade microbiana, que constituem o sistema de barreira e realizam proteção do organismo contra patógenos externos (CALATAYUD et al., 2020).

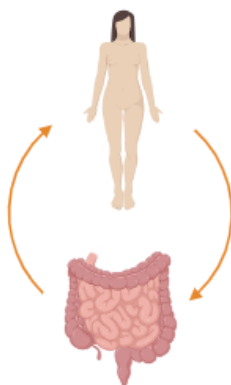


Figura 2: esquema do Eixo Intestino-Pele realizado no aplicativo ilustrativo BioRender.

A pele é o maior órgão do corpo humano e tem como principal função revestir o organismo de modo a criar um isolamento do ambiente interno ao externo. Ela possui duas importantes camadas, sendo epiderme, mais externa, e derme, mais interna, que estão em constante transformação e realizam funções importantes de comunicação (BERNARDO; SANTOS; SILVA, 2019). Estudos demonstram que o papel do processo de digestão, absorção e produção de metabólitos da microbiota intestinal está intimamente ligado a ocorrências na pele, como o envelhecimento celular (BOYAJIAN et al., 2021). Pode-se afirmar, portanto, uma relação de comunicação bidirecional entre o intestino e a pele, sendo denominada Eixo Intestino-Pele (ANDRADE et al., 2023). Embora este estudo e a relação de suas microbiotas aponte grandes conexões, ainda há muitos mecanismos desconhecidos dessa interação e sua relação com o desenvolvimento de doenças (SINHA; LIN; FERENCZI, 2021). Um exemplo de caso deste eixo pode ser constatado na expressão da psoríase como fator de predisposição da obesidade, sendo o seu caminho contrário também válido, devido ao desencadeamento de processos inflamatórios (ANDRADE et al., 2023). De modo a elucidar a comunicação entre esses

dois órgãos e a expressão de distúrbios e doenças interseccionais, é importante que se estude os marcadores genéticos e vias comuns dos processos de absorção e distribuição dos nutrientes, autofagia, inflamação, estresse oxidativo, barreira e atividade imune que os compõem.

Assim como a pele, o cérebro também é um órgão que já foi testemunhado em conter relações intrínsecas com o intestino, pondo em evidência o eixo Intestino-Cérebro (Figura 3). O cérebro é um órgão constituído por tecido nervoso e é o maior órgão do encéfalo. É parte fundamental do sistema nervoso central, que também inclui a medula espinhal e é responsável por coordenar e controlar diversas funções vitais do corpo humano. Essas funções cerebrais são variadas e complexas, abrangendo desde a resposta a estímulos sensoriais até a execução de movimentos, a regulação das emoções, a comunicação, o processamento de pensamentos e a memória. Ele recebe informações dos órgãos sensoriais, processa, e gera respostas apropriadas, desempenhando um papel crucial na interação do organismo com o ambiente (THAU; REDDY; SINGH, 2022).

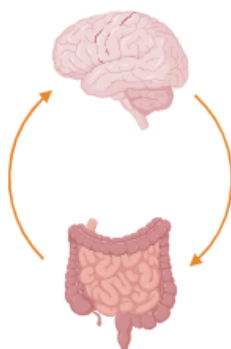


Figura 3: esquema do Eixo Intestino-Cérebro realizado no aplicativo ilustrativo BioRender.

A conexão nervosa entre o intestino e o cérebro é realizada principalmente pelo nervo vago, mas possui uma diversa população neuronal complementar ao sistema. O Sistema Nervoso Entérico, encontrado por toda a área gastrointestinal, faz parte do sistema nervoso periférico que controla a sua fisiologia e também é essencial na emissão de sinais no eixo citado (SINGH; DAWSON; KULKARNI, 2021). Uma outra evidência do eixo Intestino-Cérebro consiste na participação da microbiota intestinal e seus metabólitos, ao lado das fibras aferentes vagais, no processo de interocepção do organismo, em que o cérebro recebe e processa informações sobre o seu estado fisiológico interno (MAYER; NANCE; CHEN, 2022). Em adição, interações entre o intestino e o cérebro são referenciadas em estudos de doenças neurodegenerativas, de modo a

compreender e elucidar os mecanismos de intensificação dos sintomas (QUIGLEY, 2017; TAN; LIM; LANG, 2022). As doenças degenerativas são caracterizadas primeiramente pela perda de neurônios no Sistema Nervoso Central, tendo como exemplo a Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e Doença de Huntington, mas cada uma apresenta seus mecanismos moleculares únicos que permitem o desenvolvimento da doença e, portanto, estudar alguns dos marcadores moleculares que permeiam as doenças neurodegenerativas é uma boa abordagem de pesquisa (SINGH; DAWSON; KULKARNI, 2021).

Desta forma, para elucidar a interação entre o intestino com a pele e o cérebro, análise de expressão gênica de diferentes marcadores, que podem ser descritas como respostas a determinados fatores ambientais que desencadeiam processos moduladores, de ativação ou inibição em um organismo, tecido ou célula por meio do RNA é uma importante e valiosa ferramenta de pesquisa. Com exceções às células gaméticas, todas as células do organismo possuem material genético idêntico devido ao processo de mitose ocorrido a partir da célula mãe na embriogênese (MARTINS; MACIEL FILHO, 2010). A expressão gênica passa a ser fundamental no processo de diferenciação e designação de função celular (MARTINS; MACIEL FILHO, 2010; STRACHAN; READ, 2013). O estudo da expressão gênica atualmente usa a metodologia do RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, em tradução, Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa) para quantificar a expressão ou não-expressão de genes de interesse localizados em órgãos ou vias em estudos a depender da introdução do fator externo (STRACHAN; READ, 2013). No caso deste trabalho, o fator externo é o subproduto do café e os seus efeitos na expressão gênica de vias comuns ao eixo Intestino-Pele e ao eixo Intestino-Cérebro.

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito da dieta enriquecida com o subproduto industrial do café (*Coffea arabica*) em marcadores associados a doenças do intestino, pele e cérebro, tendo em vista evidenciar a interação que ocorrer nestes eixos e sua potencial atividade moduladora.

2.1. Objetivos específicos

De forma específica, o presente estudo apresenta como objetivos avaliar os efeitos de uma dieta enriquecida com o resíduo do café (*Coffea arabica*) via

- Quantificação da expressão gênica de marcadores de doenças do intestino e da pele a partir de genes pré-selecionados;
- Identificação de genes e vias em comum entre o Intestino e a Pele;
- Investigação da relação do Eixo Intestino-Pele a partir expressão gênica destes genes e vias;
- Quantificação da expressão gênica de marcadores do intestino e do cérebro a partir de genes pré-selecionados;
- Identificação de genes e vias em comum entre o Intestino e o Cérebro;
- Investigação da relação do Eixo Intestino-Cérebro a partir expressão gênica destes genes e vias;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Produto teste

O resíduo do café, constituído pela casca e polpa do fruto, foi fornecido pela empresa Verum Ingredients do Brasil, com sede na cidade de Botucatu, São Paulo. As amostras encontravam-se previamente desidratadas e foram novamente submetidas ao processo de secagem em estufa por 48 horas a 50°C. Em seguida, foram trituradas em moinho de facas e armazenadas em refrigeração a 4°C.

O produto teste foi incorporado na ração dos animais de experimentação, na proporção de 10% a partir da mistura do resíduo seco e pulverizado com ração padrão de roedores (Quintia AS). Após a mistura uniforme do conteúdo, a ração foi peletizada, desidratada em estufa por 24 horas 50°C, armazenada e mantida a 4°C até o momento de experimentação.

3.2. Delineamento experimental

Camundongos C57BL/6 (CEUA nº3338151222) sadios provenientes do Biotério Anilab Ltda., da cidade de Paulínia, São Paulo, com 8 semanas de idade foram utilizados. Os animais foram mantidos por 7 dias para aclimação no Biotério do Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec) com filtração de entrada e saída de ar, temperatura controlada de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas cada.

Os animais foram divididos randomicamente em 2 grupos conforme descrito abaixo:

- Grupo Branco (GB) – 19 animais sadios que receberam ração padrão de roedores durante 12 semanas;
- Grupo Teste (GT) – 15 animais sadios que receberam ração enriquecida com o subproduto do café (*Coffea arabica*) na proporção de 10% durante 12 semanas.

Durante esse período, o consumo de ração e o peso corporal dos animais foram avaliados a cada 7 dias e ao final do experimento, os animais foram mortos por deslocamento cervical após administração intraperitoneal de anestesia (cetamina 300mg/kg + xilazina 30mg/kg). Após a morte dos animais, pele, intestino e cérebro foram coletados e armazenados para os estudos dos mediadores.

3.3. Análises de expressão gênica

As análises da expressão gênica foram realizadas em duas etapas, utilizando-se a mesma metodologia. Na primeira etapa foram avaliados a expressão dos genes descritos na Tabela 01 em amostras de pele dos animais de ambos os grupos experimentais. Nesta tabela são indicados os genes avaliados, assim como sua descrição, seu primer e sua principal via de sinalização.

Tabela 01: Genes selecionados para o desenvolvimento do estudo de mediadores da Pele. Os dados apresentados foram extraídos dos sites National Library of Medicine para espécie de camundongos (*mus musculus*) e Integrated DNA Technologies.

Genes	Descrição	Primer	Atividade inicial
Anxa1	annexin A1	CCAGCACTCCAGCTTTCTTT (Sense) TCCGAACGGGAGACCATAAT (AntiSense)	Exossoma
Atg1	unc-51 like autophagy activating kinase 1	CAGGGTGGACACATGCTAATAC (Sense) CAGCTTGTGGACACTCAGATAC (AntiSense)	Autofagia
Atg101	autophagy related 101	GGTCTTGCTGGAGCCTTAAT (Sense) GGCATTCACTCCGGGAAATA (AntiSense)	Autofagia
Atg3	autophagy related 3	CCACCTCCTATGTGTTCAGTTC (Sense) ACATATGAACACCAAGCTCTCC (AntiSense)	Autofagia
Atg7	autophagy related 7	GCCAAGATCTCCTACTCCAATC (Sense) GGCATTCACTCCGGGAAATA (AntiSense)	Autofagia
Becn1	beclin 1	CTGTAGCCAGCCTCTGAAAC (Sense) CCTGGGCTGTGGTAAGTAATG (AntiSense)	Autofagia
Casp1	caspase 1	ACAAGATCCTGAGGGCAAAG (Sense) CCTGATTCAGCACTCTCTTCTC (AntiSense)	Inflamassoma
Cat	catalase	GATGGTAACTGGGATCTTGTTGG (Sense) GTGGGTTTCTCTTCTGGCTATG (AntiSense)	Estresse oxidativo
Cd63	antigen protein gene CD63	AGGAGGAATGAAGTGTGTCAAG (Sense) GCAGTAGTCTCATGGGTAATGG (AntiSense)	Exossoma
Cd81	antigen protein gene CD81	GGTGGCATATGTGGGATGTAG (Sense) CAAGTAGCTGTAGAGGAGGTTTG (AntiSense)	Exossoma
Cd9	antigen protein gene CD9	TGTTCTTCGGGTTCTCTTTG (Sense) CACCTCATCCTTGTTGGGTATAG (AntiSense)	Exossoma
Cdh1	cadherin 1	TTGGTGTGGGTCAGGAAATC (Sense) GTGTCCCTCCAAATCCGATAC (AntiSense)	Barreira
Chmp2a	charged multivesicular body protein 2a	GGGTGATGAGGAAGATGAAGAG (AntiSense) CCAGTGGAGGGAAGGTTTG (AntiSense)	Exossoma
COX1	cytochrome c oxidase subunit I	CAGTGCAGTCCAACCTTAT (Sense) GAGGGCAGAATGCGAGTATAG (AntiSense)	Inflamação

