

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Avaliação dos efeitos antioxidantes e pró-longevidade do
extrato de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) no organismo modelo
*Caenorhabditis elegans***

David Silva Nunes

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Avaliação dos efeitos antioxidantes e pró-longevidade do
extrato de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) no organismo modelo
*Caenorhabditis elegans***

David Silva Nunes

Orientadora

Riva de Paula Oliveira

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
da Universidade de Ouro Preto como requisito
parcial para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.**

Ouro Preto

2011

AGRADECIMENTOS RELIGIOSOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado guiando meus passos e me socorrendo nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

- Aos meus Pais por apoiar-me e confortar-me e pelo exemplo de vida e às minhas irmãs Hellem, Sarah e meu irmão Lucas pelo apoio e carinho. Muito obrigada por estarem comigo mesmo a distancia
- A Paula Alves Medeiros por me ajudar nos momentos mais difíceis
- A Marilaine Guimaraes Pires por mostrar-me o caminho
- Aos amigos do laboratório Franciny, Everton, Igor, Larissa, Patrícia, Ricardo e Valquíria, Washington, por fazerem do nosso laboratório o mais feliz do planeta e por momentos inesquecíveis que passamos juntos. Vocês foram importantíssimo, cada uma com sua peculiaridade só fizeram enriquecer esse trabalho, muito obrigada por tudo.
- Aos amigos da pós-graduação, membros da B.P do mestrado/doutorado Obrigada pelos momentos inesquecíveis e pela grande amizade que sempre demonstraram.
- Os amigos Bruna, Cristiana, Eduardo que estavam sempre prontos a ajudar.
- A professora DR_a Riva de Paula Oliveira pela orientação e apoio.
- A professora DR_a Leoneide por ser uma grande amiga.
- Aos ilustres desconhecidos aqui eu agradeço a todos os que de certa forma me ajudaram no período em que esse trabalho foi realizado

Resumo:

O alto consumo de comidas e bebidas ricas em flavonóides tem sido associado com o menor risco de doenças degenerativas crônicas como aterosclerose e câncer devido tanto às suas atividades antioxidantes diretas de remoção de radicais livres, quanto à sua capacidade de atuar como antioxidante indireto ativando diferentes vias de sinalização contra o estresse oxidativo. O *Euterpe oleracea* Mart. ou açaizeiro é uma palmeira nativa das regiões amazônicas cuja fruta é rica em flavonóides, especialmente em antocianinas e proantocianidinas (cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo). Recentemente, diversos estudos têm destacado as propriedades antioxidantes, pró-apoptóticas, antiproliferativas e pró-longevidade do açai, tanto em ensaios *in vitro* quanto em modelos animais. Neste trabalho, o *Caenorhabditis elegans* foi utilizado como organismo modelo para testar as atividades antioxidantes *in vivo* de diferentes extratos de açai que possam ser exploradas para aumentar as defesas inatas ao estresse oxidativo e a longevidade. Através do método do pH diferencial, foi verificado que a quantidade de antocianinas presentes nos dois extrato de açai liofilizado (AL-1 e AL-2) apresentaram em torno de 19,2 a 34,7 mg de antocianinas monoméricas/100g de extrato. Para testar se o tratamento com os extratos de açai liofilizado (AL-1 e AL-2) aumentam a resistência ao estresse oxidativo, animais tipo selvagem foram tratados por 48 horas do estágio larval L1 até L4 com 100 e 200 mg/ml de extrato de açai e depois submetidos ao estresse provocado por hidróperóxido de terc-butila (t-BOOH). Animais tratados com 200 mg/ml não se desenvolvem e permanecem em L1. Já os animais selvagens tratados com 100 mg/ml de AL-1 e AL-2 foram mais resistentes ao estresse oxidativo provocado por 5 mM de t-BOOH do que os animais não tratados. Por outro lado, o tratamento dos animais tipo selvagem com 100 mg/ml de AL-1 por 168 horas não aumentou a resistência ao estresse térmico a 35°C. O tratamento contínuo com 100 mg/ml de AL-1 também não aumentou a longevidade dos animais tipo selvagem. Apesar de apresentarem uma maior resistência ao estresse, os animais tratados com 100mg/ml do extrato de açai por 48 horas não apresentaram uma diferença significativa quanto aos marcadores bioquímicos (atividade da catalase) e indicadores de resistência (proteína carbonilada e sulfidrilas totais) em relação aos animais do grupo controle. Para verificar se o aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido pelo tratamento com extrato de açai depende das vias de sinalização p38/SKN-1 e DAF-16, os ensaios de resistência ao estresse oxidativo foram repetidos usando mutantes de deleção *sek-1(ku7)*, a p38 MAPKK, *skn-1(RNAi)* e *daf-16(mgDf46)*. Aparentemente, o tratamento com 100 mg/ml AL-1 não aumentou a resistência ao estresse oxidativo dos mutantes *sek-1* e *daf-16*, sugerindo que este aumento depende da ativação de SEK-1 e DAF-16. Por outro lado, não foi observada a indução da localização nuclear nos animais tratados contendo gene repórter *DAF-16::GFP*. Estes dados sugerem que o aumento da resistência ao estresse oxidativo induzido pelo tratamento com extrato de açai possivelmente depende da p38 MAPK e DAF-16, porém sem ocorrer ativação da localização nuclear de DAF-16.

Abstract

The high consumption of foods and beverages rich in flavonoids has been associated with lower risk of chronic degenerative diseases such as atherosclerosis and cancer due to both their direct antioxidant removal of free radicals, for their ability to act as an antioxidant indirectly by activating different pathways signaling against oxidative stress. *Euterpe oleracea* Mart. or açai palm is a native of the Amazon regions whose fruit is rich in flavonoids, especially anthocyanins and proanthocyanidins (cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinosídeo). Several recent studies have highlighted the antioxidant properties, pro-apoptotic, antiproliferative and pro-longevity of açai, both in vitro and in animal models. In this work, *Caenorhabditis elegans* was used as a model organism to test the in vivo antioxidant activities of different extracts of açai that could be exploited to enhance innate defenses to oxidative stress and longevity. Through the pH differential method, it was found that the amount of anthocyanins present in açai freeze-dried extract of two (AL-1 and AL-2) showed around 19.2 to 34.7 mg of anthocyanins monoméricas/100g extract. To test whether treatment with extracts of freeze-dried açai (AL-1 and AL-2) increase resistance to oxidative stress, wild-type animals were treated for 48 hours of larval stage L1 to L4 with 100 and 200 mg / ml extract açai and then subjected to stress caused by tert-butyl hydroperoxide (t-Booher). Animals treated with 200 mg / ml do not develop and remain in L1. Since wild animals treated with 100 mg / ml of AL-1 AL-2 and were more resistant to oxidative stress caused by 5 mM t-Booher than untreated animals. On the other hand, treatment of wild-type animals with 100 mg / ml of AL-1 for 168 hours did not increase the resistance to heat stress at 35 ° C. Continuous treatment with 100 mg / ml of AL-1 did not increase the longevity of wild-type animals. Despite having a higher resistance to stress, the animals treated with 100mg/ml of the extract of açai for 48 hours did not show a significant difference to the biochemical markers (catalase activity) and indicators of resistance (total sulfhydryl and protein carbonyl) in relation to the control group. To verify that the increased resistance to oxidative stress promoted by treatment with açai extract depends on signaling pathways p38/SKN-1 and DAF-16, tests of resistance to oxidative stress were repeated using deletion mutants of sek-1 (ku7), the p38 MAPKK, skn-1 (RNAi) and daf-16 (mgDf46). Apparently, treatment with 100 mg / ml AL-1 did not increase oxidative stress resistance mutants of sek-1 and daf-16, suggesting that this increase depends on the activation of SEK-1 and DAF-16. On the other hand, no significant induction of nuclear localization in treated animals containing reporter gene DAF-16:: GFP. These data suggest that the increased resistance to oxidative stress induced by treatment with açai extract possibly depends on p38 MAPK and DAF-16, but occurs without activation of the nuclear localization of DAF-16.

Lista de figuras

FIGURA 1. Ciclo de vida do <i>C. Elegans</i> . Fonte: worm atlas.....	13
FIGURA 2. Regulação de Nrf2/FOXO.....	15
FIGURA 3 Esquema dos genes repórter para DAF-16.....	30
FIGURA 4 - Localização subcelular de <i>DAF-16::GFP</i>	49

Lista de tabelas

TABELA 1 - Conteúdo de antocianinas monoméricas, representado como conteúdo de cianidina-3-glicosídeo(mg/100 g).....	33
TABELA 2 – Análise da longevidade dos animais tipo selvagem tratados com AL-1 a 25°C.....	40
TABELA 3 - Efeito do tratamento com AL-1 sobre a atividade de catalase e os níveis dos grupos sulfidrila totais e proteína carbonilada.....	43

Lista de gráficos

GRÁFICO 1 – Efeito do tratamento com 100 mg/ml de AL na sobrevivência do <i>C. elegans</i>	35
GRÁFICO 2 – Efeitos tratamento com açaí na sobrevivência do <i>C. elegans</i> em condições de estresse térmico.....	37
GRÁFICO 3 – Efeitos do tratamento com 100 mg/ml de AL-1 na sobrevivência do <i>C. elegans</i>	39
GRÁFICO 4 - Dosagem dos marcadores bioquímicos e enzimáticos no <i>C. elegans</i> tratado com açaí.....	41
GRÁFICO 5 - Efeito do tratamento com 100 mg/ml de AL-1 na sobrevivência de animais <i>skn-1(RNAi)</i> em condições de estresse oxidativo.....	44
GRÁFICO 6 - Efeito do tratamento com 100 mg/ml de AL-1 na sobrevivência de mutantes <i>sek-1</i> em condições de estresse oxidativo.....	46
GRÁFICO 7 - Efeito do tratamento com 100 mg/ml de AL-1 na sobrevivência de mutantes <i>daf-16</i> em condições de estresse oxidativo.....	47

ABREVIATURAS

AM antocianinas monomericas

AL-1 Açai liofilizado 100mg/ml

AL-1 Açai liofilizado 100mg/ml

ARE - Elemento de Resposta Antioxidante

CAT - catalase

CYPs - citocromo P450

EpRE - Elemento de Resposta à Eletrófilo

ERK - proteína quinase regulada por sinal extracelular

Eros – Espécies Reativas de Oxigênio

FD- Fator de diluição

FoxO - Forkhead Box

GCS - γ -glutamylcisteina sintetase

GPx - glutathione peroxidase

GR - glutathione reductase

GSK3 β - glicogênio sintase quinase-3 β

GST - glutathione S-transferase

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

JNK - c-Jun N-terminal kinase

MAPK - Proteínas Aativadas por Mitógenos

Nrf2 - Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2

PM- Peso Molecular

PKC - proteína quinase C

SDRs - desidrogenases/redutases de cadeia curta

SOD - superóxido dismutase

t-BOOH - tert-butyl peroxide

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
Lista de tabelas.....	viii
Lista de gráficos.....	ix
ABREVIATURAS.....	x
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ESTRESSE OXIDATIVO.....	2
1.2 MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE COMBATE AO ERO.....	3
1.2.1 Controle da Expressão Gênica das Enzimas Antioxidantes em Mamífero.....	4
1.3 MECANISMOS NÃO ENZIMÁTICOS DE COMBATE AO ERO.....	5
1.3.1 Antioxidantes Polifenólicos.....	6
1.4 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO AÇAÍ.....	7
1.4.1 Propriedades Antioxidantes <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	7
1.4.2 Propriedades Anti-inflamatórias <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	8
1.4.3 Propriedades Antiproliferativas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	9
1.4.4 Proteção Contra Estresse Hiperlipídico.....	10
1.4.5 Efeitos Benéficos na Saúde Humana.....	11
1.5 ORGANISMO MODELO <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	11
1.5.1 Controle da Expressão Gênica das Enzimas Antioxidantes no <i>C. elegans</i>	12
1.5.1.1 A via de sinalização de SKN-1/Nrf.....	13
1.5.1.2 A Via de Sinalização de DAF-16.....	16
1.6 <i>C. elegans</i> COMO UM MODELO PARA ESTUDOS DE FITOQUÍMICOS.....	17
2 OBJETIVO	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3 METODOLOGIA	21
3.1 CEPAS E LINHAGENS.....	22

3.2	CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DO <i>C. ELEGANS</i>	22
3.3	SINCRONIZAÇÃO CRONOLÓGICA DO <i>C. ELEGANS</i>	23
3.4	EXTRATOS DE AÇAÍ.....	23
3.5	QUANTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS.....	24
3.6	ENSAIOS BIOLÓGICOS	25
3.6.1	Preparação das Placas NGM Contendo Extrato de Açaí.....	25
3.6.2	Ensaio de Resistência ao Estresse Oxidativo.....	25
3.6.3	Ensaio de Resistência ao Estresse Térmico.....	25
3.6.4	Ensaio de Longevidade	26
3.7	DOSAGEM DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	26
3.7.1	Dosagem dos Níveis Totais de Grupos de Sulfidrilas	27
3.7.2	Dosagem da Atividade da Catalase.....	27
3.7.3	Dosagem dos Níveis de Proteína Carbonilada.....	28
3.7.4	Dosagem de Proteínas Totais.....	29
3.8	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE <i>DAF-16</i>	30
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4	RESULTADOS.....	32
4.1	QUANTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS.....	33
4.2	ANÁLISE DA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO DOS ANIMAIS TRATADOS COM DIFERENTES EXTRATOS DE AÇAÍ.....	34
4.3	ANÁLISE DA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE TÉRMICO DOS ANIMAIS TRATADOS COM AL-1.....	36
4.4	ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA EM CONDIÇÕES NORMAIS DOS ANIMAIS	36
4.5	ANÁLISE DE MARCADORES BIOQUÍMICOS E ENZIMÁTICOS NOS ANIMAIS TRATADOS COM AL-1.....	38
4.6	ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE SKN-1/P38MAPK NO AUMENTO DA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO PROMOVIDO PELO AL- 1.....	43
4.6.1	Análise da Resistência ao Estresse Oxidativo nos Animais <i>skn-1(RNAi)</i>	43
4.6.2	Análise da Resistência ao Estresse Oxidativo em mutantes <i>sek-1</i>	45

4.7 ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE DAF-16/FOXO NO AUMENTO DA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO PROMOVIDO PELO AL-1	45
.....	
4.7.1.1 Análise da resistência ao estresse oxidativo em mutantes <i>daf-16</i>	45
4.7.2 Análise da Localização DAF-16:: GFP	48
5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	50
5.1 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO EXTRATO DE AÇAÍ	51
5.1.1 Quantificação de Antocianinas nos Extratos de Açaí	52
5.1.2 Ensaio Biológico	53
5.1.3 Dosagens Bioquímicas	58
5.2 POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO DO EXTRATO AÇAÍ	61
5.2.1 A Via de Sinalização SKN-1/p38 MAPK	62
5.2.2 A Via de Sinalização de DAF-16	62
6 CONCLUSÕES	65
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é uma consequência da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), ou uma redução nas defesas antioxidantes do organismo, e ocorre devido a um desequilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes. (FINKEL & HOLBROOK *et al.*, 2000).