COX2	cytochrome c oxidase subunit I!	GAAGATTCCCTCCGGTGTTT (Sense) CCCTTCTCACTGGCTTATGTAG (AntiSense)	Inflamação
Cul1	cullin 1	CACTCAGCAGTGGGAAGATTAC (Sense) CGGCGAACCCAATGTCTATT (AntiSense)	Autofagia
Cul2	cullin 2	AGCTCCAGCTTGGCTTTAC (Sense) CTTCCCTCTCCTACCTTCCTAC (AntiSense)	Autofagia
Cul4A	cullin 4A	CCAGTGAAGCCTGGAGATT (Sense) GCCACGTAGTGGTACTGATT (AntiSense)	Autofagia
Cul4B	cullin 4B	GCCAGACTACTAAGGGAACTG (Sense) CCACACATACACAGGGAAGAG (AntiSense)	Autofagia
Cul5	cullin 5	GTACCGCAGGCTCAGATT (Sense) CATCTGTTCCTGTCTCCTTAC (AntiSense)	Autofagia
Cul7	cullin 7	AGCGCTTCCTTCCTGATATG (Sense) GTCCTCATCGGGAGATGTAATG (AntiSense)	Autofagia
Cul9	cullin 9	TACCCACCATCGTCACTACA (Sense) CACCGTCTGCTGAACGTATT (AntiSense)	Autofagia
Egf	epidermal growth factor	GGGAGTAGACAGAAGGTACAGA (Sense) CCTGAGCGAGCAGTGATTAG (AntiSense)	Crescimento
Fgf	fibroblast growth factor	GAGAGTTCAGAGTGCTAATGGG (Sense) CTCCTGAGTGCTGGGATTAAAG (AntiSense)	Crescimento
Foxo1	forkhead box protein 1	GTCTTTCTCCTTTCCTCAGAC (Sense) CCAATGGCACAGTCCTTATCT (AntiSense)	Autofagia
Gab2	growth factor receptor bound protein 2	GGTTGATAGTGGAAAGTCGGAAG (Sense) ACCACCATGGCCTGATATTG (AntiSense)	Sinalização
Gpx2	glutathione peroxidase 2	CCTACCGGCCATTTCTTTTA (Sense) GACATCTCCCAGAAGGGTTTAG (AntiSense)	Estresse oxidativo
Gpx4	glutathione peroxidase 4	CACATGGTCTGCCTGGATAAG (Sense) CGACTAGCTGAGTGAGTTTACG (AntiSense)	Estresse oxidativo
Grap	GRB2-related adaptor protein	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA (Sense) GGACTTAAAGACAGCCACAGAG (AntiSense)	Sinalização
Grap2	GRB2-related adaptor protein 2	GGCATCTTTCTGTCTCCCATAG (Sense) GATTGCCTTGGTGTCTGAGT (AntiSense)	Sinalização
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2	CTGTCTCCGTGTCTCAGTTATG (Sense) ACCACCATGGCCTGATATTG (AntiSense)	Sinalização
Hsc70	heat shock cognate protein	TCCTCATCAAGCGCAATACC (Sense) GGCCCTTTCACCTTCATACA (AntiSense)	Autofagia
Hsf1	heat shock factor 1	CTCTACTGTGACCACCTGTATG (Sense) CAAGGAGATGTAGTGAGGTCTG (AntiSense)	Autofagia
Hsp90aa1	heat shock protein 90	GACGAGATGGTTTCTCTGAAGG (Sense) TTCCACAAAGGCGGAGTTAG (AntiSense)	Autofagia
Il10	interleukin 10	CTATGCTGCCTGCTCTTACTG (Sense) GGGAAGTGGGTGCAGTTATT (AntiSense)	Imune
Il1β	interleukin 1β	GGTGTGTGACGTTCCCATTA (Sense) ATTGAGGTGGAGAGCTTTCAG (AntiSense)	Imune

Il23α	interleukin 23 α	CCAGCGGGACATATGAATCTAC (Sense) TGTGGGTCAACAACCATCTTC (AntiSense)	Imune
Il23β	interleukin 23 β	GGACTGCATGATAGCGTGAT (Sense) GTCTCTGCTCCTGTGTCTTATG (AntiSense)	Imune
Il6	interleukin 6	GTCTGTAGCTCATTCTGCTCTG (Sense) GAAGGCAACTGGATGGAAGT (AntiSense)	Imune
Infγ	interferon gamma	ATCGGCTGACCTAGAGAAGA (Sense) AGCCAAGATGCAGTGTGTAG (AntiSense)	Imune
IPAF	NLR family, CARD domain containing 4	CATCTCTCCACACAGGACAATC (Sense) ATGAACAGGGTATCGCAAGG (AntiSense)	Inflamassoma
Lox12	lipoxygenase 12	CAGCCGCATAGAGAACAGTATC (Sense) GAGTCTCAGCAGCAGACATAAG (AntiSense)	Inflamação
Lox5	lipoxygenase 5	CATCGAGCAGATCGTGATAC (Sense) CTCTGGGTACATGCCTAGAAAC (AntiSense)	Inflamação
Map1lc3β	microtubule-associated protein 1 light chain 3 β	GATCTGAGAATGGCCCTATGTG (Sense) CCTCGATCGAACTCAGAAATCC (AntiSense)	Autofagia
Mapk1	mitogen-activated protein kinase 1	CTTGATCTCCATCACAGGAAG (Sense) CCTGTTCCATGGCACCTTAT (AntiSense)	Sinalização
Mapk3	mitogen-activated protein kinase 3	GGCTTCTCCCACTCCAATC (Sense) GGGCTAGCAAGGGTAGATAAAG (AntiSense)	Sinalização
Mapk6	mitogen-activated protein kinase 6	GGCTTCGACTTTGACTCCTT (Sense) GCTGGGACACTGAGCTATTC (AntiSense)	Sinalização
Mapk9	mitogen-activated protein kinase 9	GTAGGAACGCTGCTGTAGT (Sense) CAGGTTCTCCTGGTTACATCTC (AntiSense)	Sinalização
Mmp2	matrix metalloproteinase 2	GTCAACGGTCGGGAATACA (Sense) GCCATACTTGCCATCCTTCT (AntiSense)	Imune
Mmp9	matrix metalloproteinase 9	TCTGTGCGTTATGGTTCAGG (Sense) GCCAGGAAGACACTTGTTTAT (AntiSense)	Imune
Msn	moesin	GGGCCTTGCTCTGTGTTTAG (Sense) GGGCCTTTCTAGGTGTTAGTG (AntiSense)	Exossoma
Mpo	myeloperoxidase	GAGGAGAGTCTAGTCTTGGGATAG (Sense) GTCAACTCCTCTCACTGACAAC (AntiSense)	Estresse oxidativo
Mtor	mechanistic target of rapamycin kinase	GGAGGCTGATGGACACAAATAC (Sense) GCTGGTTCTCCAAGTTCTACAC (AntiSense)	Autofagia
Muc1	mucin 1	TACCCTACCTACCACACTCAC (Sense) GAGAGACTGCTACTGCCATTAC (AntiSense)	Barreira
Muc2	mucin 2	CTACCACCATTACCACACTAC (Sense) GTCTCTCGATCACCACATTT (AntiSense)	Barreira
Muc3	mucin 3	GGTGGAGAGCGTAGAGATAGA (Sense) CTTCAGACTTTTCGGTCTGTAG (AntiSense)	Barreira
Muc4	mucin 4	GGGCTGATGCTGATTCTCT (Sense) AGTCTCCACTTCCCGGATTA (AntiSense)	Barreira
Nlrp3	NLR family, pyrin domain containing 3	CTTCATGGCTCAGGACATAC (Sense) CAACGGGACACTCGTCATCTT (AntiSense)	Inflamassoma

Nos2	nitric oxide synthase 2	GGAATCTTGAGCGAGTTGT (Sense) CCTCTGTCTTTGACCCAGTAG (AntiSense)	Estresse oxidativo
Nos3	nitric oxide synthase 3	TGTGGGAGAAGATGCCAAAG (Sense) GAGTCAGCCCTGGTAGTAATTG (AntiSense)	Estresse oxidativo
Nox1	NADPH oxidase 1	CACTCCCTTTGCTTCCATCT (Sense) CAAAGGCACCTGTCTCTCTAC (AntiSense)	Estresse oxidativo
Nox3	NADPH oxidase 3	AATCCAGTCCGCACCTTTG (Sense) GAAGACCAGAGCCAGAGAGATA (AntiSense)	Estresse oxidativo
Nox4	NADPH oxidase 4	CCAGAATGAGGATCCCAGAAAG (Sense) GGTAGAAGCTGTAACCATGAGG (AntiSense)	Estresse oxidativo
Nrf2	nuclear fator erythroid 2-related factor 2	GGCTCAGCACCTTGATCTT (Sense) CACATTGCCATCTCTGGTTTG (AntiSense)	Estresse oxidativo
Ocln	occludin	CAGCAGCAATGGTAACCTAGAG (Sense) CACCTGTCGTGTAGTCTGTTTC (AntiSense)	Barreira
Panx1	pannexin 1	GGCCAACAGCGTCATAGAA (Sense) CTGAGGCTCTGTGCTCTTAAC (AntiSense)	Inflamassoma
Panx2	pannexin 2	GCAGACGAGGGAAAGAATACA (Sense) CGCGTGGCTGAGGTAATAG (AntiSense)	Inflamassoma
Panx3	pannexin 3	CAGGCTGCATACGTGGATAG (Sense) CTTGTGAGGCCAGAGAGATTT (AntiSense)	Inflamassoma
Ppara	peroxisome proliferator activated receptor α	GAGTAGGTCCTGTTCTCCTTCT (Sense) TCAGGCTGGTGGTATCTACTT (AntiSense)	Sinalização
Pparγ	peroxisome proliferator activated receptor gam	CTGGCCTCCCTGATGAATAAAG (Sense) AGGCTCCATAAAGTCACCAAAG (AntiSense)	Sinalização
Rab11b	ras-related protein Rab-11B gene	CTACCACTCAGCTTCTGTCTTC (Sense) CTTCAGCAGGTACTACGCTAAC (AntiSense)	Regulação
Rab13	RAB13, member RAS oncogene family	GAGATCGGAACCAACAGTAAG (Sense) GGGTGAATAGGAGGCAAGAAA (AntiSense)	Autofagia
Rab7	GTPase RAS related protein brain 7	CTTCTGACCAAGGAGGTGATG (Sense) TAGAAGGCCACACCAAGAGA (AntiSense)	Autofagia
Rb1cc1	focal adhesion kinase family interacting protein	CAGCAAGAGCGGGATAAAGA (Sense) ACTGCTAGTGCGGAGTTTAC (AntiSense)	Autofagia
Sod	superoxide dismutase	GGTTCCACGTCCATCAGTATG (Sense) GTCTCCAACATGCCTCTCTTC (AntiSense)	Estresse oxidativo
Stat1	signal transducer and activator of transcription 1	CTGGCCCTGATGGTCTTATTC (Sense) GAGCTCTAGGATGGTGCAATC (AntiSense)	Imune
Stat3	signal transducer and activator of transcription 3	GTCTGTAGAGCCATACACCAAG (Sense) GGTAGAGGTAGACAAGTGGAGA (AntiSense)	Imune
Tgfβ	transforming growth factor α	CTTTAGGAAGGACCTGGGTTG (Sense) GTGTGTCCAGGCTCCAAATA (AntiSense)	Sinalização
Tlr1	toll-like receptor 1	ATGCTTACAGGCTCTGTCTTC (Sense) GCAGGTGGGTGACATCTTTA (AntiSense)	Inflamassoma
Tlr11	toll-like receptor 11	CACCTCTGGACACTCTTTCATAC (Sense) GCTTGATCCTCCTCACAATAGG (AntiSense)	Inflamassoma

Tlr2	toll-like receptor 2	CACTATCCGGAGGTTGCATATC (Sense) GGAAGACCTTGCTGTCTCTAC (AntiSense)	Inflamassoma
Tlr3	toll-like receptor 3	CTGAGAAGAGCCACAGTGATAG (Sense) TCCAGCAGAAGAGACACAAC (AntiSense)	Inflamassoma
Tlr4	toll-like receptor 4	GAGCAAACAGCAGAGGAAGA (Sense) CCAGGTGAGCTGTAGCATTTA (AntiSense)	Inflamassoma
Tlr5	toll-like receptor 5	GTCCAGAAAGCTGCCTCTAAG (Sense) GGTAGCAGACAGTACGCAATAG (AntiSense)	Inflamassoma
Tlr6	toll-like receptor 6	CCTGGAAGTGCTCGGTAAA (Sense) CCCTGTGCTGATTCTCTCAGTTATC (AntiSense)	Inflamassoma
Tlr7	toll-like receptor 7	GTACCAAGAGGCTGCAGATTAG (Sense) CCTGTGGTATCTCCAGAAGTTG (AntiSense)	Inflamassoma
Tlr8	toll-like receptor 8	CACAAGACTGGGCTCTTATC (Sense) GTGCAGAAAGGATGGAGTACAG (AntiSense)	Imune
Tlr9	toll-like receptor 9	TGGACGGGAAGTCTACTA (Sense) CAGAGACAGATGGGTGAGATTG (AntiSense)	Inflamassoma
Tnfa	tumor necrosis factor	CTGAGTTCTGCAAAGGGAGAG (Sense) CCTCAGGGAAGAATCTGGAAAG (AntiSense)	Inflamassoma
Tsg101	tumor susceptibility gene 101	AACATCCACGGTCAGAGTTG (Sense) GGGTAGGATGCAGAAACAGTAG (AntiSense)	Exossoma
Vps34	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic 3	AACGTGCAGCTGAAGATAGG (Sense) CGGAGCATGTCTCTTGGTATAG (AntiSense)	Autofagia
ZO1	tight junction protein 1	CTGAGCCGGTGTCTGATAATG (Sense) CGCTCCTTCTGTTCGCTAAA (AntiSense)	Barreira

Na segunda etapa, as análises foram realizadas para os marcadores apresentados na Tabela 02, com avaliação destes marcadores na pele, intestino e cérebro dos animais.

Tabela 02: Genes selecionados para o desenvolvimento do estudo de mediadores da Pele, Cólon e Cérebro. Os dados apresentados foram extraídos dos sites National Library of Medicine para espécie de camundongos (*mus musculus*) e Integrated DNA Technologies.

Genes	Descrição	Primer	Atividade
Acss2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	CCAGTTGGTTCAGTCTCCATAG (Sense) GGCAGGGTTCTGTTCATAGT (AntiSense)	Hidratação
App	amyloid β precursor protein	TCTCTGTCCCTGCTCTACAA (Sense) CAAGACATCGTCGGAGTAGTTC (AntiSense)	Regulação sináptica
Aqp3	aquaporin 3	TAGGTTCCACCCACCTTTA (Sense) TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC (AntiSense)	Hidratação
Bace1	β -site APP cleaving enzyme 1	GACATCTCCCTGCTCAAGTAAG (Sense)	Formação de bainhas de mielina

Birc5	baculoviral IAP repeat-containing 5	GTACCATCCATAGCTCCAACCTC (AntiSense) AACCCGATAGAGGAGCATAGA (sense) GAAACTGGACAGACAGAGAGC (antiSense)	Envelhecimento
Casp1	caspase 1	ACAAGATCCTGAGGGCAAAG (Sense) CCTGATTCAGCACTCTCTTCTC (AntiSense)	Inflamassoma
Casp11	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	GATGGCAGATGTGTGGAAGA (Sense) TGTCAAAGCAGGACCAGAAAG (AntiSense)	Inflamassoma
Cdk10	cyclin dependent kinase 10	GGTGGCATATGTGGGATGTAG (Sense) CAAGTAGCTGTAGAGGAGTTTG (AntiSense)	Ciclo celular
Cdk11	cyclin dependent kinase 11B	TGTTCTTCGGGTTCCTCTTG (Sense) CACCTCATCCTTGTTGGGTATAG (AntiSense)	Ciclo celular
Cdk5	cyclin dependent kinase 5	TTGGTGTGGGTCAGGAAATC (Sense) GTGTCCCTCCAAATCCGATAC (AntiSense)	Ciclo celular
Cldn1	claudin 1	TTCTGGGAGGTGTCCTACTT (Sense) AGGTGTTGGCTTGGGATAAG (AntiSense)	Barreira
Cldn4	claudin 4	CTGACTCCAGAGAGAGAGAGAG (Sense) CAGGACCTGTAGTCCCATAGA (AntiSense)	Barreira
Cldn7	claudin 7	GAGTTTGACCTGCCATCTT (Sense) GTACGCAGCTTTGCTTTCAC (AntiSense)	Barreira
Col1a1	collagen, type I, α 1	AGACCTGTGTGTTCCCTACT (Sense) GAATCCATCGGTCATGCTCTC (AntiSense)	Envelhecimento
Col3a1	collagen, type III, α 1	CCTGGTGGAAAGGGTGAAAT (Sense) CGTGTTCGGGTATACCATAG (AntiSense)	Envelhecimento
Col4a1	collagen, type IV, α 1	CCTCCAGGAACGACTACTCTTA (Sense) TAATGAAGGGCCGGATGTTG (AntiSense)	Envelhecimento
Col5a1	collagen, type V, α 1	CTCTGTGTGTGTGCCAAGAT (Sense) CAGAGTCCATCCCACATTCTC (AntiSense)	Envelhecimento
Col7a1	collagen, type VII, α 1	CATCCCGAGCACTGAACTAC (Sense) GCCGCCAGGACAAGATATAA (AntiSense)	Envelhecimento
Creb1	cAMP responsive element binding protein 1	GCTCCCACTGTAACCTTAGTG (Sense) GGACTTGTGGAGACTGGATAAC (AntiSense)	Regulação de expressão gênica
Cxcl1	C-X-C motif chemokine ligand 1	GTGTCAACCACTGTGCTAGT (Sense) CACACATGTCCTCACCCTAATAC (AntiSense)	Inflamação e Cicatrização
Dcn	decorin	CCTGTCTCTCCAGAAGTTTGAC (Sense) GTAAAGACTCACAGCCGAGTAG (AntiSense)	Envelhecimento
Dct	dopachrome tautomerase	GAGAGTTCAGAGTGCTAATGGG (Sense) CCAGTGTTCCGTCTGCTTTA (AntiSense)	Pigmentação
Dnai1	dynein axonemal intermediate chain 1	GATGTGGGAGAAGGAAGTATG (Sense) CCGAGTGAACCTCCTCTTTAAC (AntiSense)	Pigmentação
Dsc1	desmocollin 1	GACTGCCATAGACAAGGATGAG (Sense) TGGATGGAGAAGTGCTTTGG (AntiSense)	Envelhecimento
Dsp	desmoplakin	CCGGTTGACATGGCGTATAA (Sense) CCTTCAGTTGCAGATAGGTGAG (AntiSense)	Envelhecimento

Edn1	endothelin 1	GACCATCTGTGTGGCTTCTAC (Sense) GGAACACCTCAGCCTTTCTT (AntiSense)	Pigmentação
Eln	elastin	CTCATCCATCCATCCATCCATC (Sense) GACAGGTGAACCAGGTTGATAG (AntiSense)	Envelhecimento
Fn1	fibronectin 1	CACCTTCAGTAGAAGGCAGTAG (Sense) GTTCTCCTCCACAGCATAGATAG (AntiSense)	Envelhecimento
Hyal1	hyaluronoglucosaminidase 1	GTATGGAGTGATGTGGATGTC (Sense) GTGCCCAATTCTCTCTGTAG (AntiSense)	Envelhecimento
Il10	interleukin 10	CTATGCTGCCTGCTCTTACTG (Sense) CTCTGTGGTTCCATGCTTTCT (Sense)	Inflamação
Il18	interleukin 18	CTCTACTGTGACCACCTGTATG (Sense) GTTTGAGGCGGCTTTCTTTG (AntiSense)	Inflamação
Il1α	interleukin 1α	GCTTGAGTCGGCAAAGAAATC (Sense) GAGAGATGGTCAATGGCAGAA (AntiSense)	Inflamação
Il1β	interleukin 1β	GGTGTGTGACGTTCCCATTA (Sense) ATTGAGGTGGAGAGCTTTTCTAG (AntiSense)	Inflamação
Il6	interleukin 6	GTCTGTAGCTCATTCTGCTCTG (Sense) GAAGGCAACTGGATGGAAGT (AntiSense)	Inflamação
Inty	interferon gamma	ATCGGCTGACCTAGAGAAGA (Sense) AGCCAAGATGCAGTGTGTAG (AntiSense)	Imune
Ivl	involucrin	CTCTCCAACCATCCACATAAG (Sense) ATGGTCAGGGCCAGATAGA (AntiSense)	Diferenciação celular
Jun	jun proto-oncogene	CCAGACTGTACACCAGAAGATG (Sense) CAACCAAAGTGCTGCTTTCC (AntiSense)	Envelhecimento
Kit	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase	CAGCACATAGCCCAGGTAAA (Sense) CAACTCTTGCCGAGCTGATA (AntiSense)	Pigmentação
Lor	loricrin cornified envelope precursor protein	GCCGATGGGCTTAACCTTCT (Sense) GAGCGACTCAATGGCTTCTT (AntiSense)	Barreira
Mapt	microtubule-associated protein tau	GCTCAGATGCCTGCTTGATA (Sense) TTACCTTCTTCTGCCCCAATAC (AntiSense)	Estabilização celular
Mc1r	melanocortin 1 receptor	CTGCACTCGCCCATGTATTA (Sense) CAGCAGCAGGATGATAGTAGTC (AntiSense)	Pigmentação
Mif	macrophage migration inhibitory factor	GTTCCACCTTCGCTTGAGT (Sense) CATCGCTACCGGTGGATAAA (AntiSense)	Pigmentação
Mitf	melanogenesis associated transcription factor	GGAGGAAGAGGAGGAAGAAAGA (Sense) CATAGAAACGCTGGAAGGAAGG (AntiSense)	Pigmentação
Mlana	melan-A	TCTTCACCGCCACCTTATTC (Sense) GGCGTCTACTCAGCCTTAAA (AntiSense)	Pigmentação
Mlph	melanophilin	TTAACCCGATCCTCGACTTTG (Sense) TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT (AntiSense)	Pigmentação
Mmp1	matrix metallopeptidase 13	GTGACAGGCTCCGAGAAAT (Sense) CATCAGGCACTCCACATCTT (AntiSense)	Envelhecimento
Mmp12	matrix metallopeptidase 12	GCATACCTTACCACCACCATAG (Sense) GGACTGTGCAGAGCATGAATA (AntiSense)	Envelhecimento

Mmp2	matrix metallopeptidase 2	GTTC AACGGTCGGGAATACA (Sense) GCCATACTTGCCATCCTTCT (AntiSense)	Envelhecimento
Mmp3	matrix metallopeptidase 3	GGACCAGGGATTAATGGAGATG (Sense) TGAGCAGCAACCAGGAATAG (AntiSense)	Envelhecimento
Mmp9	matrix metallopeptidase 9	TCTGTGCGTTATGGTTCAGG (Sense) GCCAGGAAGACACTTG GTTAT (AntiSense)	Envelhecimento
Mt1A	metallothionein 1	TGGGCTGCTCCAAATGT (Sense) GTATAGGAAGACGCTGGGTTG (AntiSense)	Envelhecimento
Muc1	mucin 1	TACCCTACCTACCACACTCAC (Sense) GAGAGACTGCTACTGCCATTAC (AntiSense)	Barreira
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88	AGCAACTAGGACTGCCTTTC (Sense) GAACTCTTCCACTCAGCTATCC (AntiSense)	Inflamação
Myo5a	myosin VA	TGCACTCTGCTGGGAATTAG (Sense) TTCGTGCTTGGGAGGTATTG (AntiSense)	Pigmentação
Nfkb1	nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B cells 1	GGATGACAGAGGCGTGATTAG (Sense) CCTTCTCTCTGTCTGTGAGTTG (AntiSense)	Imune
Nlrp3	NLR family, pyrin domain containing 3	CTTCCATGGCTCAGGACATAC (Sense) CAACGGACACTCGTCATCTT (AntiSense)	Inflamassoma
Nlrp6	NLR family, pyrin domain containing 6	TCTGTGGAGCTGAGTGAGAA (Sense) CGGTGAGGTGTGCCTTATTT (AntiSense)	Inflamassoma
Nrf2	nuclear factor, erythroid derived 2, like 2	GGCTCAGCACCTTGTATCTT (Sense) CACATTGCCATCTCTGGTTTG (AntiSense)	Estresse oxidativo
Ocln	occludin	CAGCAGCAATGGTAACCTAGAG (Sense) CACCTGTCGTGTAGTCTGTTTC (AntiSense)	Hidratação
Pax3	paired box 3	AACCCACTACCCAGACATTTAC (Sense) CCAGCTTGTTTCCTCCATCT (AntiSense)	Pigmentação
Pmel	premelanosome protein	CTCTCCTACACATGGGACTTTG (Sense) GAGGAACCACAGGAAACAAGA (AntiSense)	Pigmentação
Pomc	pro-opiomelanocortin- α	CTTCATGACCTCCGAGAAGAG (Sense) GGGCCCTTGAATGAGAAGA (AntiSense)	Pigmentação
Prkcz	protein kinase C, zeta	ACAGTGCAACTGCGAGAA (Sense) GGACTGGTCGATCCTCTTTATG (AntiSense)	Sinalização celular
Prss8	serine protease 8 (prostasin)	CTAGCCACCTTTCTCTGTTACC (Sense) GTGCTAGATACAGGCTGAAGTG (AntiSense)	Hidratação
Psen1	presenilin 1	GACTTGAGAGACAAGGACAAGG (Sense) GAGTTCACAGTGCGGGTAAA (AntiSense)	Regulação de processos
Psen2	presenilin 2	GGGTCTAGGGTCTGACTTTCTA (Sense) CCATGTATTGGGCTGGTCTATC (AntiSense)	Regulação de processos
Pycard	PYD and CARD domain containing	ACAGTGCAACTGCGAGAA (Sense) CAAGCCATACGACTCCAGATAG (AntiSense)	Inflamassoma
Rxra	retinoid X receptor α	GCAGCTTCTGGGCCATATT (Sense) CCTGTGGTCATCTTCGTTTCTC (AntiSense)	Envelhecimento
Serpinh1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor	CATCTTCTGGTGCGAGATAA (Sense) CCACTCTTGGACTCTACAATC (AntiSense)	Envelhecimento