O ERO pode ser gerado de forma endógena durante o metabolismo celular, ou de forma exógena, como por exposição a drogas e a alimentos (xenobióticos). Esses radicais danificam importantes macromoléculas celulares tais como DNA, lipídeos, carboidratos e proteínas (FINKEL & HOLBROOK *et al.*, 2000), portanto ele é considerado como um fator relevante no desenvolvimento de várias doenças crônicas degenerativas tais como aterosclerose, diabetes tipo 2 e câncer (COOKE *et al.*, 2003). Além de danificar macromoléculas, o estresse oxidativo pode causar processos inflamatórios e desempenhar um papel importante na ativação de oncogenes, bem como destruir genes supressores de tumor. O estresse oxidativo está envolvido na formação de agregados protéicos que podem levar ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (FORSBERG *et al.*, 2001). O ERO pode ainda aumentar a inflamação associada a aterosclerose e artrite reumatóide (GRIFFITHS, 2005; SCHROECKSNADEL *et al.*, 2006).

O sistema de defesa antioxidante, considerado um mecanismo de combate ao ERO, tem o objetivo primordial de manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, impedindo que os danos oxidativos se amplifiquem e causem prejuízos sistêmicos irreparáveis. (KUNDU & SURH, 2010)

Antioxidantes, que são substâncias que atacam e neutralizam o ERO prevenindo os danos causados por ele, podem ser classificados em dois grupos principais: enzimáticos e não enzimáticos (RATNAM *et al.*, 2006).

1.2 MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE COMBATE AO ERO

Os antioxidantes enzimáticos são produzidos endogenamente e fazem parte de um complexo sistema de detoxificação de três fases, altamente conservado entre eucariotos. As proteínas de detoxificação envolvidas neste processo são classificadas em Fase I, II e III. (SARKADI *et al.*, 2006).

A citocromo P450 monooxigenase (CYP) é a principal enzima envolvida na Fase I do metabolismo xenobiótico. As CYPs oxidam os xenobióticos por hidroxilação. Uma rede de enzimas detoxificadoras, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona transferase (GT) fazem parte da Fase II. A SOD age transformando dois ânions radicais superóxidos em um peróxido de hidrogênio, podendo ocorrer de três formas dependendo do metal associado a ela, sendo cobre (Cu) e zinco (Zn) no citoplasma e manganês (Mn) na matriz mitocondrial de eucariotos e ferro (Fe) em bactérias Perez *et al.*, 2009. A CAT tem a função de proteger as células catalisando a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água sem produção de radicais livres (McCORD, 1986; SIES, 1993; RATNAM *et al.*, 2006). A GPx é uma enzima localizada no citosol e na matriz mitocondrial, que reduz o peróxido de hidrogênio e hidropeptídeos orgânicos utilizando a glutathiona (GSH). A GSH atua como co-substrato da GPx, com propriedade doadora de elétrons, podendo ser regenerada através da glutathiona redutase (GR) com transferência de hidrogênio do NADPH. Neste processo são transferidos dois hidrogênios dos grupamentos sulfidríla para os peróxidos, transformando-os em álcool e/ou água, resultando em glutathiona dissulfeto (GSSG). A GPx geralmente ocorre associada ao selênio (Se). Os principais locais de ação da GPx são o fígado e os eritrócitos, podendo ocorrer no coração, pulmões e músculos. Finalmente na Fase III de detoxificação, os conjugados tóxicos são bombeados para fora da célula por transportadores cassetes de ligação de ATP (Transportador ABC) ou outros transportadores (SARKADI *et al.*, 2006).

1.2.1 Controle da Expressão Gênica das Enzimas Antioxidantes em Mamíferos

A condição de estresse oxidativo na célula induz várias respostas fisiológicas e patológicas. Estas respostas, em última análise, causam mudanças no perfil transcricional de forma a influenciar o destino da célula e a progressão de uma doença. Nas últimas décadas, vários fatores de transcrição e vias de sinalização foram identificados pelo seu papel crítico na resposta ao estresse oxidativo (MA *et al.*, 2010). Dentre estes fatores, podemos citar as proteínas Nrf e FoxO.

A ativação transcricional das enzimas da Fase II é principalmente mediada pelo elemento cis atuante denominado ARE (Antioxidant Response Element) que é reconhecido pelo fator de transcrição do tipo zíper de leucina básico (bZIP) Nrf (Nrf1 e Nrf2) (ITOH *et al.*, 1997). Em condições normais, Nrf localiza-se no citoplasma ligado a uma proteína associada à actina chamada Keap1 (ITOH *et al.*, 1999). Durante o estresse oxidativo, Nrf se desliga de Keap1 e transloca-se para o núcleo da célula ativando a expressão dos genes detoxificadores da Fase II (ITOH *et al.*, 1999; ZIPPER *et al.*, 2002). Esta dissociação de Nrf é alcançada através da mudança conformacional em Keap1 causada pela oxidação, da modificação de cisteínas essenciais (ITOH *et al.*, 1999) ou pela remoção de Zn de cisteínas coordenadoras na sua estrutura (DINKOVA-KOSTOVA *et al.*, 2005). Portanto os ativadores de Nrf2 são eletrofílicos e têm a capacidade de oxidar ou alquilar grupos tióis ou de quelar íons metais (KLUTH *et al.*, 2007).

A importância da ativação da resposta contra o estresse oxidativo e contra compostos xenobióticos pela proteína Nrf2 foi demonstrada em camundongos “knock-out” *Nrf2*^{-/-}. Estes animais não foram capazes de ativar os genes da Fase II no trato digestório e foram mais sensíveis ao estresse oxidativo e drogas tóxicas (ITOH *et al.*, 1997; CHAN *et al.*, 2001; HAYES, 2001). Os camundongos mutantes para ambas as proteínas Nrf1 e Nrf2 (*Nrf1*^{-/-};*Nrf2*^{-/-}) morreram antes de nascer, e as células isoladas destes camundongos foram hipersensíveis ao estresse oxidativo (LEUNG *et al.*, 2003). Evidências *in vivo* mostraram que camundongos deficientes para Nrf2 não respondem à proteção dos antioxidantes e são mais susceptíveis à carcinogênese (RAMOS-GOMES *et al.*, 2001).

As proteínas FoxO são fatores de transcrição conhecidos por seu papel nas respostas celulares ao estresse ambiental e fisiológico, cuja atividade é regulada por modificação pós-transcricional, incluindo a fosforilação. Um único gene FoxO está presente em

drosófila (*Dfoxo*) e *C. elegans* (*daf-16*) e 4 estão presentes em camundongos e humanos (FoxO1, FoxO3, FoxO4 e FoxO6) (LANDIS & MURPHY, 2010; YEN; NARASIMHAN; TISSENBAUM, 2011). Em resposta à via da insulina/IGF-1 e a outros fatores de crescimento, as proteínas quinases Akt e SGK fosforilam FoxO (com exceção dos FoxO6) em três locais conservados. Esta fosforilação promove a ligação de FoxO às proteínas 14-3-3 no citoplasma impedindo sua localização nuclear. Em resposta ao estresse oxidativo, a via JNK (c-Jun N-terminal kinase) fosforila diretamente FoxO, ativando a sua localização nuclear (MA, 2010; YEN; NARASIMHAN; TISSENBAUM, 2011). O aumento da atividade transcricional de FoxO ativa a expressão de catalase e SOD2, enzimas que são reguladas por FoxO aumentando a detoxificação de ERO (MA, 2010).

1.3 MECANISMOS NÃO ENZIMÁTICOS DE COMBATE AO ERO

Os antioxidantes não enzimáticos, exceto os de baixos peso molecular, são obtidos de fontes dietéticas. Estes são classificados em várias classes, das quais os polifenóis são a maior parte. As outras classes incluem vitaminas, carotenóides, compostos organosulfurados, minerais e cofatores que desempenham um papel importante na manutenção da saúde humana (RATNAM *et al.*, 2006).

A glutatona, o tocoferol, o ácido ascórbico e os carotenóides, são substâncias que podem participar diretamente em processos fisiológicos, bioquímicos e celulares neutralizando os radicais livres ou prevenindo as reações químicas deflagradas por eles (SHARONI *et al.* 2004; MASELLA *et al.*, 2005). Além destas características, antioxidantes diretos são consumidos ou quimicamente modificados no processo de ação e devem ser repostos ou regenerados após sua ação.

Entre os minerais destacam-se o zinco, cobre, selênio e magnésio. Já entre as vitaminas, destaca-se a vitamina C que tem ação removedora de ERO e também regeneradora da vitamina E (tocoferol). Como a vitamina C é hidrossolúvel, possui maior ação no plasma sanguíneo, enquanto a vitamina E, lipossolúvel, tem maior ação em membranas celulares (MANELA-AZULAY *et al.*, 2003)

1.3.1 Antioxidantes Polifenólicos

Os polifenóis são a maior classe de antioxidantes da dieta que compreendem uma variedade de compostos, divididos em várias classes (ácido hidrobencóico, antocianinas, proantocianinas, flavanóis, flavanonas, isoflavonas, flavonóides etc), que ocorrem em frutas e vegetais, vinhos e chás, chocolate e outros produtos do cacau (MANACH *et al.*, 2004).

O alto consumo de comidas e bebidas ricas em polifenóis, especialmente os flavonóides, tem sido associado com o menor risco de doenças degenerativas crônicas como aterosclerose e câncer (KLUTH *et al.*, 2007). Muitos dos efeitos fisiológicos dos flavonóides têm sido atribuídos à sua capacidade antioxidante direta de remoção de radicais livres. Os flavonóides são substâncias fenólicas de baixo peso molecular e possuem em sua estrutura química anéis aromáticos, tendo como base o 2-fenil-benzopirano (C6-C3-C6) (AHERNE & O'BRIEN, 2002). O efeito antioxidante direto dos flavonóides se deve à capacidade destes compostos em neutralizar os radicais livres (ânion superóxido, radicais hidroxilas e peroxilas) ou quelar íons metálicos (cobre e ferro). Os flavonóides apresentam grupos hidroxilas em sua estrutura, portanto eles podem inibir as reações de oxidação das espécies reativas de oxigênio, por doarem átomos de hidrogênio às espécies, estabilizando-as e transformando-se em quinonas (substâncias pardas). Ao quelar íons metálicos ocorrem à inibição da Reação de Fenton, uma forma endógena de produzir espécies reativas (ENIO, 2003).

Além da atividade antioxidante, os flavonóides também podem apresentar propriedades anti-inflamatória, anticancerígena, antiproliferativa e pró-apoptótica (MASELLA *et al.*, 2005). Os flavonóides regulam a atividade de enzimas antioxidantes, modulam receptores nucleares, atuam sobre a expressão gênica e vias de sinalização celular (MOSKAUG, 2004). Apesar de intensa investigação, os mecanismos específicos, pelo qual estes compostos alteram a saúde humana permanece incerto. Recentemente foi descrito que os flavonóides também podem atuar como antioxidantes indiretos (HU *et al.*, 2006; JUGE; MITHEN; TRAKA, 2007). O modo de atuação destes compostos é a ativação transcricional dos genes das enzimas detoxificantes da Fase II. Dentre os antioxidantes indiretos, já foi demonstrado que vários compostos fitoquímicos são potentes indutores de Nrf2 e das enzimas de detoxificação da Fase II, aumentando a capacidade

antioxidante da célula (DINKOVA-KOSTOVA *et al.*, 2005; SPORN & LIBY *et al.*, 2005 OSBURN & KENSLER, 2008).