Sirt1	sirtuin 1	GTAAGCGGCTTGAGGGTAAT (Sense) GTTACTGCCACAGGAACTAGAG (AntiSense)	Envelhecimento
Sirt3	sirtuin 3	CTGCTTCTGCGGCTCTATAC (Sense) GACCGTGCATGTAGCTGTTA (AntiSense)	Envelhecimento
Sirt6	sirtuin 6	CTACGTGGATGAGGTGATGTG (Sense) CTCAGCCTTGAGTGCTACTG (AntiSense)	Envelhecimento
Sox10	SRY (sex determining region Y-box 10	AGCCCTCAGGACCCTATTAT (Sense) GTCAGAGATGGCAGTGTAGAG (AntiSense)	Pigmentação
Sptlc1	serine palmitoyltransferase, long chain base 1	CAGGAGCGTTCTGATCTTACAG (Sense) CCGGACACGATGTTGTAGTT (AntiSense)	Hidratação
Syp	synaptophysin	AGTTTGAGCAGTGGGTGTAG (Sense) TTGGCTCTTCCCAGGTTATG (AntiSense)	Transmissão sináptica
Tgfβ	transforming growth factor β	CTTTAGGAAGGACCTGGGTTG (Sense) GTGTGTCCAGGCTCCAAATA (AntiSense)	Sinalização
Tgm1	transglutaminase 1	GGGTGACTCTTCTAACCCTTTG (Sense) CTTCTAGAGCCCAGAGCATTTT (AntiSense)	Barreira
Tgm5	transglutaminase 5	GCAGAAGCTACAGGCTACAA (Sense) GGGTTGAAGGGAAGGTGAAT (AntiSense)	Barreira
Timp1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	CTGCAACTCGGACCTGTAAA (Sense) CTGGGACTTGTGGGCATATC (AntiSense)	Inibidor de MMPs
Tlr1	toll-like receptor 1	ATGCTTACAGGCTCTGTCTTC (Sense) GCAGGTGGGTGACATCTTTA (AntiSense)	Inflamação e Cicatrização
Tlr2	toll-like receptor 2	CACTATCCGGAGGTTGCATATC (Sense) GGAAGACCTTGCTGTTCTCTAC (AntiSense)	Inflammasoma
Tlr4	toll-like receptor 4	GAGCAAACAGCAGAGGAAGA (Sense) CCAGGTGAGCTGTAGCATTTA (AntiSense)	Inflamassoma
Tlr5	toll-like receptor 5	GTCCAGAAAGCTGCCTCTAAG (Sense) GGTAGCAGACAGTACGCAATAG (AntiSense)	Inflammasoma
Tlr9	toll-like receptor 9	TGGACGGGAACCTGCTACTA (Sense) CAGAGACAGATGGGTGAGATTG (AntiSense)	Inflammasoma
Tnfa	tumor necrosis factor	CTGAGTTCTGCAAAGGGAGAG (Sense) CCTCAGGGAAGAATCTGGAAAG (AntiSense)	Inflamassoma
Tyr	tyrosinase	GGGATTGGAGAGATGCAGAAA (Sense) TCTGCCAGGAGGAGAAGAA (AntiSense)	Pigmentação
Tyrp1	tyrosinase-related protein 1	GAGAGTGGTCTGTGAATCCTTG (Sense) CTGCTGGTCTCCCTACATTTT (AntiSense)	Pigmentação
Ubb	ubiquitin B	CCGCACTCTCTGATTACAAC (Sense) CTGGGAATGCAGACCGAATAA (AntiSense)	Pigmentação
Ugcg	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	TGGTTCTAGGAAGTGGGATTTG (Sense) CTGCAGAGCAGTCCTGTATATG (AntiSense)	Hidratação
α-syn	synuclein α	TGACAACAGTGGCTGAGAAG (Sense) CCAGTGGCAGCAGCTATATT (AntiSense)	Composição celular

Os genes endógenos selecionados para a Análise I foram ACTB, GAPDH e HPRT1. Para a Análise II, 6 genes endógenos foram processados, sendo eles ACTB, B2M, HSP9ab1, GUSB, GAPDH e HPRT1, mas sujeitos a testes de estabilidade de expressão para posterior seleção de análise, tendo sido definidos como: B2M, GUSB e HPRT1 para o intestino; B2M, GAPDH e HPRT1 para pele e B2M, GUSB e HPRT1 para cérebro.

A coleta dos órgãos da pele, intestino e cérebro, independentemente do seu momento de análise, precedeu os estudos de expressão gênica com as etapas listadas a seguir.

3.3.1. Extração de RNA e quantificação

Para a análise de PCR em tempo real (qPCR), o RNA total foi extraído com o kit *TRIzolTM Reagente (Thermo Fisher Scientific)*, sendo as amostras processadas conforme instruções do fabricante. Em seguida, foi realizada a quantificação no NanoDrop.

3.3.2. Transcrição reversa e PCR quantitativo

Em seguida, foi feita a transcrição reversa para síntese de cDNA, utilizando o *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems)*. O ensaio de qPCR foi realizado utilizando o *Biomark HD System (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA)* usando o protocolo *TaqMan GE 96x96 Standard*.

3.3.3. Normalização dos dados e cálculo dos valores de Foldchange

Os valores de C_q (*cycle quantification*, antigo *C_t – cycle threshold*) foram calculados pelo software do equipamento e transformados de acordo com o método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Nesta fase, genes endógenos são utilizados como referências para a quantificação dos valores de Foldchange.

3.4. Análise estatística

Os dados paramétricos foram analisados por teste t Student, comparando os grupos que receberam os tratamentos versus o grupo sem tratamento. Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) e a significância estatística foi considerada para valores de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Dados clínicos

O Gráfico 01 apresenta os resultados de consumo médio de ração do Grupo Branco e do Grupo Teste mostrando que não houve diferença significativa entre os grupos.

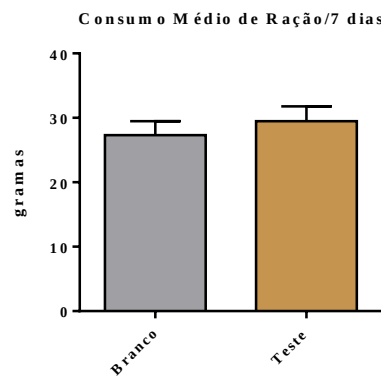


Gráfico 01: Representação do consumo médio de ração a cada 7 dias pelos grupos Branco e Teste durante os meses de experimentação. $*p < 0,05$.

O Gráfico 02 apresenta os resultados de evolução do peso corpóreo entre os grupos experimentais durante toda a etapa de tratamento, mostrando que não houve diferenças significativas entre os grupos.

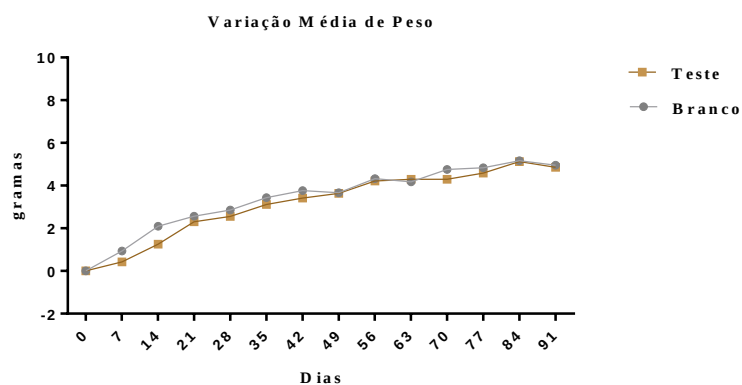


Gráfico 02: Variação média de peso de cada um dos grupos ao longo do experimento.

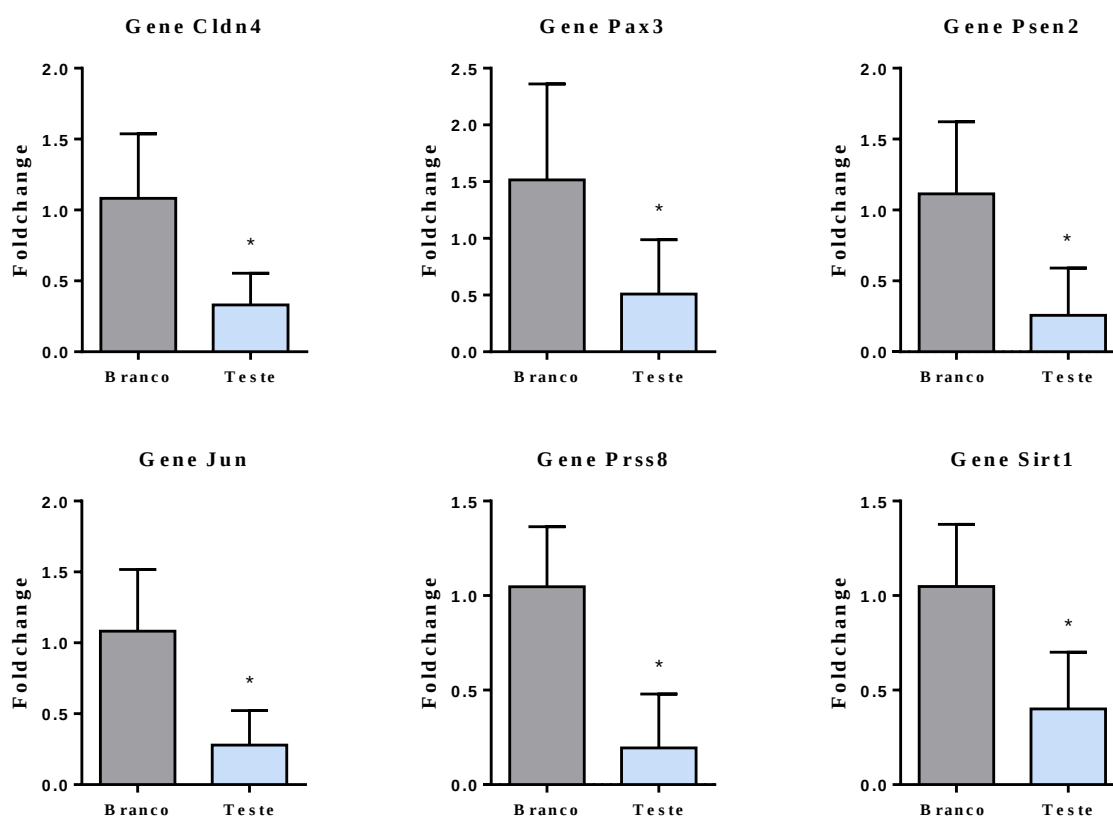
A Tabela 03 apresenta os resultados de ganho de peso e diferença de peso em relação ao dia inicial dos experimentos, indicando que não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 03: Valores dos pesos inicial e final e Δ peso dos animais no experimento expostos às duas diferentes dietas. são expressos em média e erro padrão da média

	Grupo Branco	Grupo Teste
Peso Inicial (g)	27,71 $\pm$ 0,7593	26,61 $\pm$ 0,9264
Peso Final (g)	32,66 $\pm$ 0,6760	31,46 $\pm$ 0,5846
Δ Peso	4,951 $\pm$ 0,6338	4,851 $\pm$ 0,4980

4.2. Influência da intervenção dietária com o subproduto de *Coffea arabica* na expressão gênica de marcadores do Intestino

No intestino dos animais submetidos à intervenção dietética com o subproduto de *Coffea arabica* foram avaliados a expressão de 92 diferentes genes, sendo que o produto reduziu significativamente a expressão dos genes *Cldn4*, *Pax3*, *Psen2*, *Jun*, *Prss8*, *Sirt1*, *Tgm1* e *Tyr* (Figura 04).



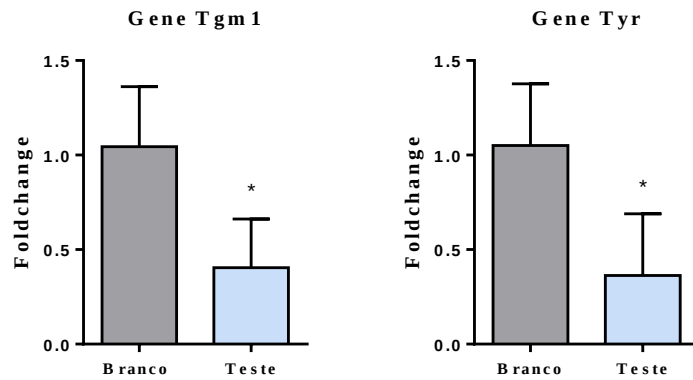


Figura 04: Efeitos sobre os genes expressos no intestino após tratamento com o subproduto do café.