1.4 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO AÇAÍ

O *Euterpe oleracea* Mart é uma espécie de palmeira nativa das regiões amazônicas conhecida como açazeiro, que tem ganhado grande destaque nas últimas décadas, em consequência das suas propriedades antioxidantes e nutricionais. O açaí, fruto oriundo dessa palmeira, tem uma importância econômica devido ao seu valor nutricional entre as populações indígenas da Amazônia. A polpa é rica em lipídeos essenciais e em certos minerais como o cálcio e o potássio, que podem contribuir para garantir o crescimento e bom funcionamento do corpo humano em geral, uma vez que esses nutrientes participam de várias reações metabólicas importantes no organismo (MENEZES *et al.*, 2008). O açaí liofilizado pode ser considerado como uma excelente alternativa de conservação da polpa do fruto, devido à presença de importantes componentes nutricionais encontrados no mesmo. Por ser altamente calórico é um excelente alimento a ser incorporado nas refeições de indivíduos com baixo peso, em especial a faixa etária infantil. Além disso, polpa de açaí liofilizada é uma alternativa para suprir deficiência nutricional de adultos e adolescentes afetados pelos hábitos alimentares do século XXI, que normalmente consomem refeições pobres em macronutrientes e em minerais (SANTOS *et al.*, 2008)

1.4.1 Propriedades Antioxidantes *in vitro* e *ex vivo*

Em relação as suas propriedades antioxidantes, já foi demonstrado que o açaí é rico em polifenóis, especialmente em flavonóides do tipo antocianinas e proantocianinas (DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2004; SCHAUSS *et al.*, 2006). Dentre os principais componentes fitoquímicos do açaí, as antocianinas cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo, são os compostos encontrados em maior abundância (DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2004; SCHAUSS *et al.*, 2006). Foi demonstrada a capacidade antioxidante *in vitro* da polpa de açaí para radicais peroxil (ROO^\cdot) e peroxinitrito (ONOO^\cdot) e hidroxila ($^\cdot\text{OH}$) (LICHTENTHALER *et al.*, 2005). A correlação desta capacidade antioxidante do açaí é

positiva para as frações de antocianinas e os compostos fenólicos totais (SANTOS *et al.*, 2008). Spada *et al.* (2008) também demonstraram *in vitro* que a polpa do açaí possui atividade antioxidante para o radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) e atividades semelhantes a da SOD e CAT. Jensen *et al.* (2008) analisaram os efeitos antioxidantes da bebida MonaVie cujo principal componente é o açaí. Esta bebida contém altos níveis das antocianidinas cianidina 3-rutenosídeo, e cianidina 3-glicosídeo e diminui a produção de ERO em células polinucleares incubadas com H₂O₂. A capacidade antioxidante também foi avaliada *ex vivo* em tecidos isolados do córtex cerebral, hipocampo e cerebelo de ratos. O pré-tratamento com açaí reduziu o dano oxidativo induzido por H₂O₂ em lipídios e proteínas e a atividade das enzimas SOD e CAT, restabelecendo níveis basais semelhantes ao grupo controle em todos os tecidos avaliados. É interessante ressaltar porém que nos tecidos tratados somente com açaí, nenhum dos parâmetros avaliados se alteraram (SPADA *et al.*, 2009). Guerra *et al.* (2011) demonstraram através de experimento com ratos, que o açaí foi capaz de modular a produção de EROs em neutrófilos e enzimas antioxidantes como a glutatona e a proteína carbonilada no fígado de animais diabéticos.

1.4.2 Propriedades Anti-inflamatórias *in vitro* e *in vivo*

A polpa de açaí também apresenta propriedade anti-inflamatória, como demonstrado pela sua habilidade de inibir a atividade das ciclooxigenases COX-1 e COX-2 em cultura de células (SCHAUSS *et al.*, 2006). De acordo com Noratto *et al.* (2011), o extrato de açaí também é capaz de proteger células endoteliais do estresse induzido por glicose, reduzindo a expressão de interleucina -6 e -8. Ainda segundo o autor, a expressão de moléculas de adesão e ativação de NF-kB foram inibidas nas células tratadas com açaí e induzidas com lipopolisacarídeo (NORATO *et al.*, 2011).

A presença do extrato de açaí em cigarros teve um efeito protetor contra o enfisema em camundongos (MOURA *et al.*, 2011). Os camundongos submetidos à fumaça de cigarro e extrato de açaí apresentaram menor nível de estresse oxidativo devido ao aumento na atividade de GPx e de GSH, em relação ao grupo exposto somente com fumaça de cigarro. Houve também uma redução da atividade da mieloperoxidase (MPO), uma enzima marcadora do influxo de neutrófilo e dano pulmonar (MOURA *et al.*, 2011).

1.4.3 Propriedades Antiproliferativas *in vitro* e *in vivo*

Além dos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, várias pesquisas apontaram que frações de polifenóis, extraídas da polpa de açaí, demonstraram atividade antiproliferativa e pró-apoptótica em células leucêmicas HL-60, através de mecanismo mediado pela caspase-3 (DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2006; SCHAUSS *et al.*, 2006). Ding *et al.* (2006) demonstraram que a cianidina 3-glicosídeo (C3G) possui propriedades quimiopreventivas e quimioterapêuticas. Em cultura de células, a C3G foi capaz de eliminar espécies reativas de oxigênio induzidas por radiação ultravioleta, enquanto o estudo *in vivo* demonstrou que o tratamento com C3G diminuiu o número de tumores de pele malignos e benignos induzidos por tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (MATIAS *et al.*, 2008). Os efeitos antiproliferativos de extratos obtidos a partir da polpa de açaí também foram avaliados em cultura de células de adenocarcinoma humano HT-29 onde apresentaram efeito inibitório de até 90,7% sobre a proliferação celular (PACHECO-PALENCIA *et al.*, 2008). Hogan *et al.* (2010) mostraram que o extrato enriquecido em antocianinas obtido a partir da polpa de açaí apresentou grande capacidade antiproliferativa em células do glioma cerebral C6. A análise de fragmentação do DNA indicou que este efeito pode ser devido à indução da apoptose nas células C6, após 48 horas de tratamento com 100 e 200 µg/mL do extrato. Os mesmos resultados não foram observados em células de câncer de mama MDA-468, sugerindo que a atividade antiproliferativa do extrato pode ser específica para determinados tipos celulares como as células C6. Ribeiro *et al.* (2010) observaram através do ensaio de cometa que o tratamento de ratos com açaí não teve nenhum efeito genotóxico nos micronúcleos de células da medula e nos eritrócitos e o tratamento foi capaz de reduzir o dano no DNA provocado por doxorubicina (DXR) nas células.

No entanto, Spada *et al.* (2008) mostraram que apesar da polpa do açaí possuir atividade antioxidante, também apresentou efeitos mutagênicos em altas concentrações em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

1.4.4 Proteção Contra Estresse Hiperlipídico

Além dos efeitos protetores contra o estresse oxidativo, o tratamento com extrato de açaí também exerce efeitos benéficos contra o estresse induzido por dietas hiperlipídicas (SOUZA *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A suplementação com 2% da polpa de açaí na dieta de ratos alimentados com dietas padrão e hipercolesterolêmica melhorou o perfil lipídico e de biomarcadores do estresse oxidativo no soro. Animais hipercolesterolêmicos apresentaram redução dos níveis séricos de colesterol total e colesterol não HDL após seis semanas de suplementação com a polpa de açaí. Além disso, a suplementação com açaí reduziu os níveis de proteínas carboniladas, aumentou a concentração de grupos sulfidríla livres e ligados a proteína e a atividade da enzima paraoxonase no soro de ratos alimentados com ambas as dietas. A suplementação com açaí também reduziu significativamente a atividade da superóxido dismutase apenas nos ratos hipercolesterolêmicos. Em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica, o tratamento com extrato de açaí reduziu o peso corporal, os níveis de triglicérides e colesterol total no plasma (OLIVEIRA *et al.*, 2010). O tratamento também diminuiu os níveis de glicose, a resistência a insulina e intolerância a glicose dos camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. Estes resultados sugerem que o açaí é uma fonte nutricional alternativa para prevenção da síndrome metabólica (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Usando a *Drosophila melanogaster* como modelo, Sun *et al.* (2010) observaram que moscas tratadas com dieta hipercalórica suplementada com açaí tiveram seu tempo de vida médio e máximo aumentados significativamente, quando comparadas àquelas apenas submetidas à dieta hipercalórica. Esse efeito pró-longevidade parece estar associado a um aumento na resposta ao estresse e a diminuição da expressão da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), enzima chave do controle da gliconeogênese e gliceroneogênese e modulada pelo fator de transcrição FoxO. Além disso, observou-se que a polpa de açaí aumentou a sobrevivência de moscas tratadas com RNAi para *sod1* (superóxido dismutase), principal enzima citosólica envolvida na eliminação de radicais superóxido da célula, sugerindo que o açaí pode aliviar o dano oxidativo *in vivo*. Análises moleculares demonstraram que a suplementação com açaí em moscas alimentadas com dieta hipercalórica aumentou a transcrição de enzimas envolvidas em funções antioxidantes e de resposta ao estresse, entre elas a glutathione-S-transferase.

1.4.5 Efeitos Benéficos na Saúde Humana

Apesar de grande parte dos estudos sobre os efeitos do extrato de açaí *in vivo* serem em organismos modelos, alguns estudos já foram realizados em humanos também (JENSEN *et al.*, 2008; MERTENS-TALCOO *et al.*, 2008; UDANI *et al.*, 2011; JENSEN *et al.*, 2011). Jensen *et al.* (2008) fizeram um ensaio randomizado, duplo-cego com doze indivíduos saudáveis, no qual o consumo de 120 mL da bebida a base de açaí causou um aumento da capacidade antioxidante do plasma, e inibição da peroxidação lipídica no soro, após intervalo de duas horas do consumo. Outro estudo clínico realizado em 12 humanos saudáveis demonstrou que o consumo de uma única dose de suco e polpa de açaí (7mL/Kg de peso) foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante do plasma em até 2,3 e 3 vezes. As antocianinas foram quantificadas no plasma após um período de 0 a 12 horas do consumo das bebidas, atingindo o pico de concentração plasmática após 2,2 horas para polpa e 2.0 horas para o suco clarificado (MERTENS-TALCOTT *et al.* 2008).

Udani *et al.* (2011) mostraram em um estudo piloto realizado com 10 adultos com sobrepeso que a ingestão de 100 mg de polpa de açaí duas vezes ao dia durante um mês promoveu a redução da glicemia de jejum e níveis os insulina. Houve também uma redução no colesterol total bem como no LDL-colesterol (UDANI *et al.*, 2011). Tendo em vista os efeitos anti-inflamatórios do açaí, um estudo piloto foi feito com 14 pacientes com dores e dificuldade de locomoção para verificar se o consumo de suco contendo na sua porção maior açaí (MonaVie) estaria associado com alívio da dor (JENSEN *et al.*, 2011). Além de melhorar significativamente a dor e a execução de atividades diárias, o consumo deste suco, também melhorou o *status* antioxidante do soro, reduziu a peroxidação lipídica e a proteína C reativa, um marcador inflamatório (JENSEN *et al.*, 2011).

1.5 ORGANISMO MODELO *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Caenorhabditis elegans é um nematóide terrestre de vida livre da família Rhabditidae. Nas últimas décadas, o *C. elegans* tem sido utilizado como organismo

modelo por mais de 200 laboratórios mundiais em estudos de biologia do desenvolvimento, genética, envelhecimento e de ecotoxicologia, levando a muitas descobertas importantes para os mamíferos, incluindo o homem. Uma das principais razões para isto é devido à grande semelhança que existe entre *C. elegans* e mamíferos, tanto a nível celular quanto molecular. Cerca de 60-80% dos genes homólogos aos humanos foram identificados no *C. elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; KALETTA E HENGARTER, 2006).

Além da alta homologia com o genoma dos mamíferos, este organismo possui uma série de características que o torna muito eficiente como modelo genético: é fácil de cultivar e possui um ciclo de vida curto. O *C. elegans* é facilmente cultivado em laboratório em placas de petri contendo ágar semeadas com a bactéria *Escherichia coli* como alimento. Os vermes atingem a maturidade com 2,5 dias a 25° C e tem um tempo de vida curto de 20 dias a 25°C. O ciclo de vida do animal consiste de um período de desenvolvimento embrionário dentro do ovo, quatro estágios larvais e finalmente o adulto (Figura 1). O ciclo de vida deste organismo inicia-se como uma única célula, que dá origem, através de divisões celulares repetidas, há 558 células que formam o pequeno verme dentro da casca do ovo. Após eclodir, divisões posteriores resultam no crescimento e na maturação sexual do verme. Após a muda final, o verme adulto hermafrodita começa a produzir os seus próprios ovos. Em condições adversas, tais como escassez de alimento ou estresse oxidativo, a larva L1 de *C. elegans* pode entrar em um estágio alternativo de diapausa. Neste estado, os animais são hipometabólicos e altamente resistentes ao estresse, com capacidade de sobreviver por longos períodos de várias semanas até meses (Figura 1). Outra característica importante é que o *C. elegans* é pequeno e transparente, permitindo que suas células possam ser acompanhadas individualmente e que os genes repórteres ligados ao GFP (Green Fluorescent Protein) possam ser observados no organismo ao vivo.

1.5.1 Controle da Expressão Gênica das Enzimas Antioxidantes no *C. elegans*

Assim como os mamíferos, o *C. elegans* possui o sistema de detoxificação de Fase I (citocromo p450), Fase II (AN *et al.*, 2003; MENZEL *et al.*, 2005) e Fase III (OLIVEIRA *et al.*, 2009). No *C. elegans*, a resistência ao estresse oxidativo é controlado, em parte, por dois principais fatores de transcrição: p38/SKN-1/Nrf e DAF-2/Ins/IGF-1 que ativam a

expressão dos genes de detoxificação.

1.5.1.1 A via de sinalização de *SKN-1/Nrf*

O SKN-1 é uma proteína bZIP que atua de forma análoga ao fator Nrf de mamíferos e promove resistência ao estresse e longevidade (WALKER *et al.*, 2001; AN & BLACKWELL, 2003). Em condições normais, SKN-1 localiza-se constitutivamente no núcleo dos neurônios ASI, correspondente ao hipotálamo, que detectam ou regulam a ingestão de comida (YOU *et al.*, 2008). Nestes neurônios, SKN-1 é necessário para o aumento da longevidade induzida pela restrição calórica (BISHOP & GUARENTE, 2007).