* $p < 0,05$.

4.3 Sobre a expressão gênica de marcadores analisados na Pele

O efeito da intervenção dietária com o subproduto de *Coffea arabica* foi avaliado em 184 genes, sendo que foi capaz de aumentar significativamente a expressão dos genes Hsp90aa1 e Panx3 (Figura 05) e reduzir de forma significativa a expressão dos genes Cdk11 e Muc1 (Figura 06).

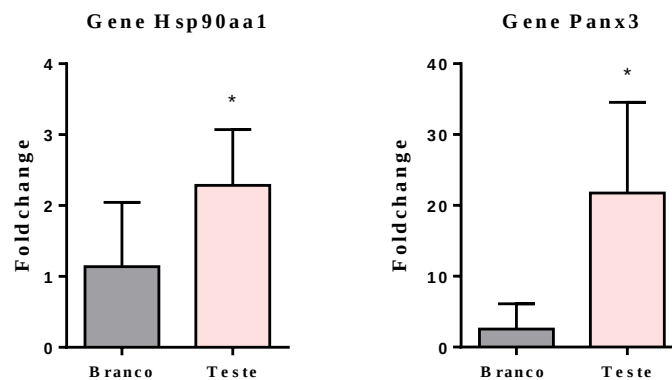


Figura 05: Genes com diferença estatística significativa após o consumo do subproduto do café expressos na pele em relação aos genes da Tabela 01. * $p < 0,05$.

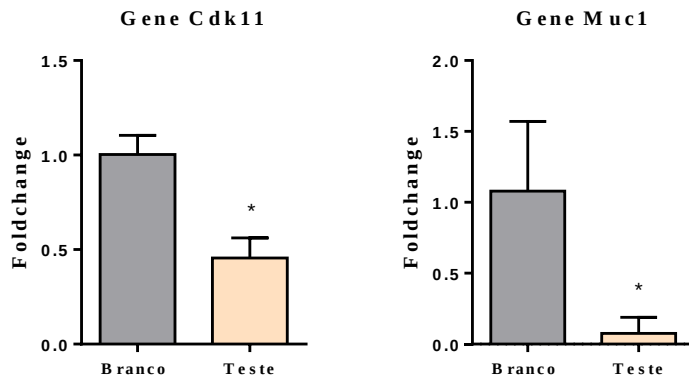


Figura 06: Genes com diferença estatística significativa após o consumo do subproduto do café expressos na pele em relação aos genes da Tabela 02. * $p < 0,05$.

4.4. Sobre a expressão gênica de marcadores analisados no Cérebro

Os efeitos do tratamento com *Coffea arabica* foi avaliado sobre 92 genes, sendo que o produto foi capaz de aumentar significativamente a expressão dos genes *Acss2*, *IL-6*, *Tgm1* e *Tgm5* (Figura 07).

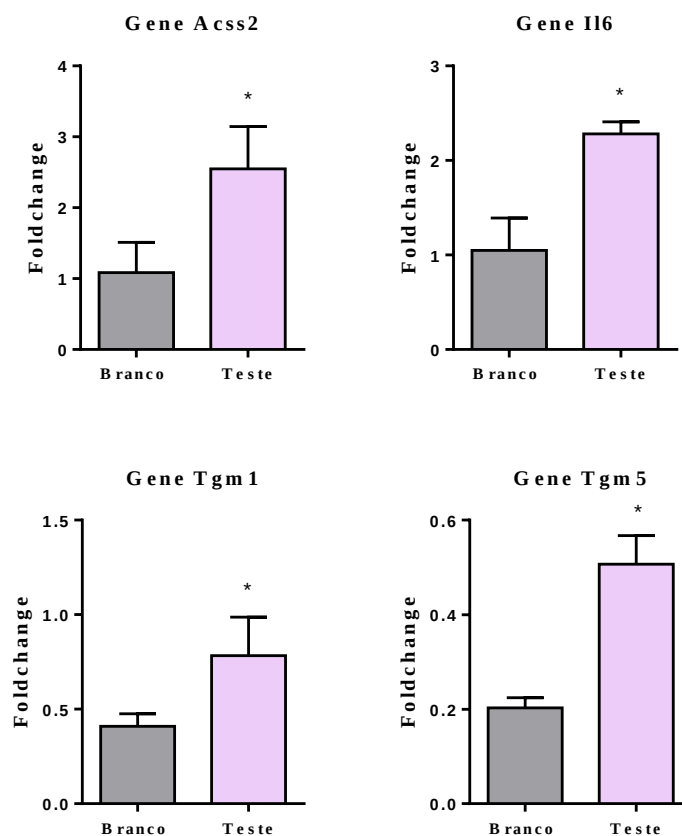


Figura 07: Genes com diferença estatística significativa após o consumo do subproduto do café expressos no cérebro. * $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

A bebida do café, extraída a partir da moagem da sua semente tostada, é um produto altamente consumido a nível mundial. Devido a sua popularidade, muitos estudos avaliam os seus efeitos no organismo, bem como a sua composição química. Dessa forma, é de grande importância associar que o subproduto do café, por ser derivado de diferentes partes do fruto, podem conter diferentes compostos químicos ou em diferentes quantidades, em relação a semente tostada (MENDONÇA; PEREIRA; MENDES, 2005). De acordo com ESQUIVEL & JIMENEZ (2012) e KRÁL *et al.* (2023), o subproduto do café, composto primordialmente pela polpa e casca do fruto, possui uma menor quantidade de cafeína em relação a bebida. Porém outros compostos fenólicos como ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico também se apresentam em quantidades importantes, implicando em propriedades antioxidantes e antiinflamatórias (BOBKOVÁ *et al.*, 2022). O subproduto do café também contém fibras solúveis e insolúveis como celulose, lignina e pectina, e outros açúcares que podem servir como substrato para fermentação da microbiota intestinal, sendo assim um produto de grande interesse de ser estudado na fisiologia intestinal, bem como os seus efeitos adjacentes em sistemas atrelados ao intestino provindos da sua metabolização (MACHADO *et al.*, 2024). Apesar disso, para futuros estudos, considera-se a necessidade de padronização e aprofundamento fitoquímico do subproduto do café.

O produto preparado a partir de *Coffea arabica* reduziu significativamente a expressão de diferentes genes associados a doenças e ao funcionamento do intestino como descrito, sendo importante avaliar o papel destes marcadores. Um dos genes afetados pelo produto foi o gene *Cldn4* referente à expressão de claudina 4. As claudinas são proteínas pertencentes a uma família que exercem importante função nas junções oclusivas celulares. A claudina 4 é a principal proteína constituinte destas junções em células epiteliais intestinais e está diretamente envolvida na diferenciação, manutenção e transporte de substâncias (FUJIWARA-TANI *et al.*, 2023). Estudos evidenciam que as claudinas têm sido consideradas importantes marcadores moleculares em diferentes tipos de câncer, como gástrico, esofágico e colorretal, bem como diagnóstico de lesões pré-cancerígenas, potencial marcador para vias de tratamento de câncer e indicador de prognóstico (LIU; LI, 2020). Dentro desse contexto, é possível validar a claudina 4 como regulador essencial na manutenção das junções oclusivas de modo a impedir seu comprometimento e a possibilidade de invasão de células cancerígenas que iniciam a

metástase pelo sistema gastrointestinal. Ao analisar a expressão da claudina 4 neste trabalho, a partir do consumo do subproduto do café, foi possível inferir que a esta proteína pode funcionar como alvo molecular em estudos sobre o epitélio intestinal e a sua integridade, que pode ter sido afetada pela diminuição da sua expressão. Em contraposição, uma controlada diminuição dessas junções permite desenvolver perspectivas de tratamento de câncer ou lesões na medida em que a permeabilidade de substâncias entre os tecidos aumenta e pode facilitar a difusão de medicamentos em microambientes tumorais. Neste caso, aplicação do resultado pode variar de acordo com o interesse e objetivo a ser atendido. Por outro lado, em doenças que afetam o trato gastrointestinal como a doença Inflamatória Intestinal, a integridade da barreira depende destas proteínas, de modo que a redução de sua expressão poderia comprometer o bom funcionamento das células epiteliais intestinais, com aumento de permeabilidade e agravamento da doença (DUNLEAVY; RAFFALS; CAMILLERI, 2023).

O gene Jun é um importante componente do complexo proteico AP-1 (Activator Protein-1), que é um fator de transcrição associado a regulação de genes envolvidos em processos celulares como crescimento, proliferação, diferenciação e apoptose (MENG; XIA, 2011; VOGT, 2001). Este gene codifica proteínas proto-oncogênicas, que realizam a coordenação dos eventos citados, sendo c-Jun a proteína mais estudada desse complexo (FERRARI et al., 2006; MENG; XIA, 2011). Na literatura, pode-se encontrar estudos que envolvem a proteína c-Jun ao crescimento tumoral a partir do processo de inflamação do intestino em camundongos APC^{min/+}, que carregam naturalmente uma mutação supressora de tumores (LI et al., 2012). Há também associações da proteína c-Jun e sua sinalizadora Jun N-Terminal quinase em estudos envolvendo Doenças Inflamatórias Intestinais por meio do aumento de cascatas de sinalizações que providenciam respostas inflamatórias (MITSUYAMA et al., 2006). Nesse contexto, o gene Jun é um fator importante no controle de crescimento, proliferação e sinalização celular. A diminuição da sua expressão neste trabalho pode afetar o controle normal exercido sobre a proliferação celular, contribuindo para o desenvolvimento de câncer e metástase. Por outro lado, o aumento da sua expressão também pode desencadear processos forçados de diferenciação das células, que podem se tornar cancerosas.

O gene Pax3 codifica uma proteína que faz parte da família de proteínas Pax, denominada *paired box protein 3*, que é um fator de transcrição que desempenha um papel crucial no desenvolvimento embrionário, especialmente no desenvolvimento do sistema

nervoso e dos músculos esqueléticos. Sua expressão é estudada durante a indução neural e ocorre em diferentes células da crista neural, como melanoblastos, gânglios e precursores das células de Schwann (BOUDJADI et al., 2018). Estudos que demonstram o gene Pax3 e sua baixa expressão contribuem no desenvolvimento da Doença de Hirschsprung, que é definida pela ausência de gânglios nervosos em regiões do cólon, acarretando disfunções no sistema nervoso entérico. Nesta doença outros fatores estão presentes, como a dependência da regulação do gene RET e o fator de modificação Tcof1 (BARLOW et al., 2013). Embora a expressão deste gene seja importante no cérebro, seu papel em doenças que afetam o trato gastrointestinal não está bem elucidado. Ao analisar o efeito do subproduto do café na expressão de Pax3, pode-se inferir uma possível contribuição no desenvolvimento inadequado dos neurônios entéricos.

O gene Prss8, também conhecido como prostasina, é um gene que codifica uma serina protease, enzima conhecida por desempenhar papéis importantes em diversos processos fisiológicos no corpo como controle da pressão arterial, manutenção da barreira cutânea e processos inflamatórios do sistema imunológico (CHEN, 2023). A sua expressão no epitélio intestinal denota atividade relacionada a aderência celular pela integridade de barreiras mucosas, mas também em vias inflamatórias envolvidas com desenvolvimento de retocolite crônica, carcinogênese e metástase na situação de desregulação (YANG et al., 2021). De acordo com Bao *et al.* (2019), o nocaute condicional do gene em camundongos resultou em colite espontânea com inflamação retal, além de aparecimento de tumores intestinais em animais que apresentavam idade mais avançada e a baixa expressão de Prss8 facilita o processo de proliferação e migração das células intestinais, mas dificultou a sua diferenciação, concluindo uma atividade supressora de carcinogênese e metástase da expressão normal do gene. Dessa forma, é possível inferir que a diminuição da sua expressão após o consumo do subproduto do café não ideal é apropriada para manutenção da homeostase intestinal, ao permitir que os processos de disfunção de barreira e inflamação sejam facilitados.

O gene Psen2 codifica a proteína presenilina-2, que é um componente essencial do complexo γ -secretase. Este complexo enzimático está envolvido na clivagem de proteínas de membrana, incluindo a proteína precursora amiloide (APP), resultando na produção de peptídeos β -amiloide (WOLFE, 2021). O acúmulo de peptídeos β -amiloide no cérebro é uma característica patológica chave da doença de Alzheimer (LANOISELÉE et al., 2017). Em um estudo realizado *in vivo* por Erkert *et al.* (2024), as presenilinas

também estão envolvidas com o epitélio e o sistema imune intestinais, e a sua deleção induzida resultou em perda rápida de peso pela desregulação de vias de absorção de nutrientes e inflamação espontânea nos camundongos, que apresentaram disfunção da barreira epitelial com translocação bacteriana. Dessa forma, foi possível afirmar que o gene *Psen2* faz parte estratégica da homeostase intestinal e pode ser estudado e tratado para se tornar um alvo molecular terapêutico e relação a integridade da barreira em doenças inflamatórias intestinais. Visto que a expressão de *Psen2* foi diminuída com a presença do subproduto do café, este subproduto não se torna um potencial material de estudo para atingir estas determinadas funções.