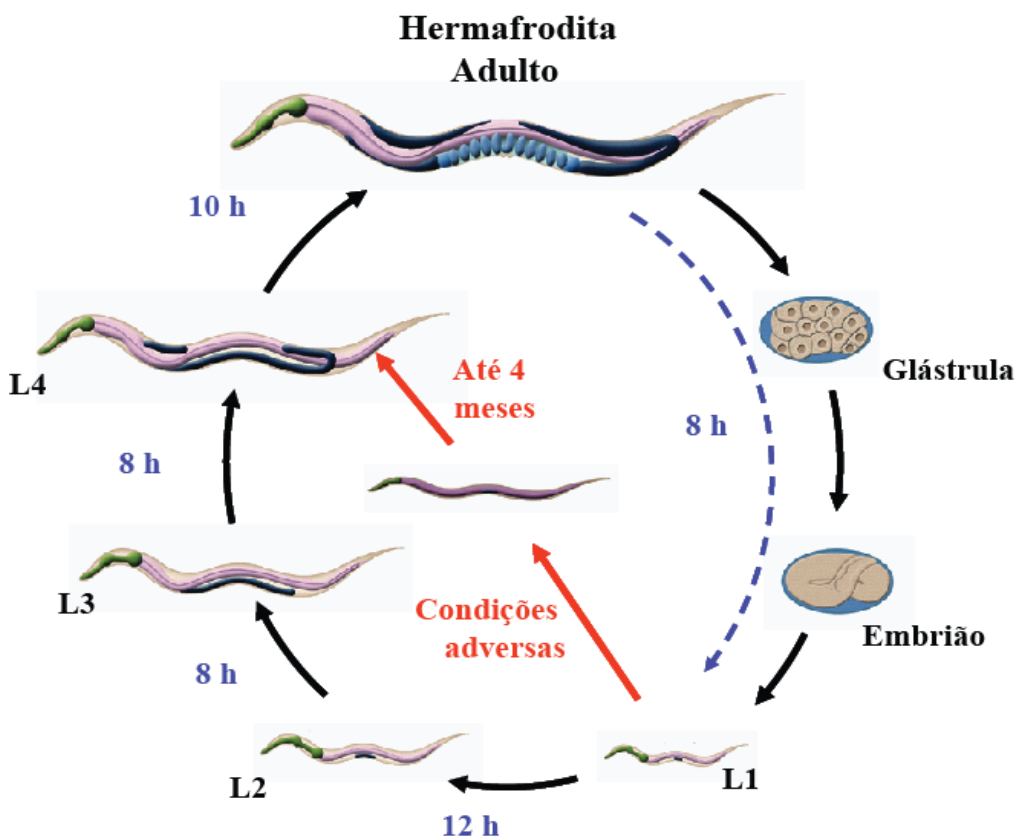


FIGURA 1. Ciclo de vida do *C. Elegans*. Fonte: worm atlas

Na ausência de estresse, a atividade de SKN-1 parece ser controlada tanto no citoplasma quanto no núcleo. No citoplasma, SKN-1 é regulado por várias vias de sinalização. SKN-1 é negativamente regulado através da fosforilação pela enzima glicogênio sintetase quinase (GSK-3) prevenindo sua acumulação no núcleo (AN *et al.*, 2005). Foi também demonstrado que a via da IIS (via de sinalização da insulina) regula

diretamente o fator de transcrição SKN-1. DAF-2 é homólogo ao receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) em mamíferos. DAF-2 ativa as enzimas fosfatidilinositol 3-quinase AGE-1 (PI3K), PDK-1, e AKT-1/2 quinases que antagonizam o fator de transcrição SKN-1 (TULLET *et al.*, 2009), assim como DAF-16, o fator ortólogo de FoxO (HENDERSON & JOHNSON, 2001; LEE *et al.*, 2003). Assim como nos mutantes *daf-2*, mutações em SKN-1 dirigidas para os sítios de fosforilação da AKT resultam na localização nuclear constitutiva de SKN-1. A deleção de *skn-1* em mutantes *daf-2* suprime os fenótipos da resistência ao estresse oxidativo e a longevidade, associados a este último. Além disso, o envelhecimento é retardado nos animais quando SKN-1 é superexpresso transgenicamente, e quando possuem o sítio de fosforilação para AKT-1/2 mutados na ausência de *daf-16*. Estes dados mostram que a via de IIS inibe diretamente SKN-1 em paralelo a DAF-16 e que SKN-1 contribui para a resistência ao estresse e longevidade, que são observados quando ocorre a redução da atividade de IIS. Recentemente, foi demonstrado que a via de sinalização ERK MAPK fosforila diretamente SKN-1 e ativa a localização nuclear deste (OKUYAMA *et al.*, 2010). A inibição da expressão dos genes da via ERK diminui a longevidade de animais tipo selvagem, mas não de mutantes *daf-16* e *skn-1* sugerindo que a longevidade controlada pela via ERK MAPK depende de SKN-1 e DAF-16 (OKUYAMA *et al.*, 2010).

Em condições normais SKN-1 associa-se à proteína WDR-23 e ao complexo protéico da ubiquitina ligase CUL-4/DDB-, sugerindo que SKN-1 seja degradado pelo sistema proteassômico (CHOE *et al.*, 2009). Também foi demonstrado que WDR-23 regula negativamente a expressão de genes de detoxificação de Fase II (HOSEGAWA & MIWA, 2010).

Já em condições de estresse, SKN-1 acumula-se no núcleo das células do intestino, o maior órgão de detoxificação no *C. elegans*, e ativa a transcrição genes alvos em resposta a vários estresses (AN & BLACKWELL *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2009). A localização nuclear de SKN-1 em condições de estresse no núcleo requer a sua fosforilação pela PMK-1, uma quinase conservada, pertencente à via de sinalização da p38 MAPK (MAPK -Mitogen-Activated Protein Kinase). SEK-1, a MAPK quinase que fosforila PMK-1 é necessária para ativar a localização de SKN-1 no núcleo e a expressão de *gcs-1* (INOUE *et al.*, 2005). Os mutantes com perda de função *skn-1* e *sek-1* são mais sensíveis ao estresse oxidativo, reforçando a importância de SEK-1-SKN-1 na defesa contra o

estresse oxidativo (AN & BLACKWELL, 2003; INOUE *et al.*, 2005). Além disso, mutantes *skn-1* possuem um tempo de vida reduzido em cerca de 25-30%, o que é consistente com associações feitas entre estresse oxidativo e longevidade (AN & BLACKWELL, 2003) (Figura 2).

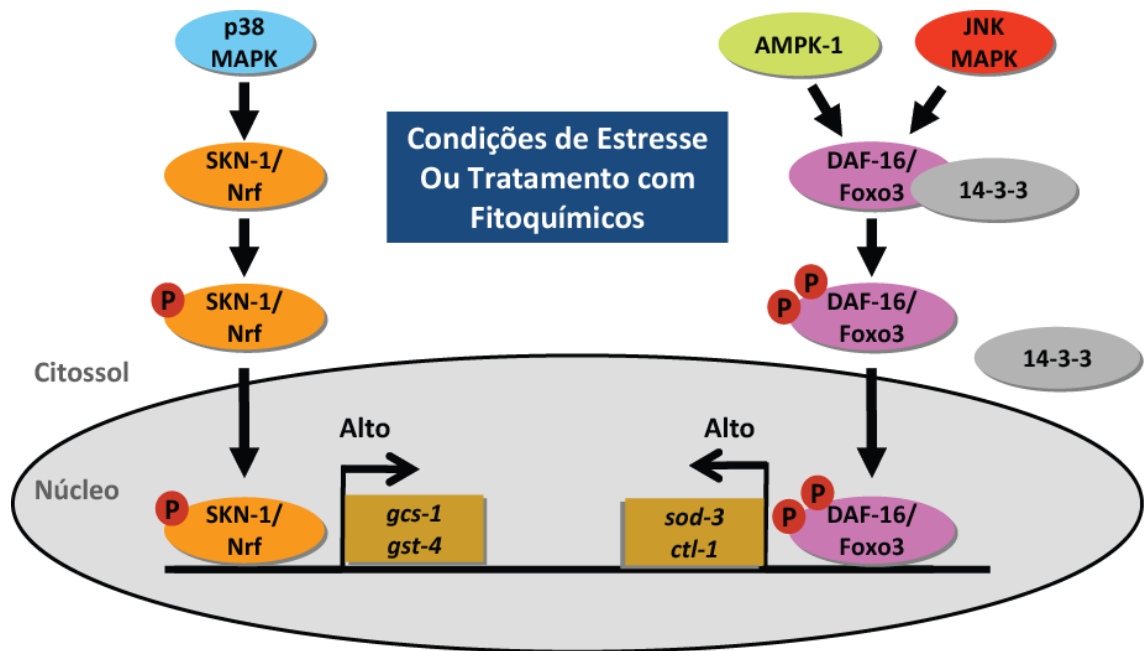


FIGURA 2. Regulação de Nrf2/FOXO. Fonte: INOUE *et al.* (2005); LANDIS & MURPHY, (2010).

A gama de genes regulados por SKN-1 inclui genes envolvidos em processos de detoxificação e resistência ao estresse, atividade lisossômica e proteossômica de degradação protéica, imunidade inata e várias vias metabólicas (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Entre os genes de detoxificação, foram identificadas várias glutationas-S-transferases, UDP-glicosil transferases e genes envolvidos na conjugação de compostos tóxicos, metabolismo de espécies reativas de oxigênio e síntese de glutationa. Além destes genes de Fase II, também foi identificado um número significativo de genes da Fase I de detoxificação (desidrogenases de cadeia curta e citocromo P450) e da Fase III (transportadores do tipo ABC). Outro grupo de genes que também chamou bastante a

atenção foi os genes envolvidos nas vias lisossômicas e proteassômicas de degradação de proteínas sugerindo que SKN-1 também teria um possível papel na reciclagem de proteínas danificadas (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Em resposta ao estresse provocado por arsenato de sódio (As), foi observada a expressão dependente de SKN-1 de vários genes de detoxificação sendo que a maioria deles é também expressos em condições normais. Por outro lado o tratamento com t-BOOH ativa a expressão de genes de detoxificação e metabolismo que são na sua maioria SKN-1 independentes. Estas observações sugerem que SKN-1 tem um papel importante tanto em condições normais como durante o estresse (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

1.5.1.2 A Via de Sinalização de DAF-16

Em *C. elegans*, a via de sinalização da insulina/IGF-1 controla vários processos biológicos tais como longevidade, reserva lipídica, reprodução e resposta ao estresse, termotolerância, resistência a patógenos, metabolismo e autofagia. (LEE *et al.*, 2003). Esta via é iniciada pelo receptor DAF-2, o homólogo do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) em mamíferos. Quando DAF-2 é ativado fosforila a fosfoinositol 3-kinase, AGE-1, gerando PIP3, que por sua vez recruta as kinases AKT-1, AKT-2, SGK-1 e PDK-1 para a membrana plasmática onde PDK-1 fosforila AKT e SGK-1. O complexo AKT-1/AKT-2/SGK-1 fosforila o fator de transcrição DAF-16, sequestrando-o no citoplasma e então prevenindo a ativação ou repressão de genes alvos no núcleo. Inibidores desta cascata incluem DAF-18, o fosfoinositol 3-fosfatase PTEN, que antagoniza AGE-1 pela defosforilação de PIP3, e PPTR-1, uma subunidade reguladora da PP2A que defosforila AKT-1 (LANDIS & MURPHY, 2010). O papel desta via de sinalização na longevidade e metabolismo é conservado em *C. elegans*, *Drosophila* e mamíferos. A via da DAF-2 insulina/IGF1 regula a expressão de várias enzimas de detoxificação, tais como superóxido dismutase (*sod-3*), catalases (*ctl-1* e *ctl-2*) (MURPHY *et al.*, 2003). Mutantes com alelo hipomórfico de *daf-2* são mais resistentes ao estresse oxidativo e possuem um tempo de vida prolongado em 40% comparado com nematóides do tipo selvagem, reforçando a teoria do dano oxidativo do radical livre e o envolvimento da mitocôndria e do ERO no processo de envelhecimento (VANFLETEREN & DE VREESE 1995; HONDA & HONDA, 1999).

Além da via DAF-2/Ins/IGF1, DAF-16 também pode ser regulado pela interação com as proteínas 14-3-3, AMPK e JNK. Similar a sinalização de FoxO de mamíferos, as proteínas 14-3-3 interagem com DAF-16 e regulam sua distribuição nuclear/citoplasmática. A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) ativa DAF-16 pela fosforilação direta. A família JNK é um subgrupo da superfamília MAPK e está associada com a regulação de processos biológicos críticos como o desenvolvimento, apoptose e sobrevivência celular. Em *C. elegans*, a via de sinalização JNK é ativada por diferentes estresses tais como estresse térmico e oxidativo. JNK interage fisicamente e fosforila DAF-16 em um sítio diferente dos sítios de fosforilação de AKT, e esta fosforilação resulta em um aumento da translocação nuclear de DAF-16 (MA, 2010).

1.6 *C. elegans* COMO UM MODELO PARA ESTUDOS DE FITOQUÍMICOS

Como apresentado acima, o *C. elegans* é um excelente modelo para identificação rápida de compostos com propriedades biológicas e apresenta grandes vantagens em relação à cultura de células, pois é um organismo multicelular que permite que a ação dos compostos seja avaliada de uma forma sistêmica, em um organismo. Além disso, o cultivo e os experimentos realizados com este organismo são muito mais baratos comparados com camundongos ou outro modelo mamífero. Isto se deve principalmente porque no caso do *C. elegans*, o requerimento de animais não é limitante, pois eles crescem rapidamente em um sistema simples e barato, onde podem ser gerados milhares de animais em alguns poucos dias. Além disso, o fato do seu genoma já ser conhecido e da disponibilidade de mutantes para a maioria dos seus genes, o *C. elegans*, permite que os mecanismos da resposta ao estresse oxidativo sejam facilmente investigados *in vivo*.