O gene *Sirt1* codifica uma proteína da família das sirtuínas, a sirtuína 1. É uma enzima que atua como uma desacetilase dependente de NAD^+ , removendo grupos acetil de proteínas (YANG *et al.*, 2022). Este processo de desacetilação é crucial para o reparo de DNA, envelhecimento, resposta ao estresse oxidativo e controles de vias imune-inflamatórias (CARUSO *et al.*, 2014). Devida a esta relação com o sistema imune e processos inflamatórios, muitos estudos relacionam a sirtuína 1 com doenças inflamatórias intestinais na situação de baixa expressão. De acordo com DEVI *et al.* (2020), a regulação negativa do gene sustenta a produção de citocinas pró-inflamatórias e aparecimento de estresse oxidativo na colite e, assim como reportado por Caruso *et al.* (2014) e Wellman *et al.* (2017), traz a presença de $\text{NF}\kappa\text{B}$ como importante fator provedor da inflamação. Os autores citados apresentam o gene *Sirt1* como importante regulador e atenuador de inflamação intestinal. Além disso, Wellman *et al.* (2017) apresenta dados sobre o gene e sua interferência na colite por meio de experimentos com indução da doença por DSS e administração de antibiótico para avaliação de efeitos sobre a microbiota em camundongos, concluindo que os microrganismos também estão sob constante moderação da sirtuína. Outro estudo ainda aborda o gene *Sirt1* na senescência e diferenciação celular atrelado ao processo de tumorigênese. Zu *et al.* (2016) associa o papel da sirtuína 1 no câncer colorretal, também atrelada a regulação negativa da expressão. Dessa forma, fica evidente o possível prejuízo que o subproduto do café possar causar na expressão de *Sirt1* e na manutenção dos processos saudáveis do intestino já que seu consumo foi regulado negativamente.

O gene *Tgm1* codifica a proteína transglutaminase 1, da família das transglutaminases, que são enzimas com função de suporte, adesão e composição de membranas e promovem catálise pós-traducional de proteínas por meio de desamidação

e substituição com aminas, expressas principalmente em epitélios escamosos estratificados da pele e trato digestivo (DUARTE et al., 2020; PINA DORE et al., 2018). É o gene mais relevante na abordagem da doença Ictiose lamelar, distúrbio raro de excessiva queratinização da pele (ECKERT et al., 2014). Apesar do gene estar principalmente associado a pele, existem alguns estudos que o relacionam com o intestino, sugerindo que a transglutaminase 1 pode estar envolvida com a perda de função da barreira intestinal em retocolite ulcerativa, quando em baixa expressão (ELLI et al., 2009). Por outro lado, WU *et al.* (2024) usando uma abordagem de estudo do gene em pesquisa com câncer, apresenta a expressão de *Tgm1* significativamente aumentada em adenocarcinoma de cólon e reto. A partir da revisão sobre a relação do gene *Tgm1* e o intestino, não foi possível estabelecer afirmações, já que a relação direta entre esses fatores ainda é muito pouco estudada e evidenciada. Sabe-se que a transglutaminase 2 é proeminente em processos inflamatórios, alérgicos e de fibrose no intestino e a mais estudada nesse sistema (ELLI et al., 2009). Deste modo, seria importante a realização de novos estudos sobre o papel desta enzima no trato gastrointestinal.

O gene *Tyr* codifica a enzima tirosinase, responsável pela produção de melanina nos melanócitos presentes principalmente na pele, olhos e cabelos, com funcionalidade de proteção à radiação ultravioleta e coloração pigmentosa (ZOLGHADRI *et al.*, 2019). Na literatura, não há estudos suficientes sobre a relação do gene *Tyr* e sua função ou importância no intestino. A diferença estatística apresentada na expressão da tirosinase no intestino dos animais a partir do consumo do subproduto do café, portanto, é inconclusiva e demanda mais estudos. No entanto, algumas propostas podem ser feitas a fim de identificar abordagens onde essa relação possa ser apresentada. MORI *et al.* (2006) e TESSIER *et al.* (2003) apresentam estudos sobre casos de melanomas no cólon, bem como seus aspectos clínicos, tratamentos e prognósticos, entretanto não apresentam colocações sobre as possíveis causas do desenvolvimento tumoral. Visto que a tirosinase é uma enzima chave na via biossintética da melanina, e o melanoma é um tipo de câncer que se origina nos melanócitos onde essa melanina é produzida, é possível tornar essa relação um pouco mais evidente, trazendo possíveis causas sobre o desenvolvimento do melanoma no cólon. São necessários mais estudos sobre esse melanoma apesar da sua raridade, e o entendimento do mecanismo oncogênico pode elucidar os melhores tratamentos e alvos farmacológicos a serem apontados.

Quanto aos efeitos do subproduto de café sobre genes associados a marcadores de doenças da pele, apenas quatro foram afetados. Enquanto o produto aumentou significativamente a expressão dos genes Hsp90aa1 e Panx3, promoveu a redução dos genes Cdk11 e Muc1.

O gene Hsp90aa1 codifica a proteína de choque térmico 90 α , ou Hsp90 α , e é induzido principalmente em situações de estresse celular ou tecidual (ZUEHLKE et al., 2015). A proteína Hsp90 α é conservada, ou seja, sua função é essencial e foi mantida ao longo da evolução dos organismos, sugerindo que desempenha um papel fundamental na biologia (CHEN; FEDER; KANG, 2018). Além disso, funciona como uma chaperona, auxiliando o dobramento, funcionamento e degradação de outras proteínas (ZUEHLKE et al., 2015). Apesar da proteína ser conhecida em diversos tipos de tecidos, ela se apresenta em processos importantes na pele como em cicatrização e câncer. No estudo de BHATIA *et al.* (2018), Hsp90 α é colocada como impulsor na cicatrização de feridas na pele pela sua função extracelular não-chaperona. O estudo utilizou camundongos mutantes defeituosos na função chaperona em comparação com camundongos controle, com a função chaperona normal. O fechamento das feridas não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos de animais, evidenciando a função não-chaperona como fator importante na cicatrização de feridas. Além disso, a inibição seletiva da proteína com função não-chaperona por anticorpo monoclonal interferiu no processo de fechamento da ferida assim como na proteína sem mutação. O autor conclui que a lesão induz aumento e deposição de Hsp90 α na ferida, e que a proteína é armazenada em todas as células da pele para possível secreção em meio ao estresse. Em outro estudo, realizado por YUAN & WANG & CHEN (2022), a expressão do gene, bem como a presença da proteína sérica e tecidual, foi analisada num estudo de abordagem pan-câncer. Neste estudo, a expressão de ambos aparece aumentada no melanoma cutâneo. A partir dessas informações, o aumento na expressão do gene a partir da presença do subproduto do café pode estar indicando situações de estresse no tecido cutâneo dos animais. É necessário afirmar que o tecido de pele retirada para análise dos genes não contava com feridas abertas ou fechadas, e poderiam estar em choque por estresse celular, de modo que a função chaperona estava ativada.

As panexinas são glicoproteínas que formam canais de membrana única para o transporte de íons e metabólitos entre as células. A panexina 3, expressa pelo gene Panx3, é altamente presente na pele principalmente durante o envelhecimento, além de realizar

outras funções importantes como cicatrização de feridas e diferenciação dos queratinócitos (O'DONNELL et al., 2023). De acordo com o autor citado, camundongos com nocaute global de panexina 3 tiveram a barreira epidérmica diminuída, aumento da sinalização inflamatória e dermatite em animais envelhecidos. Ainda, apesar do entendimento da panexina 3 ainda não ser muito bem esclarecido em relação a pele mais envelhecida, o autor confirma a expressão na pele e em anexos como glândulas sebáceas, glândulas écrinas e folículos pilosos. A sua ação em relação a cicatrização é dada principalmente pela diferenciação dos queratinócitos, que são as células que fazem a reepitalização do epitélio perdido. Outro estudo, realizado por ZHANG *et al.* (2021), demonstra a panexina 3 como fator de desenvolvimento da pele a partir da modulação da epiprofina, fator de transcrição essencial para a regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento e diferenciação da epiderme. Camundongos Panx3^{-/-} apresentam desenvolvimento da pele prejudicado e regeneração tardia dos folículos. Ambos os autores evidenciam que a diferenciação dos queratinócitos nos processos de cicatrização se dão a partir dos canais de liberação de ATP e cálcio do retículo endoplasmático das células. Dessa forma, o aumento da expressão de Panx3 após o consumo do subproduto do café pode estar relacionado com o envelhecimento da pele, considerando que os animais morrem na fase adulta, ou demonstrando processos inflamatórios que o subproduto pode estar desencadeando.

A quinase dependente de ciclina 11, pertencente da subfamília das CDKs transcripcionais, é codificada pelo gene CDK11 e é uma proteína que atua em diversas vias celulares como transcrição, mitose e apoptose por meio de suas variantes, como CDK11p110, CDK11p58 e CDK11p46, respectivamente (DOS SANTOS PAPARIDIS; CANDURI, 2018). A função geral da quinase dependente de ciclina 11 corresponde a associação ao RNA e às proteínas histonas do núcleo principalmente durante a fase S do ciclo celular para a coordenação de funções como empacotamento do DNA, acesso a genes específicos para transcrição e morte celular (GAJDUŠKOVÁ et al., 2020). Os estudos mencionados ainda relacionam a importância da expressão do gene em relação ao crescimento e desenvolvimento de cânceres. AHMED *et al.* (2019) publicou um estudo sobre a relação do gene CDK11 e a sua expressão no melanoma, a partir da interação de CDK11 com dois genes importantes no desenvolvimento do câncer, Braf (proteína B-Raf) e Nras (proteína N-Ras), ambas mutadas e envolvidas na proliferação e crescimento de melanomas. O autor frisa o alto poder de metástase do melanoma, além da necessidade

do desenvolvimento de terapias por alvos moleculares que não contenham tantos efeitos adversos como o tratamento quimioterápico. Nesse cenário, a Cdk11 se torna um desses alvos, visto que em outros tipos de cânceres como de mama, ósseo e ovariano, a expressão reducional do gene já permite o desenvolvimento de terapias que causem disfunções ao ciclo celular e, portanto, impeçam a divisão e proliferação de células cancerígenas. No estudo, o autor ainda evidencia que a Cdk11 é altamente expressa em Braf e Nras mutados em tecidos melanômicos, indicando um potencial alvo molecular para impedir a viabilidade dessas linhagens celulares cancerosas. Nesse contexto, a diminuição da expressão do gene Cdk11 a partir da presença do subproduto do café pode se tornar um potencial material de estudo para a diminuição da expressão, com o intuito de impedir o processo do ciclo e divisão celular, a fim de evitar uma proliferação celular cancerígena.

As mucinas são proteínas com função de hidratação e proteção de tecidos epiteliais de barreira. A mucina 1, codificada pelo gene Muc1, também atua em processos de regeneração e remodelação epitelial de modo a adaptarem os tecidos às infecções ou estresses ambientais, em montagem de respostas de proliferação celular, cicatrização de feridas e desenvolvimento de câncer (APOSTOLOPOULOS; STOJANOVSKA; GARGOSKY, 2015; KUFE, 2022). Na epiderme da pele, que é constituída por diversas camadas de células escamosas, a mucina 1 ajuda na integridade da barreira e é capaz de ativar células-tronco ao longo do processo de manutenção e reparação desse tecido (KUFE, 2022). De acordo com os autores citados, o gene Muc1 é primordialmente regulado positivamente em tecidos com disfunções malignas ou em condições de cânceres e sua propriedade antiadesiva dificulta processos de lise por células do sistema imune e permite a transferência de células tumorais para outros tecidos. Além da sua conexão com o câncer, o gene Muc1 também é atualmente relacionado à psoríase, uma doença inflamatória crônica da pele caracterizada pelo espessamento provindo da proliferação disfuncional de queratinócitos (ARCINIEGAS et al., 2015). Ainda, ARCINIEGAS et al. (2015) e ABDOU et al. (2019) evidenciam a expressão altamente regulada nas placas psoriáticas de pacientes e comentam a pouca ou nenhuma atividade do gene em peles normais. Dessa forma, expressão de Muc1 diminuída após o consumo do subproduto do café não se relaciona com atividades tumorigênicas como nos estudos citados, nem apresenta características de inflamações ou de reparos teciduais. Além disso, não há estudos na literatura que apresentem a relação entre diminuição de expressão e Muc1, seja para disfunções malignas ou benignas.