Devido a todas estas características, vários compostos que aumentam a longevidade e a resistência ao estresse oxidativo têm sido estudados neste organismo. Em especial atenção, dois estudos relataram o efeito de extratos ricos em polifenóis e antocianinas no *C. elegans* (WILSON *et al.*, 2006; PUN *et al.*, 2010). Extratos de mirtilo “blueberry” ricos em polifenóis (WILSON *et al.*, 2006) aumentaram o tempo médio de vida em 28% e o máximo em 14%. Além disso, o extrato de mirtilo aumentou a termotolerância do *C. elegans*, mas não a resistência ao estresse oxidativo. A análise indicou que os polifenóis do

extrato de mirtilo parecem atuar através de uma via de sinalização da proteína quinase dependente da Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII). Já foi demonstrado que Casca de Pinheiro, rico em antocianinas (CP) diminui os níveis de EROs em doses muito baixas e muito altas, mas aumenta a concentração de EROs em doses intermediárias. O maior decréscimo nos níveis de EROs foi observada a 5 e 10 CP lg / ml, que foram as mesmas doses, que provocaram significativo aumento do tempo de vida do organismo *C. elegans*.(PUN *et al.*, 2010)

O extrato de *Ginkgo biloba*, complexo rico glicosídeos e terpenóides (KAMPKÖTTER *et al.*, 2007), aumentou a resistência ao estresse oxidativo em 33% (WU *et al.*, 2002). O resveratrol, polifenol abundante nas cascas de uva (BASS *et al.*, 2007), prolongou o tempo de vida de uma maneira dose-dependente (VISWANATHAN, 2005). A quercetina, flavonóide abundante em plantas comestíveis, aumentou a resistência ao estresse oxidativo e o tempo de vida médio em 18% no *C. elegans* (PIETSCH *et al.*, 2009).

Tomando em consideração todas estas informações, o presente projeto teve como proposta estudar os efeitos do açai no organismo multicelular *C. elegans*. Além disso, foram investigados os possíveis mecanismos envolvidos na resposta aos estresses oxidativo e térmico e na longevidade dos animais tratados com açai.

CAPÍTULO 2

OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos antioxidantes e pró-longevidade do extrato de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) no organismo modelo *Caenorhabditis elegans*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar antocianinas de extratos obtidos da polpa de açaí liofilizado (AL);
- Avaliar os efeitos do tratamento com extrato de açaí liofilizado na sobrevivência do *C. elegans* em condições de estresse e em condições normais;
- Dosar marcadores bioquímicos de estresse oxidativo (catalase, grupos sulfidrilas totais, proteína carbonílica);
- Verificar o envolvimento de SKN-1 e DAF-16 na resposta antioxidante do *C. elegans* tratado com extrato de açaí.

CAPÍTULO 3

METODOLOGIA

3.1 CEPAS E LINHAGENS

As cepas utilizadas neste projeto foram obtidas através do *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), University of Minnesota, EUA (<http://www.cbs.umn.edu/cgc>) ou do Dr. T. Keith Blackwell do Joslin Diabetes Center, Boston, EUA. Foram utilizadas a cepa tipo selvagem N2 Bristol, as cepas mutantes de deleção “knockout” *sek-1(km4)*, e *daf-16(mgDf47)* e a cepa transgênica com gene repórter N2 *zIs356[DAF-16::GFP]*. Também foram usados animais “knockedown” para *skn-1* obtidos por RNA interferente (RNAi) (TULLET *et al.*, 2008).

A incorporação do RNA fita dupla (dsRNA) nos vermes é feita através de um sistema bacteriano. Para tal, um fragmento exônico do gene alvo é clonado no plasmídeo pL4440 (distribuído gratuitamente por Andrew Fire) que é específico para síntese de dsRNA por indução com IPTG (KAMATH *et al.*, 2001). Para o silenciamento de *skn-1*, o plasmídeo foi construído através da subclonagem de um fragmento obtido por PCR do cDNA de *skn-1* (WALKER *et al.*, 2001) do plasmídeo pPD129.36 (cedido gentilmente por Andrew. Fire). O plasmídeo pL4440 sem nenhum inserto foi usado como controle negativo do RNAi. O plasmídeo recombinante foi transformado em *E. coli* HT115 e a cultura foi então semeada em placas de petri com NGM contendo IPTG. Os vermes tipo selvagem no estágio larval 1 (L1) foram então cultivados nestas placas e utilizados nos experimentos após 48h a 20°C quando atingiram estágio L4. A confirmação da redução da expressão de *skn-1* foi feita deixando os mesmos animais descritos acima atingirem a fase adulta. Na ausência de *skn-1* os embriões colocados por eles não eclodem.

3.2 CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DO *C. ELEGANS*

As cepas foram mantidas congeladas até o momento de uso. O congelamento foi transferindo animais L1 para uma solução 1:1 de M9 (22 mM KH₂PO₄; 42 mM Na₂HPO₄; 85,5 mM NaCl; 1 mM MgSO₄) e solução de congelamento (50 mM Tampão Fosfato; 100 mM NaCl; 30% de glicerina). Alíquotas desta mistura foram transferidas para tubos de 1,5 mL e colocadas no freezer -80°C. Quando necessário, as cepas utilizadas foram

descongeladas e transferidas para o meio NGM (Nematode Growth Medium) (BRENNER, 1974) semeadas com *E. coli* OP50 como alimento e incubada a 20°C, o que permitiu o desenvolvimento normal do ciclo de vida. A manutenção das cepas foi feita transferindo animais em diferentes estágios para novas placas à medida que a camada de bactéria ficava escassa.

3.3 SINCRONIZAÇÃO CRONOLÓGICA DO *C. ELEGANS*

Para os experimentos de resistência ao estresse oxidativo, térmico e longevidade, os animais tiveram sua idade sincronizada. A sincronização para a todas as cepas foi feita através da lise alcalina. Este método baseia-se no tratamento de hermafroditas adultos grávidos com solução de lise (50% de hipoclorito de sódio; 2,5 mM NaOH). Os embriões resistentes a este tratamento foram coletados e colocados em meio líquido M9 de um dia para o outro na ausência de alimento. Isto permite que os embriões eclodam, mas permaneçam estacionários em L1. Os animais L1 foram então transferidos para placas NGM semeadas com *E. coli* OP50 por 48h a 20°C, tempo necessário para o *C. elegans* chegar a L4.

3.4 EXTRATOS DE AÇAÍ

Neste projeto foram utilizados extratos de açaí. Esses extratos consistem em um pó liofilizado que foi gentilmente cedido pela empresa Liotécnica Alimentos LTDA (Embu, SP), sendo o açaí liofilizado (AL-1) código 120.044.032 e o açaí liofilizado (AL-2) código 120.044.022. Este pó liofilizado foi usado para preparar o extrato de açaí AL através da sua diluição em solução basal para 100 mg/ml como descrito posteriormente no item 3.6.1.Preparação das Placas NGM Contendo Extrato de Açaí

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS

O conteúdo de antocianinas dos extratos utilizados foi quantificado através do método do pH diferencial (COHEN *et al.*, 2006, adaptação de GIUSTI & WROSLTAD, 2001), sendo a concentração de antocianinas monoméricas calculada e representada como concentração de cianidina-3-glicosídeo, antocianina que, juntamente com a cianidina-3-rutinosídeo, é encontrada em maior abundância no açaí (DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2004; SCHAUSS *et al.*, 2006).

Foram preparadas duas soluções tampão: cloreto de potássio – ácido clorídrico pH 1,0 (0,025 M) e acetato de sódio pH 4,5 (0,4 M). O extrato liofilizado passou por uma prévia etapa de extração em água destilada. As amostras foram diluídas nas soluções tampão até fator de diluição igual a 20 de forma que a densidade óptica não ultrapassasse o máximo de 1.200 nm. As medidas de absorbâncias foram efetivadas em máximo de absorção na região visível 510 nm e em 700 nm, sendo utilizada água destilada como branco.

A diferença de absorbância foi calculada de acordo com a fórmula 1:

$$A = (A_{\lambda_{\text{máz_vis}}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{\lambda_{\text{máz_vis}}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5}$$

A concentração de antocianinas monoméricas foi calculada de acordo com a fórmula 2:

$$AM = \frac{A \times PM \times FD \times 10^2}{\epsilon \times L}$$

onde **AM** representa a concentração de antocianinas monoméricas (mg.100g⁻¹); **A** representa a diferença de absorbância calculada pela fórmula 1; **PM**, o peso molecular da cianidina-3-glicosídeo (449,2); **FD**, o fator de diluição da amostra nas soluções tampão; **ε** a absortividade molar da cianidina-3-glicosídeo (26900); e **L** representa o caminho óptico (1,0cm).

3.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.6.1 Preparação das Placas NGM Contendo Extrato de Açaí

Para o tratamento com o extrato AL-1 e AL-2, 2 gramas de açaí foram ressuspensos com 20ml de solução basal, esterilizado por filtração, obtendo-se 5ml de extrato líquido, e então acrescido de 50µl de solução estéril de 10mM MgSO₄. Essas misturas foram utilizadas para ressuspender o pellet de 1ml de *E. coli* OP50 com OD 1 que foi então semeado em placas contendo meio NGM. Para as placas de controle do tratamento, foi utilizada apenas 1ml de *E. coli* OP50 com OD 1, ressuspensa em quantidade proporcional de solução basal e MgSO₄. Em caso das placas não serem usadas imediatamente, elas foram mantidas a 4°C por no máximo 1 semana.

3.6.2 Ensaio de Resistência ao Estresse Oxidativo

Para o tratamento, larvas L1 sincronizadas foram colocadas em placas contendo ou não açaí e deixadas crescer por 48h a 20°C até o estágio L4. Para testar se o tratamento com açaí promove um aumento na resistência ao estresse oxidativo, os animais tratados ou não com açaí foram transferidos para solução de M9 contendo 5 e 7,5mM de tert-butil hidroperóxido (t-BOOH), um análogo do peróxido de hidrogênio mais estável em meio líquido. Cada experimento foi realizado em placas de 24 poços, onde 50 animais por grupo foram colocados em 5 poços com 10 animais por poço. A viabilidade dos animais foi analisada após 6, 9, 12 e 15 horas usando uma lupa estereoscópica para contar o número de animais mortos, que são determinados pela ausência de batimento faríngeo e de movimento quando provocados com uma alça de fio de platina (LITHGOW *et al.*, 1995).

3.6.3 Ensaio de Resistência ao Estresse Térmico

Para testar a resistência ao estresse térmico, vermes com idade sincronizada foram mantidos em placas de NGM com ou sem extrato de açaí até o quinto dia de vida adulta. Em seguida, cerca de 60 animais de cada grupo foram transferidos para três novas placas contendo 20 animais em cada e mantidos a 35°C. A sobrevivência foi verificada em 6, 9 e

12 horas, usando lupa estereoscópica. Animais que morreram por dissecação nas laterais das placas foram desconsiderados nas contagens.

3.6.4 Ensaio de Longevidade

Para os ensaios de longevidade as placas de NGM foram preparadas com 10 mM FUdR (5-Fluoro-2'-deoxyuridine). FUdR é normalmente fosforilado nas células em fluorodeoxiuridilato, um inibidor competitivo da enzima timidilato sintetase que converte deoxiuridilato em timidilato. Desta forma a replicação do DNA é rapidamente interrompida uma vez que esta é a única via de síntese de timidilato nas células. Após atingirem a fase adulta, as únicas células a se duplicarem no *C. elegans* são as germinativas. Assim, animais adultos mantidos em placas contendo FUdR não produzem nenhuma progênie e quaisquer embriões produzidos nesta condição não se desenvolvem. Após a solidificação das placas NGM acrescidas de FUdR, estas foram semeadas com *E. coli* OP50 com ou sem extrato de açaí como descrito anteriormente.

Os ensaios de longevidade foram iniciados com 60 animais por grupo com idade sincronizada no estágio larval L4. Estes são cultivados por todo seu tempo de vida em placas NGM com FUdR com ou sem extrato de açaí a 25°C. Os 60 animais são divididos em 3 placas contendo 20 animais em cada. A sobrevivência dos vermes foi verificada diariamente. Os dados foram submetidos no programa estatístico GraphPad Prisma versão 5 para construção dos gráficos de sobrevivência e cálculo de valores p (Log-Rank) (TULLET *et al.*, 2008).

3.7 DOSAGEM DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Além da análise da resistência ao estresse também foi verificada a capacidade antioxidante dos *C. elegans* tratados e não tratados com extrato de açaí através da medida dos níveis de proteína carbonilada, grupo sulfidrilas totais e da atividade da enzima catalase. As medidas de catalase e sulfidrilas totais foram feitas a partir de uma cultura de 5.000 animais e de proteína carbonilada de uma cultura de 10.000 vermes, todos

sincronizados em estágio L4. Após a lise e trituração dos animais, o extrato foi submetido às análises citadas acima. Estes experimentos foram repetidos pelo menos 2 vezes.

3.7.1 Dosagem dos Níveis Totais de Grupos de Sulfidrilas

Foi utilizado o método de Ellman para a execução destas técnicas (SEDLAK & LINDSAY, 1968). Este método baseia-se na reação de grupos tióis com o ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitro-benzóico (DTNB) formando um ânion amarelo do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico que é medido espectrofotometricamente a 412nm.

Para cada 120µL de amostra, foi adicionado 720µL de metanol, 150µL de Tris-HCl, pH8,2, 50µL de DTNB (ácido 6,5 ditiobis 2-nitrobezóico). Esta mistura foi centrifugada a 10.000g durante 15 minutos à temperatura ambiente. As absorvâncias das amostras foram lidas em 412nm, a 25°C. A concentração de sulfidrila foi feita através da regressão linear usando cisteína como padrão. Todas as concentrações foram obtidas em µmol/proteína.

3.7.2 Dosagem da Atividade da Catalase

Determinação da atividade da enzima catalase, foi realizada baseada na sua capacidade de converter o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por Aebi, (1984). 5000 animais L4 foram homogeneizados com 0,5mL de 100mM tampão fosfato pH 7,2 e em seguida centrifugado por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. Em um tubo de polipropileno colocaram-se 50µL de 100mM tampão fosfato pH 7,2 e 40µL de água destilada. Em seguida foi adicionado 100µL da amostra e 810µL de 10mM H₂O₂. As absorvâncias das amostras foram lidas a 240nm a cada minuto, durante cinco minutos. 1U de catalase é equivalente a hidrólise de 1 µmol de H₂O₂ ($\epsilon = 39,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) por minuto (AEBI, 1984). Usualmente a atividade dessa enzima é representada em Unidade por mL de amostra. Calculamos a atividade da catalase segundo a lei de Lambert Beer. A absorvância utilizada nessa expressão é o delta obtido das cinco absorvâncias lidas (absorvância final – absorvância inicial / 4).

3.7.3 Dosagem dos Níveis de Proteína Carbonilada

A oxidação de proteína por ERO leva à formação de derivados carbonilados. Estes podem ser mensurados por métodos sensíveis, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP). O DNP reage com grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser analisada espectrofotometricamente. A determinação da concentração sérica de proteína carbonilada foi realizada conforme descrito por Levine et al. (1994). 10000 animais sincronizados em L4 foram homogeneizados com 0,5mL de 50 mM tampão fosfato pH 6,7 contendo 1mM EDTA. Em seguida centrifugado a 10000g, por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. Para cada amostra utilizou-se dois tubos de polipropileno, um foi denominado de Amostra (A) e outro de Controle (C). Transferiu-se 400µL de homogeneizado para todos os tubo (amostra (A) / controle (C)). Em seguida foi adicionado aos tubos 400µL de TCA 10% e misturado no vórtex, logo após, foram centrifugados (tubo A e C) à 5000g por 10 minutos a 4°C. O próximo passo foi adicionar ao tubo A 500µL de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) e no tubo C 500µL de 2,5M HCL. Ambos foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por um período de 30 minutos, e a cada 15 minutos eram misturados no vórtex. Em seguida foram adicionados 500µL de 10% ácido tricloroacético (TCA) em cada tubo, misturado no vórtex e centrifugados à 5000g por 10 minutos a 4°C. Depois de centrifugados, o sobrenadante dos tubos foi descartado e 1mL de mistura de etanol com acetato de etila (1:1) foi adicionado aos tubos e misturados no vórtex. Uma nova centrifugação foi realizada. Em seguida o sobrenadante dos tubos A e C foram descartados e à estes foram adicionados mais 1mL da mistura etanol e acetato de etila, foram misturados no vórtex e novamente centrifugados. No final das centrifugações, o sobrenadante dos tubos A e C foram novamente descartados e adicionado em ambos 1mL de 6% SDS, misturados no vórtex e centrifugados à 10000g por 10 minutos a 4°C. Finalmente o sobrenadante dos tubos foram retirados e transferidos para cubeta, onde foram lidos no espectrofotômetro a 370nm. A concentração de proteína carbonilada foi determinada utilizando a equação: $A = C.b.\varepsilon$, onde A é a subtração da absorbância do tubo A (amostra) pela absorbância do tubo C (controle), C é a concentração, b é o caminho óptico e ε é o coeficiente de extinção molar. O conteúdo de proteína carbonilada foi calculado usando o coeficiente de extinção molar de 22 000 M⁻¹ cm⁻¹ e expresso por nmol

de proteína carbonilada formada por mg de proteína. Para se obter a concentração de proteína carbonilada em relação à concentração de proteínas totais este parâmetro foi determinado pelo método de Lowry (descrito a seguir).

3.7.4 Dosagem de Proteínas Totais

Este método foi descrito a primeira vez por Lowry *et al.* (1951). É baseado nas ligações das proteínas, que em meio alcalino, com os íons cobre (Cu^{2+}) formam uma cor azul que é dependente em partes, do índice de tirosina e triptofano da amostra, já que os íons cobre catalisam a oxidação de aminoácidos aromáticos.

Em um tubo de polipropileno, foram pipetados 100 μL de amostra ou o padrão de albumina. O branco, usado para zerar o espectrofotômetro, foi feito apenas com 100 μL de água destilada. Posteriormente foi adicionado 1mL do reagente C em todos os tubos. A mistura foi levada ao vórtex e mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado em cada tubo, 100 μL do reagente D. O volume foi misturado e incubado a temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 660nm.

Para o cálculo de proteínas totais foi feito um gráfico expressando a concentração do padrão de albumina (Eixo Y) X absorbância do padrão de albumina (Eixo X). Após regressão linear, foi determinada a equação da reta com a seguinte característica: Concentração = a X Absorbância + b. Esta equação foi utilizada para determinar a concentração de proteínas totais nos homogenatos de *C. elegans*. Todas as concentrações foram obtidas em mg/mL.

Os reagentes utilizados e forma de preparo estão descritos a seguir. Reagente A: Foi dissolvido 0,25g de sulfato de cobre e 0,5 de citrato de sódio em 100mL de água destilada. Reagente B: Foi dissolvido 5g de carbonato de sódio e 1g de hidróxido de sódio em 250mL de água destilada. Reagente C: Foi adicionado 1mL do reagente A em 50mL do reagente B. Reagente D: Foi dissolvido 1mL de Folin-Ciocalteu em 1mL de água destilada.

3.8 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE *DAF-16*

Para investigar se o extrato de açaí ativa a localização nuclear dos fatores de transcrição *DAF-16*, foram utilizadas as cepas transgênicas N2 *zIs356[DAF-16::GFP]* e TJ356, contendo os genes repórteres *daf-16::gfp* (AN *et al.*, 2003; HENDERSON & JOHNSON, 2001). A seleção dos animais transgênicos *daf-16::gfp* foi feita através da presença marcador *rol-6*, um gene defectivo do colágeno que provoca nos animais portadores o fenótipo de se arrastem em círculos ao invés de se arrastarem de maneira sinuosa. A cepa N2 *zIs356[DAF-16::GFP]* é uma linhagem também integrada de um plasmídeo contendo uma fusão traducional da sequência genômica do promotor e do gene *DAF-16* com o gene *GFP* (HENDERSON & JOHNSON, 2001). Esta linhagem transgênica codifica a isoforma *DAF-16a2* que é expressa na maioria das células do corpo do *C. elegans*, com exceção das células da faringe (HENDERSON & JOHNSON, 2001).

Após o tratamento com extrato açaí, os animais transgênicos nos estágio de L2 a L4 foram colocados em lâminas contendo uma fina camada de 2% de agarose, imobilizados com 2% de azida sódica e cobertos com uma lamínula. A localização subcelular dos genes repórteres foi analisada através de um microscópio de fluorescência Leika TM5000, disponível no Núcleo de Pesquisa Básica (NUPEB) da UFOP, usando aumento ocular de 10 vezes e filtro para excitação de 365nm. A localização foi classificada como citossólica, intermediária e nuclear de acordo com a localização predominante do GFP. Baixa indução corresponde à ausência de localização nuclear. Indução média corresponde à concentração de localização nuclear na região anterior e/ou posterior do intestino. Indução alta corresponde à localização nuclear através de todo o intestino.



FIGURA 3 Esquema dos genes repórter para *DAF-16*

Linha sólida representa DNA genômico, caixa de cor azul representa região não traduzida, caixa vermelha representa região codificantes e caixa verde representa região codificante para proteína fluorescente verde (GFP). Fonte Esquema: Adaptado de (HENDERSON & JOHNSON, 2001).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os ensaios de resistência ao estresse oxidativo e térmico e para as quantificações de marcadores bioquímicos, as análises estatísticas foram realizadas através do teste t de Student's sendo que $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As curvas de sobrevivência Kaplan-Meier foram criadas usando o software GraphPad Prisma versão 5 e o valor de p foi calculado através do Log-Rank test.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 QUANTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS

O açaí é um fruto muito utilizado na indústria alimentícia de diferentes maneiras, seja na forma de polpa congelada ou até mesmo o produto liofilizado. A primeira pergunta feita neste trabalho foi de verificar o conteúdo de antocianinas monoméricas presentes nestes tipos das amostras de açaí (Tabela 1). A quantificação das antocianinas foi realizada em dois extratos liofilizados da Liotécnica Alimentos, AL-1 código 120.044.032 e AL-2 código 120.044.022

A dosagem das antocianinas monoméricas na amostra AL-1 foi feita duas vezes com um ano de diferença entre elas (05/03/2010 e 10/04/2011). Os resultados obtidos foram muito próximos (15,8 e 14,5 mg/100g) indicando que a quantidade de antocianinas não foram perdidas com tempo.

TABELA 1 - Conteúdo de antocianinas monoméricas, representado como conteúdo de cianidina-3-glicosídeo (mg/100 g)

AMOSTRAS	LIOFILIZADO
AL-1 (05/03/2010)	15,8
AL-1 (10/04/2011)	14,6
AL-2 (06/05/2011)	34,7

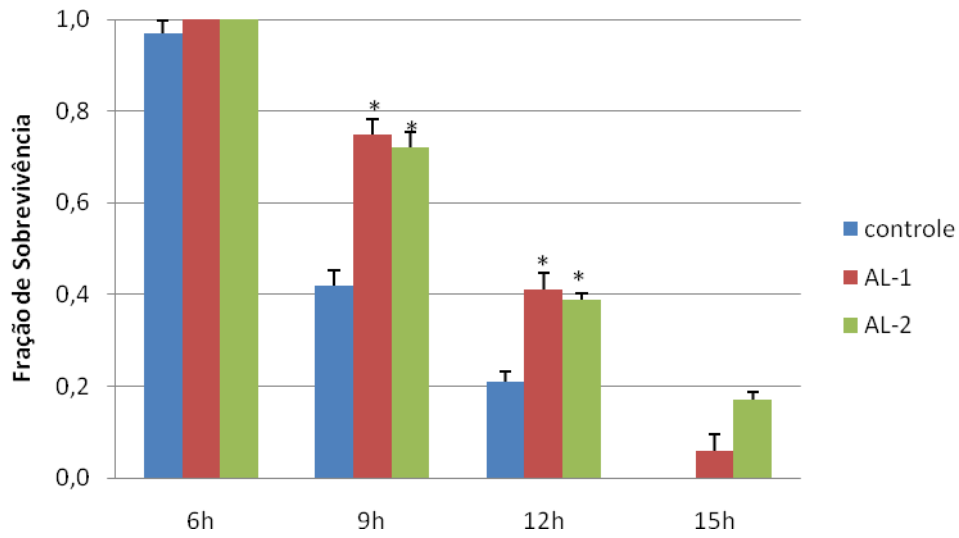
4.2 ANÁLISE DA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO DOS ANIMAIS TRATADOS COM DIFERENTES EXTRATOS DE AÇAÍ

Tendo em vista que os extratos AL-1 e AL-2 apresentaram antocianinas monoméricas, foi investigado em seguida se animais tipo selvagem tratados com os extratos apresentariam um aumento da resistência ao estresse oxidativo.

Para isso estes foram mantidos por 48 horas (de L1 a L4) em 100 ou 200mg/ml de AL-1 e AL-2 e posteriormente foi verificada a sobrevivência deles quando incubados com 5 e 7,5 mM de t-BOOH. Os animais tratados com 200mg/ml não se desenvolveram até L4 e ficaram estacionados no estágio L1, indicando que esta concentração de extrato de açaí é tóxica. O mesmo não foi observado com os animais tratados com 100 mg/ml sendo que eles chegaram ao estágio L4 em 48h como esperado para animais tipo selvagem mantidos a 20°C. Portanto, todos os experimentos feitos a partir deste ponto foram feitos usando apenas a concentração de 100mg/ml de extrato.

O Gráfico 1 mostra a fração de sobreviventes em diferentes tempos dos animais tratados com 100 mg/ml de AL-1 ou AL-2. Foi observado que a sobrevivência dos animais tratados com AL-1 e AL-2 foram significativamente maior ($p \leq 0,05$) após 9 e 12 horas em 5 mM de t-BOOH (Gráfico 1A). Já a fração de animais tratados com AL-1 e AL-2 em 7 mM não apresentaram aumento da resistência ao estresse (Gráfico 1B)

A



B.