Finalmente, o subproduto do café ainda foi capaz de aumentar a expressão de 4 genes no cérebro: *Acss2*, *IL-6*, *Tgm1* e *Tgm5*.

A AcetilCoA sintase 2, expressa pelo gene *Acss2*, é uma enzima metabólica expressa em órgãos importantes como fígado, coração e cérebro, e atua na via de transformação do acetato em AcetilCoA, uma molécula essencial na respiração celular (COMERFORD et al., 2014). Sua expressão varia de acordo com situações de privação de nutrientes, falta de oxigênio ou ativação imunológica (MILLER et al., 2021). No cérebro, essa enzima já foi indicada como alvo molecular para tratamento de glioblastoma, tumor cerebral bastante prevalente em adultos (KARGBO, 2019; LING et al., 2022). De acordo com ZHANG et al. (2019), a AcetilCoA sintase 2 também controla processos de autofagia em situações de privação de nutrientes para manter a sobrevivência celular e a expressão do gene também é evidenciada na via de prelevamento da memória a partir da sua regulação epigenética de acetilação de histonas nos neurônios. Estudos realizados com camundongos modelados para a Doença de Alzheimer demonstraram o resgate da plasticidade e de funções cognitivas a partir do aumento da expressão de *Acss2* e consequentemente da acetilação de histonas (LIN et al., 2023; POURSHAFIE et al., 2024). De forma similar, EGERVARI; BERGER (2020), consolidaram a relação entre a *Acss2* e sua importância no controle da memória e sua perda na Doença de Alzheimer. A *Acss2*, que se mantém ligada às cromatinas dos neurônios, contém reservas de AcetilCoA que impulsionam a acetilação de histonas e consequentemente, melhoram o acesso a expressão de genes chave que regulam a memória e a aprendizagem. Na Doença de Alzheimer, essa ligação com a cromatina é perdida, diminuindo a acetilação normal que acontece no processo de envelhecimento e acarretando uma perda de memória característica da doença. Dessa forma, os estudos concluem que a *Acss2* realiza um forte efeito protetor da memória, e tem alto potencial de funcionar como alvo molecular no tratamento e sintomas da doença. Visto que o subproduto do café aumentou a expressão do gene, é importante considerá-lo como um produto a ser mais estudado para o tratamento da perda de memória tendo o gene *Acss2* como alvo farmacológico.

O gene *IL6*, codificador da citocina pró-inflamatória *IL-6*, participa de processos inflamatórios crônicos e de distúrbios autoimunes por meio de trans-sinalização (ROSE-JOHN et al., 2023). Essa ativação permite que vias patológicas de células imunes se desenvolvam em câncer e doenças neurodegenerativas (KAUR et al., 2020). Apesar disso, a função da interleucina 6 no sistema nervoso ainda é estudada tanto pelos seus

efeitos benéficos como destrutivos, pois atua não somente nas vias inflamatórias como em vias de diferenciação, regeneração e degeneração neuronal, que pode estar atrelado a processos importantes para a manutenção da homeostase nervosa (SPOOREN et al., 2011). Independentemente, KUMMER et al. (2021) também coloca a interleucina 6 como um dos principais componentes responsáveis pela inflamação sistêmica do sistema nervoso de acordo com o envelhecimento do organismo e, assim, relaciona a IL-6 com doenças neurodegenerativas. O autor cita que a desregulação da expressão de IL6 está associada à esclerose múltipla neuroinflamatória, onde evidencia a presença da citocina no líquido cefalorraquidiano, causando lesões no cérebro. Em seu estudo, em que a IL6 está regulada positivamente, o uso de anticorpos neutralizantes e a depleção genética do gene diminuem os sinais da doença, e ainda coloca a interleucina 6 como fator relatado em outras doenças neurodegenerativas como doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington. De acordo com LYRA E SILVA *et al.* (2021), na doença de Alzheimer, a interleucina 6 está relacionada ao comprometimento da memória e às disfunções do metabolismo periférico, em que essa ativação da via inflamatória foi principalmente observada no hipotálamo e hipocampo de camundongos com a doença, e concordam com a ideia de que a inibição ou neutralização do gene melhoram o comprometimento da memória nos animais. Dessa forma, ao analisar o aumento da expressão do gene IL6 após o consumo do subproduto do café e os estudos descritos, tem-se que o aumento da sinalização ou ativação de vias inflamatórias podem estar sendo exibidos, tornando o subproduto em questão um fator de disfunção da homeostase neuronal.

A transglutaminase 1, codificada pelo gene *Tgm1* e já introduzida nestes resultados anteriormente, não apresenta muitos relatos recentes em sua atividade sobre doenças neurodegenerativas. Porém, no estudo de TRIPATHY *et al.* (2020), realizado *in vitro* sobre a toxicidade neuronal associada a Doença de Alzheimer, a transglutaminase 1 aparece envolvida em processos metabólicos do peptídeo amiloide- β , característico da doença. O estudo sugere que o aumento da *Tgm1*, que ocorre em resposta ao estresse celular e induzido pela presença de peptídeo amiloide- β , faz dela um possível alvo para tratamentos, dado que *Tgm1* aumenta em resposta ao estresse e está envolvida na morte neuronal associada à Doença de Alzheimer. Assim, se torna um potencial ponto de intervenção para desenvolver medicamentos que possam bloquear ou modular sua atividade, ajudando assim a proteger os neurônios e potencialmente retardar a progressão

da doença (TRIPATHY et al., 2020). No entanto, estudos *in vivo* carecem na literatura científica, de modo a serem incentivados a partir deste trabalho e do estudo citado.

O gene Tgm5 é codificador da proteína transglutaminase 5, e, assim como o Tgm1, é conhecido por ser expresso nas camadas superiores e estratificadas escamosas da epiderme humana (CANDI et al., 2002; DUARTE et al., 2020). Mutações que inativam este gene estão relacionadas a uma patologia denominada Síndrome de Descamamento Acral da Pele, em que a descamação acontece em regiões dorsais das mãos e dos pés (DUARTE et al., 2020). Seu estudo relacionado a patologias neurodegenerativas apresentou-se na Ataxia Espinocerebelar tipo 1, patologia causada pela expansão e acúmulo tóxico de uma proteína denominada polyQ, que contém repetições longas da sequência de aminoácidos glutamina, principalmente no alelo ataxina-1 (LEE et al., 2022). Ainda de acordo com o autor, pacientes com esta patologia sofrem de déficits motores e disfunção bulbar, acarretando em problemas na respiração e deglutição. Nesta doença, a transglutaminase 5 aparece como potencial moduladora de estabilidade, solubilidade e oligomerização da ataxina-1 mutante, catalisando ligações cruzadas e aumentando o nível de organização da proteína (LEE et al., 2022). Apesar da menção da transglutaminase 5 no estudo, ainda há muito o que se elucidar sobre como tratá-la como alvo terapêutico para a ataxia espinocerebelar tipo 1, bem como é necessário continuar estudando as múltiplas facetas da doença para encontrar um tratamento efetivo. Com o aumento da expressão do gene Tgm5 a partir do subproduto do café, pode-se inferir que a transglutaminase 5 tem capacidade de agir como estabilizadora de proteínas, aumentando a complexidade de seus níveis e podendo potencialmente contribuir para o seu acúmulo desregulado testemunhado em doenças neurodegenerativas.

A partir de todas as informações coletadas, algumas das atividades de expressão gênica realizadas após a interferência do subproduto do café merecem destaque. O gene Tyr, expresso no intestino, aparece como uma novidade na literatura científica por não haver documentos que relacionem a expressão do gene no órgão. Dessa forma, é uma possibilidade investigar mais profundamente se essa ligação pode estar associada a prevenção de doenças como o melanoma cólico ou se em relação algum outro tipo de patologia, o gene pode ser investigado como alvo farmacológico. Além disso, outros genes em destaque deste estudo é o gene Cdk11 expresso na pele, por já ser usado e pesquisado como marcador de cânceres, e Acss2 expresso no cérebro, que apresentou uma atividade muito benéfica em relação a prevenção da memória na Doença de

Alzheimer. Portanto, investigar mais detalhadamente a função farmacológica do gene pode acrescentar o conhecimento acerca da referida patologia.

Por outro lado, em genes como *Cldn4* expresso no intestino, *Muc1* expresso na pele e *Tgm1* expresso no cérebro, a atividade apresentou mais de uma possível abordagem, seja benéfica ou maléfica. A perspectiva de utilização do gene como alvo farmacológico em relação a cada órgão depende de outros fatores para que possa ser bem sucedida, mas pode ser mais devidamente investigada se necessário.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e das discussões estabelecidas, o subproduto do café adicionado à dieta permitiu a identificação de alvos farmacológicos interessantes a terem seus estudos aprofundados.

A ferramenta de análise de expressão gênica foi essencial no processo de identificação desses alvos. Foram 368 análises gênicas no total, sendo que 3 delas foram destacadas a partir da revisão bibliográfica apresentada na discussão. Além disso, os resultados permitem uma seleção mais específica de genes para futuros estudos.

Em relação aos eixos Intestino-Pele e Intestino-Cérebro, o subproduto do café confirmou atividade biológica que permitiu a abertura de portas para novos raciocínios em relação ao tratamento de doenças dermatológicas e neurodegenerativas.

Sobre a identificação de genes e vias comuns nos eixos de estudo, apenas o gene *Tgm1* foi expresso tanto no intestino como no cérebro. Mais estudos são necessários para a busca de uma possível relação do gene nos dois órgãos a partir da presença do subproduto do café.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GUERRA, Antonio Fernando *et al.* Cafés do Brasil: pesquisa, sustentabilidade e inovação. In: TELHADO, Samuel Filipe Pelicano *et al.* **Tecnologias Poupa-Terra 2021**. Brasília: Embrapa, 2021. p. 63-75.
- CORADI, P. C.; BORÉM, F. M.; OLIVEIRA, J. A. Qualidade do café natural e despulpado após diferentes tipos de secagem e armazenamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 181–188, abr. 2008.
- REZENDE, João Eudes de. **Série tecnológica cafeicultura: preparo do café: via seca e via úmida**. Reduto: Emater, 2013. 6 p. Disponível em: http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/Preparo_do_cafe_via_seca_e_via_umida.pdf. Acesso em: 30 nov. 2023.
- DURÁN, Carlos AA et al. Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da Bebida. **Revista virtual de química**, v. 9, n. 1, p. 107-134, 2017.
- RICARDINO, Isadora Ellen Feitoza; SOUZA, Maria Nathalya Costa; DA SILVA NETO, Irineu Ferreira. Vantagens e possibilidades do reaproveitamento de resíduos agroindustriais. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 1, n. 8, p. 55-79, 2020.
- SOCCOL, Carlos Ricardo. Resíduo de café: um substrato promissor para a produção industrial de bioprodutos com alto valor agregado. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil (1.: 2000: Poços de Caldas, MG). Palestras. Brasília, D.F.: Embrapa Café, 2002. (374p.), p. 83-98.
- VALENTE, Joana Miguel Leite Duarte. **Subprodutos alimentares: novas alternativas e possíveis aplicações farmacêuticas**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade Fernando Pessoa (Portugal).
- PUGLIA, C.; LAURO, M. R. Botanicals: Innovative Tools for Pharmaceutical, Cosmetic and Nutraceutical. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 24, p. 4504–4505, 11 out. 2019.
- EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

DI VINCENZO, F. et al. Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. **Internal and Emergency Medicine**, 28 jul. 2023.

ÁLVAREZ, J. et al. Microbiota intestinal y salud. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 44, n. 7, p. 519–535, ago. 2021.

CALATAYUD, P. A.; ROLIM, L. M.; SORANZ, M. A.; SANTO, E. D.; DUTRA, M. O. O papel do intestino nas doenças dermatológicas: Revisão de literatura. **BWS Journal (Descontinuada)**, [S. l.], v. 3, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://bwsjournal.emnuvens.com.br/bwsj/article/view/56>. Acesso em: 20 fev. 2024.

BERNARDO, Ana Flávia Cunha; SANTOS, Kamila dos; SILVA, Débora Parreiras da. Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do nascimento à maturidade. **Revista Saúde em foco**, Itajubá, v. 1, n. 11, p. 1221-33, 2019.

ANDRADE, I. F. G.; GUREVICH, L. RELAÇÃO MICROBIOTA INTESTINAL E PELE SAUDÁVEL: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA CONCISA. **BWS Journal (Descontinuada)**, [S. l.], v. 6, p. 1–11, 2023. Disponível em: <https://bwsjournal.emnuvens.com.br/bwsj/article/view/395>. Acesso em: 20 fev. 2024.

SINHA, S.; LIN, G.; FERENCZI, K. The skin microbiome and the gut-skin axis. **Clinics in Dermatology**, v. 39, n. 5, p. 829–839, set. 2021.