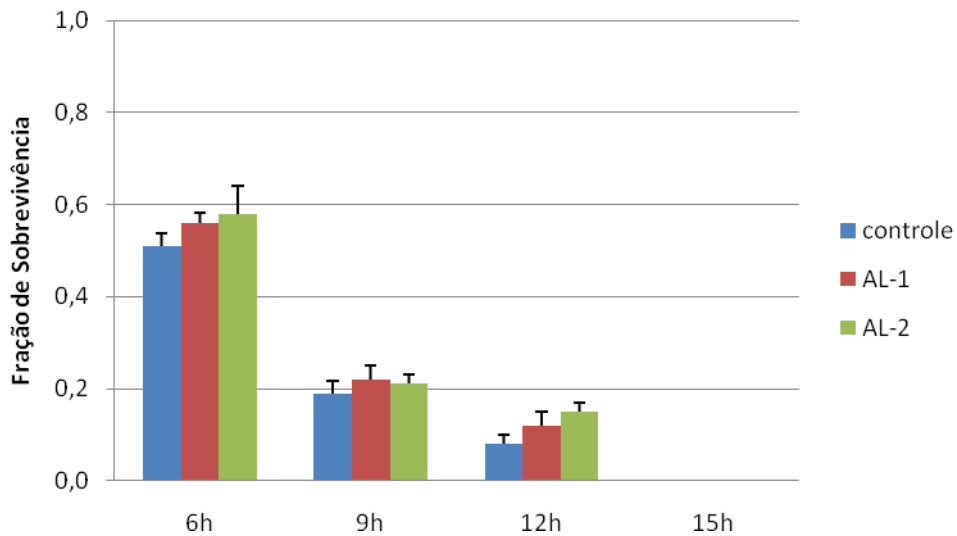


GRÁFICO 1 – Efeito do tratamento com 100 mg/ml de AL na sobrevivência do *C. elegans* em condições de estresse oxidativo. A sobrevivência dos animais em (A) 5mM e (B) 7,5mM de t-BOOH foram verificadas em tempos determinados. O gráfico acima representa a média de três experimentos. A barra de erro representa o SEM. O símbolo * indica resultado significativo $p \leq 0,05$ através do teste de Student sobreviveram em 7,5 mM não foi significativamente maior em relação aos animais não tratados (Gráfico 1B).

4.3 ANÁLISE DA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE TÉRMICO DOS ANIMAIS TRATADOS COM AL-1

As propriedades antioxidantes do AL também foram avaliadas através de um ensaio de resistência ao estresse térmico. Para avaliar a sobrevivência em condições de estresse térmico, os animais foram tratados com 100 mg/mL de AL-1 desde o estágio L1 até o quinto dia de vida adulta, ou seja por 168 horas. No 5º dia de vida adulta, os animais já terminaram a maior parte da ovoposição e com isto eles eram menos ágeis para escapar da placa nas condições de estresse. Após este período os animais foram submetidos ao estresse térmico por elevação de sua temperatura de cultivo de 20°C para 35°C e as sobrevivências dos animais foi verificada 6, 9 e 12 horas após o início do estresse. O Gráfico 2 mostra que o tratamento com 100 mg/mL de AL-1 não foi capaz de aumentar a resistência ao estresse térmico dos animais tipo selvagem em nenhum dos tempos analisados.

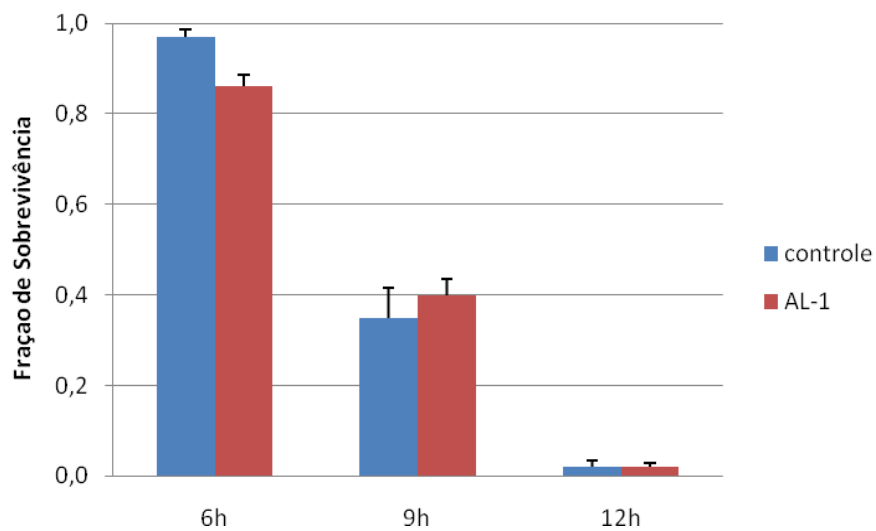


GRÁFICO 2– Efeitos tratamento com açai na sobrevivência do *C. elegans* em condições de estresse térmico. A sobrevivência dos animais em foram verificadas em tempos determinados a uma temperatura 35°C. O gráfico acima representa a média de três experimentos.

4.4 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA EM CONDIÇÕES NORMAIS DOS ANIMAIS TRATADOS COM AL-1

O terceiro ensaio biológico usado para avaliar a capacidade antioxidante do AL *in vivo* foi a análise da longevidade dos animais em condições normais. Neste experimento, os animais tipo selvagem foram tratados desde L1 por todo o seu tempo de vida com 100 mg/mL de AL-1 a 25°C e o número de animais vivos foram contados diariamente.

O Gráfico 3 e Tabela 2 mostram os resultados obtidos de um experimento de longevidade realizado a 25°C. Pode-se observar tanto no gráfico como na tabela, que o tratamento com AL-1 não aumentou nem o tempo de vida médio e o nem máximo dos animais tipo selvagem. A 25°C, o tempo de vida médio foi de 14 dias para os animais do grupo controle e 15 dias para o grupo tratado sendo esta diferença não significativa. O tempo de vida máximo foi de 20 dias a 25°C tanto para o grupo controle quanto para o grupo tratado (Tabela 2).

4.5 ANÁLISE DE MARCADORES BIOQUÍMICOS E ENZIMÁTICOS NOS ANIMAIS TRATADOS COM AL-1

Uma vez que o tratamento com AL foi capaz de aumentar a resistência ao estresse oxidativo no *C.elegans*, o próximo passo foi verificar se tratamento também estava associado a uma melhora do status antioxidante *in vivo* no *C. elegans*. Para isso foi dosada a grupos sulfidrilas totais atividade da catalase como marcadores antioxidante e os níveis de proteína carbonilada como marcador de estresse.

Os resultados apresentados no Gráfico 4 mostram que não existe uma diferença significativa entre animais controle e tratados com AL-1 em nenhum dos parâmetros dosados. Devido à variação entre experimentos, os resultados foram apresentados na forma de níveis relativos onde em cada experimento, o valor obtido para o grupo controle foi considerado como 1 e o valor obtido para o grupo tratamento foi convertido por razão. Após esta conversão foi obtida a média dos níveis relativos das triplicatas experimentais (Tabela 3).

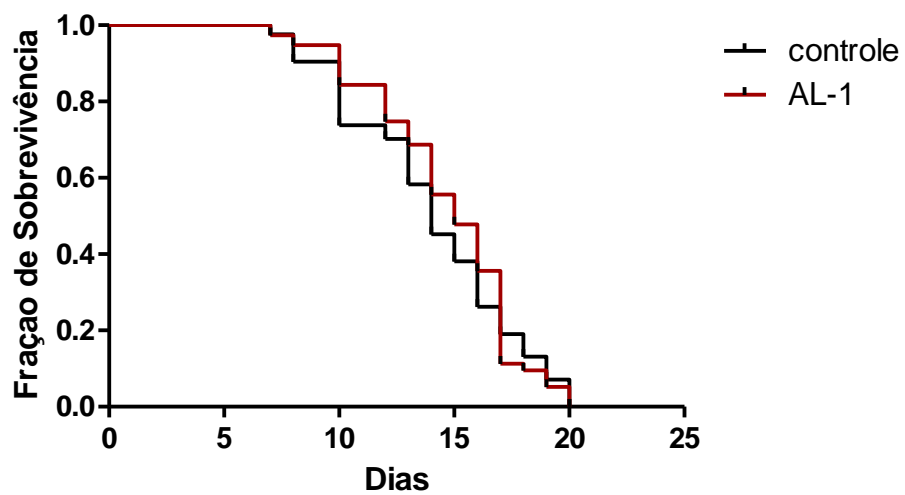


GRÁFICO 3– Efeitos do tratamento com 100 mg/ml de AL-1 na sobrevivência do *C. elegans*. A sobrevivência dos animais foi verificada diariamente. As curvas de sobrevivência Kaplan-Meier foram criadas usando o GraphPad Prism versão 5. O gráfico acima representa a média de dois experimentos.

TABELA 2 – Análise da longevidade dos animais tipo selvagem tratados com AL-1 a 25°C

	Tempo de vida médio (dias)	Tempo de vida máximo (dias)	Valor p^a	n^b
Experimento 1				
N2 Controle	12	20		101/80
N2 AL-1	13	20	0.003	101/60
Experimento 2				
N2 Controle	16	20	0.03	78/53
N2 AL-1	17	20		78/57
Combinação dos Experimentos 1 e 2				
N2 Controle	14	20		126/84
N2 AL-1	15	20	0,5003	126/115

^a valor p calculado por Log-rank (Mantel-Cox) Test em relação ao controle

^b n representa o número total de animais que morrem por envelhecimento normal contra aqueles no total dos experimentos

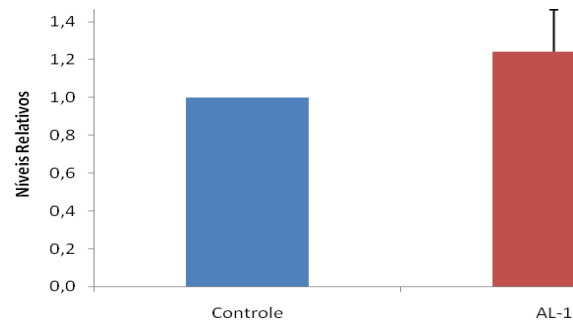
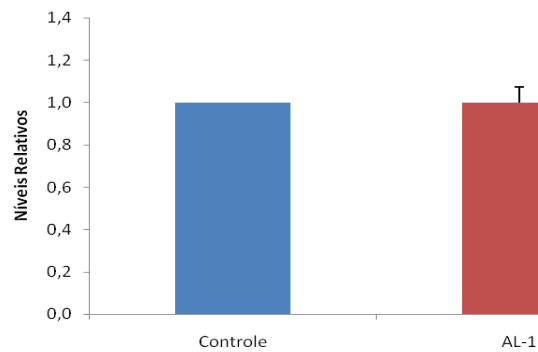
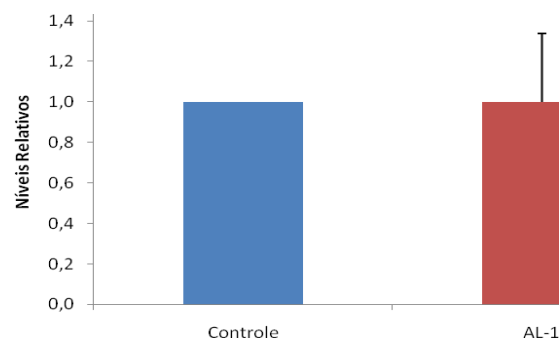
A**Catalase****Grupos Sulfidrilas Totais****B****C****Proteínas Carbonilada**

GRÁFICO 4 - Dosagem dos marcadores bioquímicos e enzimáticos no *C. elegans* tratado com açaí. Os animais tipo selvagem foram tratados por 48 horas com 100 mg/mL de AL-1 ou com solução controle. Os gráficos acima representam a média de dois experimentos para catalase (A) e média de três experimentos para grupos sulfidrilas totais (B) e proteína carbonilada (C).

TABELA 3 - Efeito do tratamento com AL-1 sobre a atividade de catalase e os níveis dos grupos sulfidrilas totais e proteína carbonilada

Marcador	Controle	100 mg/ml AL-1	Níveis relativos em relação ao controle
Catalase (U/mg de Proteína)			
Experimento 1	36,88	51,51	1,40
Experimento 2	7,02	7,61	1,08
Grupos SH ($\mu\text{mol/mg}$ de Proteína)^a			
Experimento 1	330189,13	243072,48	-1,36
Experimento 2	151612,99	112088,62	-1,35
Experimento 3	138109,99	91278,13	-1,51
Proteína Carbonilada			
Experimento 1	25,72	19,22	-1,34
Experimento 2	24,76	15,34	-1,61
Experimento 3	14,15	7,05	-2,01

^a Sulfidrilas Totais

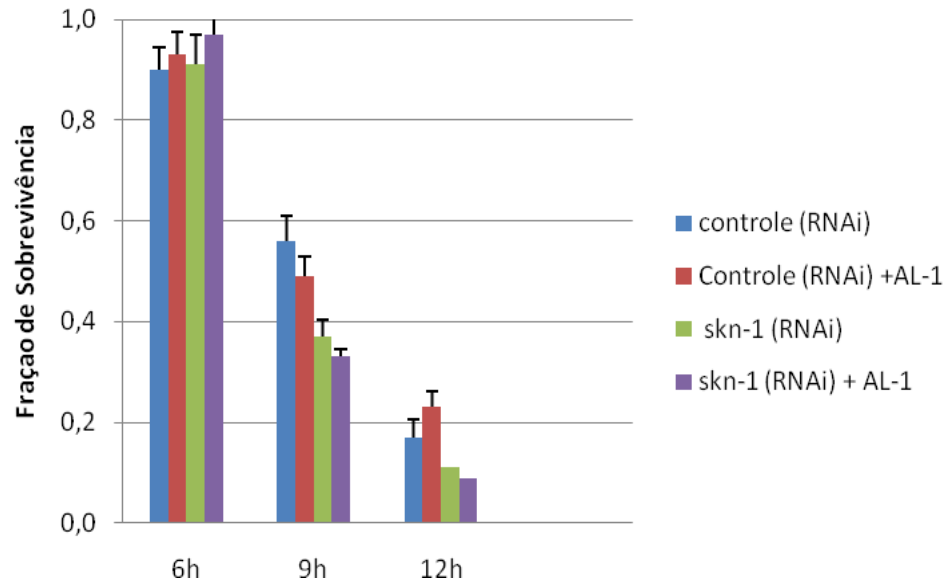
4.6 ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE SKN-1/P38MAPK NO AUMENTO DA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO PROMOVIDO PELO AL-1

As vias de sinalização celulares para genes que afetam a resistência ao estresse oxidativo são conservadas entre *C. elegans* e humanos. O aumento da resistência ao estresse oxidativo no *C. elegans* promovido pelo tratamento com 100 mg/mL de AL-1 oferece uma oportunidade de usar o poderoso sistema genético do *C. elegans* para testar o mecanismo de ação do açáí.