MARTINS, E. A. C.; MACIEL FILHO, P. R. Mecanismos de expressão gênica em eucariotos. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 1–5, jun. 2010.

STRACHAN, Tom; READ, Andrew. **Genética Molecular Humana**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda, 2013.

ELLIS, H.; MAHADEVAN, V. Anatomy of the caecum, appendix and colon. **Surgery (Oxford)**, v. 32, n. 4, p. 155–158, abr. 2014.

FUJIWARA-TANI, R. et al. Claudin-4: A New Molecular Target for Epithelial Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5494, 13 mar. 2023.

- LIU, W.; LI, M. The role of claudin-4 in the development of gastric cancer. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 55, n. 9, p. 1072–1078, 1 set. 2020.
- FERRARI, A. L. et al. Expressão dos protooncogenes c-fos, c-myc e c-jun em miométrio normal e mioma humanos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, n. 10, out. 2006.
- MENG, Q.; XIA, Y. c-Jun, at the crossroad of the signaling network. **Protein & Cell**, v. 2, n. 11, p. 889–898, 17 nov. 2011.
- VOGT, P. K. Jun, the oncoprotein. **Oncogene**, v. 20, n. 19, p. 2365–2377, 30 abr. 2001.
- LI, Y. et al. Gut microbiota accelerate tumor growth via c-jun and STAT3 phosphorylation in APC Min/+ mice. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 6, p. 1231–1238, jun. 2012.
- MITSUYAMA, K. et al. Pro-inflammatory signaling by Jun-N-terminal kinase in inflammatory bowel disease. **International Journal of Molecular Medicine**, 1 mar. 2006.
- BARLOW, A. J. et al. Tcof1 acts as a modifier of Pax3 during enteric nervous system development and in the pathogenesis of colonic aganglionosis. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 6, p. 1206–1217, 15 mar. 2013.
- BOUDJADI, S. et al. The expression and function of PAX3 in development and disease. **Gene**, v. 666, p. 145–157, ago. 2018.
- MAYER, E. A.; NANCE, K.; CHEN, S. The Gut–Brain Axis. **Annual Review of Medicine**, v. 73, n. 1, p. 439–453, 27 jan. 2022.
- SINGH, A.; DAWSON, T. M.; KULKARNI, S. Neurodegenerative disorders and gut-brain interactions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 13, 1 jul. 2021.
- THAU, Lauren; REDDY, Vamsi; SINGH, Paramvir. **Anatomy, Central Nervous System**. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542179/>. Acesso em: 16 abr. 2024.
- ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 488–495, maio 2012.

- KRÁL, E.; RUKOV, J. L.; MENDES, A. C. Coffee Cherry on the Top: Disserting Valorization of Coffee Pulp and Husk. **Food Engineering Reviews**, 9 ago. 2023.
- BAO, Y. et al. PRSS8 suppresses colorectal carcinogenesis and metastasis. **Oncogene**, v. 38, n. 4, p. 497–517, 24 jan. 2019.
- YANG, W. et al. Differential gene expression of tight-junction proteins and their correlation with PRSS8 and prognosis in colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 39, n. 15_suppl, p. e15548–e15548, 20 maio 2021.
- CHEN, Li-Mei. **Prostasin in human health and disease**. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2023.
- ERKERT, L. et al. Alzheimer’s disease-related presenilins are key to intestinal epithelial cell function and gut immune homeostasis. **Gut**, p. gutjnl-2023-331622, 29 abr. 2024.
- LANOISELÉE, H.-M. et al. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. **PLOS Medicine**, v. 14, n. 3, p. e1002270, 28 mar. 2017.
- CARUSO, R. et al. Defective expression of SIRT1 contributes to sustain inflammatory pathways in the gut. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 6, p. 1467–1479, nov. 2014.
- DEVI, K.; SINGH, N.; JAGGI, A. S. Dual role of sirtuin 1 in inflammatory bowel disease. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 42, n. 5, p. 385–391, 2 set. 2020.
- WELLMAN, A. S. et al. Intestinal Epithelial Sirtuin 1 Regulates Intestinal Inflammation During Aging in Mice by Altering the Intestinal Microbiota. **Gastroenterology**, v. 153, n. 3, p. 772–786, set. 2017.
- ZU, G. et al. Clinicopathological significance of SIRT1 expression in colorectal cancer: A systematic review and meta analysis. **International Journal of Surgery**, v. 26, p. 32–37, fev. 2016.
- ECKERT, R. L. et al. Transglutaminase Regulation of Cell Function. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 383–417, abr. 2014.
- ELLI, L. et al. Transglutaminases in inflammation and fibrosis of the gastrointestinal tract and the liver. **Digestive and Liver Disease**, v. 41, n. 8, p. 541–550, ago. 2009.

- WU, R. et al. A pan-cancer analysis of the oncogenic and immunological roles of transglutaminase 1 (TGM1) in human cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 150, n. 3, p. 123, 12 mar. 2024
- ZOLGHADRI, S. et al. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 279–309, 1 jan. 2019.
- MORI, D. et al. Primary colonic malignant melanoma. **Pathology International**, v. 56, n. 12, p. 744–748, 10 dez. 2006.
- TESSIER, D. J. et al. Melanoma Metastatic to the Colon. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 46, n. 4, p. 441–447, abr. 2003.
- BHATIA, A. et al. Extracellular and Non-Chaperone Function of Heat Shock Protein–90 α Is Required for Skin Wound Healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 2, p. 423–433, fev. 2018.
- YUAN, Z.; WANG, L.; CHEN, C. Analysis of the prognostic, diagnostic and immunological role of HSP90 α in malignant tumors. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 8 set. 2022.
- ZUEHLKE, A. D. et al. Regulation and function of the human HSP90AA1 gene. **Gene**, v. 570, n. 1, p. 8–16, out. 2015.
- O'DONNELL, B. L. et al. PANX3 Channels Regulate Architecture, Adhesion, Barrier Function, and Inflammation in the Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 143, n. 8, p. 1509- 1519.e14, ago. 2023.
- ZHANG, P. et al. Pannexin 3 regulates skin development via Epiprofin. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1779, 19 jan. 2021.
- AHMED, R. L. et al. CDK11 Loss Induces Cell Cycle Dysfunction and Death of BRAF and NRAS Melanoma Cells. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 2, p. 50, 2 abr. 2019.
- DOS SANTOS PAPARIDIS, N. F.; CANDURI, F. The Emerging Picture of CDK11: Genetic, Functional and Medicinal Aspects. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 880–888, 16 mar. 2018.

GAJDUŠKOVÁ, P. et al. CDK11 is required for transcription of replication-dependent histone genes. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 27, n. 5, p. 500–510, 4 maio 2020.

ABDOU, A. G. et al. Immunolocalization of MUC1 in chronic plaque psoriasis. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 40, n. 5, p. 515–527, 3 set. 2019.

APOSTOLOPOULOS, V.; STOJANOVSKA, L.; GARGOSKY, S. E. MUC1 (CD227): a multi-tasked molecule. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 23, p. 4475–4500, 21 dez. 2015.

ARCINIEGAS, E. et al. **Histology and histopathology from cell biology to tissue engineering**. [s.l.] F. Hernández y Juan F. Madrid. Universidad de Murcia: Departamento de Biología Celular e Histología, 2015.

KUFE, D. W. Emergence of MUC1 in Mammals for Adaptation of Barrier Epithelia. **Cancers**, v. 14, n. 19, p. 4805, 30 set. 2022.

EGERVARI, G.; BERGER, S. L. ACSS2 and the metabolic-epigenetic axis in Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 16, n. S2, 7 dez. 2020.

KARGBO, R. B. Inhibition of ACSS2 for Treatment of Cancer and Neuropsychiatric Diseases. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 8, p. 1100–1101, 8 ago. 2019.

LIN, Y. et al. ACSS2-dependent histone acetylation improves cognition in mouse model of Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 18, n. 1, p. 47, 12 jul. 2023.

LING, R. et al. Acetyl-CoA synthetase 2(ACSS2): a review with a focus on metabolism and tumor development. **Discover Oncology**, v. 13, n. 1, p. 58, 7 jul. 2022.

POURSHAFIE, N. et al. ACSS2 upregulation enhances neuronal resilience to aging and tau-associated 1 neurodegeneration 2. **USA School of Medicine**, [s.d.].

ZHANG, H. et al. ACSS2-related autophagy has a dual impact on memory. **Chinese Neurosurgical Journal**, v. 5, n. 1, p. 14, 11 dez. 2019.

KAUR, S. et al. A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 115327, mar. 2020.

KUMMER, K. K. et al. Role of IL-6 in the regulation of neuronal development, survival and function. **Cytokine**, v. 144, p. 155582, ago. 2021.

LYRA E SILVA, N. M. et al. Pro-inflammatory interleukin-6 signaling links cognitive impairments and peripheral metabolic alterations in Alzheimer's disease. **Translational Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 251, 28 abr. 2021. PAL, S. K.; SHUKLA, Y. Herbal medicine: current status and the future. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, v. 4, n. 4, p. 281–8, 2003.

TRIPATHY, D. et al. Increased transcription of transglutaminase 1 mediates neuronal death in in vitro models of neuronal stress and A β 1–42-mediated toxicity. *Neurobiology of Disease*, v. 140, p. 104849, jul. 2020.

BOYAJIAN, J. L. et al. Microbiome and Human Aging: Probiotic and Prebiotic Potentials in Longevity, Skin Health and Cellular Senescence. *Nutrients*, v. 13, n. 12, p. 4550, 18 dez. 2021.

QUIGLEY, E. M. M. Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 17, n. 12, p. 94, 17 dez. 2017.

TAN, A. H.; LIM, S. Y.; LANG, A. E. The microbiome–gut–brain axis in Parkinson disease — from basic research to the clinic. **Nature Reviews Neurology**, v. 18, n. 8, p. 476–495, 24 ago. 2022.

MENDONÇA, L. M. V. L.; PEREIRA, R. G. F. A.; MENDES, A. N. G. Parâmetro bromatológicos de grãos crus e torrados de cultivares de café (*Coffea arabica* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 2, p. 239–243, jun. 2005.

BOBKOVÁ, A. et al. Comparative Analysis of Selected Chemical Parameters of *Coffea arabica*, from Cascara to Silverskin. **Foods**, v. 11, n. 8, p. 1082, 8 abr. 2022.

MACHADO, M. et al. Coffee by-products: An underexplored source of prebiotic ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 64, n. 20, p. 7181–7200, 6 ago. 2024.

DUNLEAVY, K. A.; RAFFALS, L. E.; CAMILLERI, M. Intestinal Barrier Dysfunction in Inflammatory Bowel Disease: Underpinning Pathogenesis and Therapeutics. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 68, n. 12, p. 4306–4320, 29 dez. 2023.

WOLFE, M. S. Targeting γ -secretase for familial Alzheimer's disease. *Medicinal Chemistry Research*, v. 30, n. 7, p. 1321–1327, 27 jul. 2021.

YANG, Y. et al. Regulation of SIRT1 and Its Roles in Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 11 mar. 2022. DUARTE, L. et al. Transglutaminases: part I—origins, sources, and biotechnological characteristics. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 36, n. 1, p. 15, 2 jan. 2020.

PINA DORE, M. et al. Tissue transglutaminase activity in human gastric mucosa according to *Helicobacter pylori* infection. *Experimental Biology and Medicine*, v. 243, n. 15–16, p. 1161–1164, 12 nov. 2018.

CHEN, B.; FEDER, M. E.; KANG, L. Evolution of heat-shock protein expression underlying adaptive responses to environmental stress. *Molecular Ecology*, v. 27, n. 15, p. 3040–3054, 2 ago. 2018.

MILLER, K. D. et al. Targeting ACSS2 with a Transition-State Mimetic Inhibits Triple-Negative Breast Cancer Growth. **Cancer Research**, v. 81, n. 5, p. 1252–1264, 1 mar. 2021.

COMERFORD, S. A. et al. Acetate Dependence of Tumors. *Cell*, v. 159, n. 7, p. 1591–1602, dez. 2014.

ROSE-JOHN, S. et al. Targeting IL-6 trans-signalling: past, present and future prospects. *Nature Reviews Immunology*, v. 23, n. 10, p. 666–681, 17 out. 2023.

SPOOREN, A. et al. Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Research Reviews*, v. 67, n. 1–2, p. 157–183, jun. 2011.

CANDI, E. et al. Expression of Transglutaminase 5 in Normal and Pathologic Human Epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 119, n. 3, p. 670–677, set. 2002.

LEE, W.-S. et al. Cross-species genetic screens identify transglutaminase 5 as a regulator of polyglutamine-expanded ataxin-1. **Journal of Clinical Investigation**, v. 132, n. 9, 2 maio 2022.