4.6.1 Análise da Resistência ao Estresse Oxidativo nos Animais *skn-1(RNAi)*

Assim, o próximo passo foi verificar se o aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido pelo tratamento com AL-1 depende da ativação do fator de transcrição SKN-1. Para tal, os ensaios de resistência ao estresse oxidativo foram repetidos usando mutantes com expressão reduzida para SKN-1 (knockdown) obtidos através do silenciamento gênico (RNAi). Após 48 horas de tratamento com AL-1 os animais foram transferidos para solução com 5 e 7,5 mM de t-BOOH e a sobrevivência foi analisada em horários pré estabelecidos. Os animais *controle(RNAi)* tratados com AL-1 não apresentaram um aumento da resistência ao estresse oxidativo estatisticamente significativo em relação aos animais *controle(RNAi)* não tratados (Gráfico 6). Portanto não foi possível concluir neste caso se SKN-1 está envolvido no aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido pelo tratamento com AL-1.

A



B

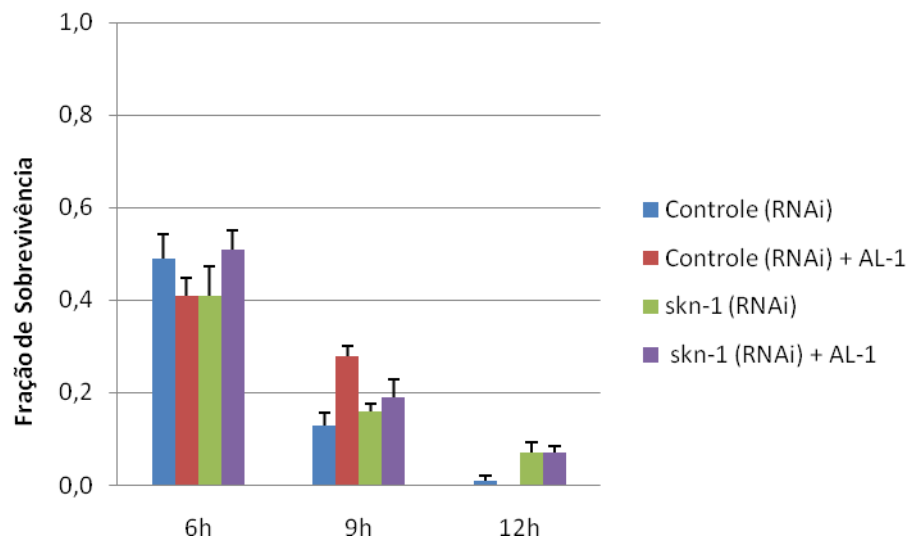


GRÁFICO 5 - Efeito do tratamento com 100 mg/ml de AL-1 na sobrevivência de animais *skn-1(RNAi)* em condições de estresse oxidativo. A sobrevivência dos animais em (A) 5mM e (B) 7,5mM de t-BOOH foram verificadas em tempos determinados. O gráfico acima representa a média de três experimentos. A barra de erro representa o SEM.

4.6.2 Análise da Resistência ao Estresse Oxidativo em mutantes *sek-1*

Em condições de estresse oxidativo, a ativação e localização nuclear de SKN-1 dependem da via p38 MAPK (INOUE *et al.*, 2005). SEK-1, a MAPK quinase que fosforila PMK-1, o ortólogo da p38 de mamíferos, é necessário para que SKN-1 acumule-se no núcleo das células intestinais. Para verificar se o aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido pelo tratamento com AL-1 também depende da via p38 MAPK, os ensaios foram repetidos usando mutantes de deleção *sek-1(km4)*.

Observa-se no Gráfico 6 que mutantes *sek-1* tratados com AL-1 não apresentam uma maior resistência ao t-BOOH como os animais tipo selvagem. Ou seja, na ausência de SEK-1 os animais perderam o aumento da resistência ao estresse oxidativo promovida pelo tratamento com açai. Estes resultados apresentados acima sugerem que a via de sinalização p38 MAPK está envolvida no aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido por AL-1.

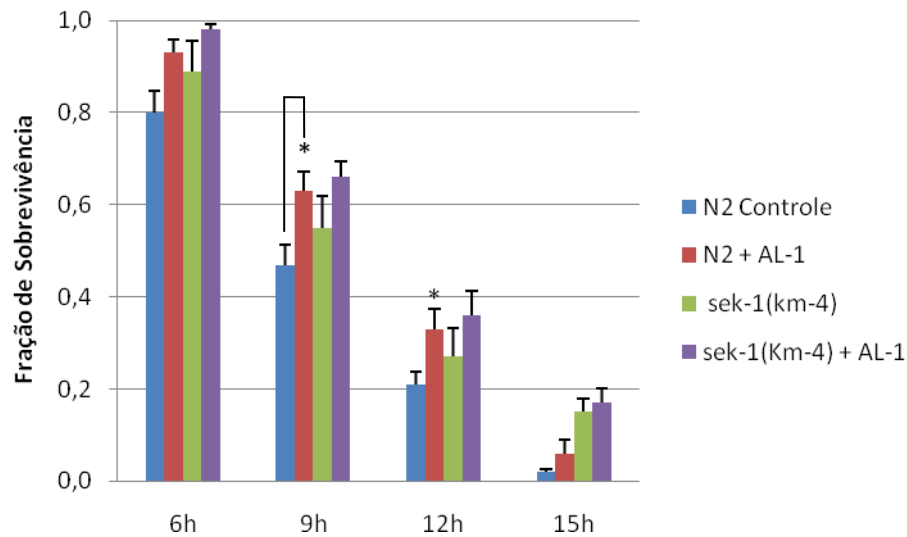
4.8 ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE DAF-16/FOXO NO AUMENTO DA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO PROMOVIDO PELO AL-1

4.7.1 Análise da resistência ao estresse oxidativo em mutantes *daf-16*

Para verificar se o aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido pelo tratamento com AL-1 também depende da ativação do fator de transcrição DAF-16 os ensaios de resistência ao estresse oxidativo foram repetidos usando mutantes de deleção *daf-16(mgDf47)*. Após 48 horas de tratamento com 100 mg/mL de AL-1 os animais foram transferidos para solução com 5 e 7,5mM de t-BOOH e a sobrevivência foi analisada após 6, 9, 12 e 15 horas.

O resultado apresentado no Gráfico 7 mostra que os mutantes *daf-16* tratados com AL-1 não apresentaram um aumento da resistência ao estresse oxidativo como os animais tratados tipo selvagens tiveram. Este resultado sugere que o aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido por AL-1 também depende de DAF-16.

A



B

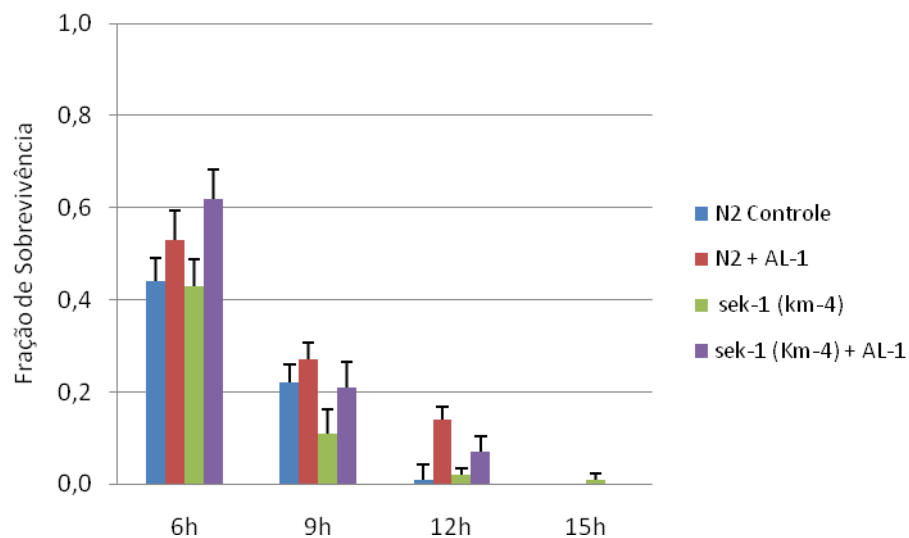
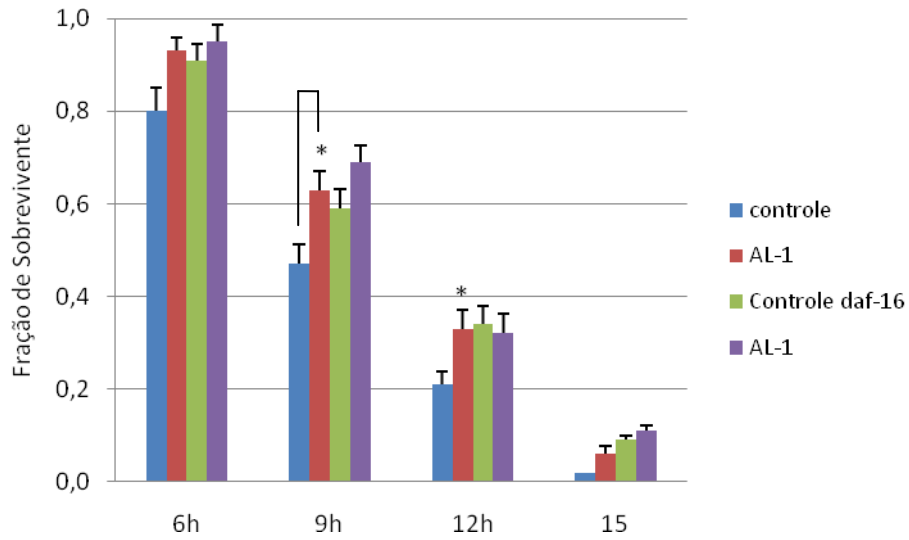


GRÁFICO 6 - Efeito do tratamento com 100 mg/ml de AL-1 na sobrevivência de mutantes *sek-1* em condições de estresse oxidativo. A sobrevivência dos animais em (A) 5mM e (B) 7,5mM de t-BOOH foram verificadas em tempos determinados. O gráfico acima representa a média de três experimentos. A barra de erro representa o SEM. O símbolo * indica resultado significativo $p \leq 0,05$ através do teste t de Student's.

A



B

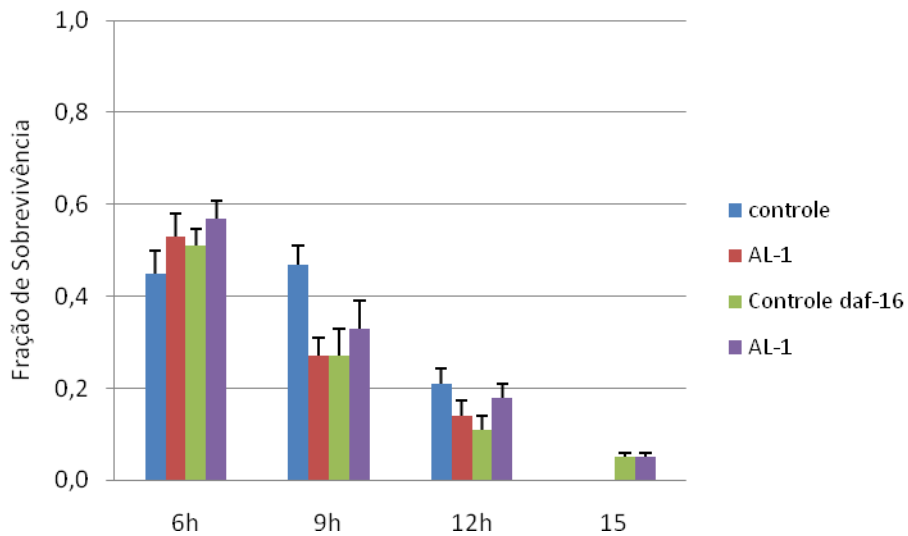


GRÁFICO 7 - Efeito do tratamento com 100 mg/ml de AL-1 na sobrevivência de mutantes *daf-16* em condições de estresse oxidativo. A sobrevivência dos animais em (A) 5mM e (B) 7,5mM de t-BOOH foram verificadas em tempos determinados. O gráfico acima representa a média de três experimentos. A barra de erro representa o SEM. O símbolo * indica resultado significativo $p \leq 0,05$ através do teste t de Student's.

4.7.2 Análise da Localização DAF-16:: GFP

O envolvimento de DAF-16 no aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido por AL-1 também foi avaliado através da ativação da sua localização nuclear. A localização subcelular de DAF-16 foi realizada utilizando linhagem transgênica contendo uma fusão traducional do gene *DAF-16::GFP* (HENDERSON; JOHNSON, 2001). Em condições normais, DAF-16::GFP se encontra no citoplasma de quase todas as células do corpo do *C. elegans*. Em resposta aos vários agente estressores, DAF-16::GFP acumula-se no núcleo destas células (LANDIS;MURPHY,2010).

O tratamento dos animais transgênicos com AL-1 por 48 horas não foi capaz de induzir a localização nuclear de *DAF-16::GFP* (Figura 4).

Os resultados relacionados à sobrevivência de mutantes em condições de estresse acima sugerem que AL-1 aumenta a resistência ao estresse oxidativo de uma maneira SKN/p38 MAPK e DAF-16 dependente. No entanto as análises de genes repórteres realizadas não evidenciaram essa localização.

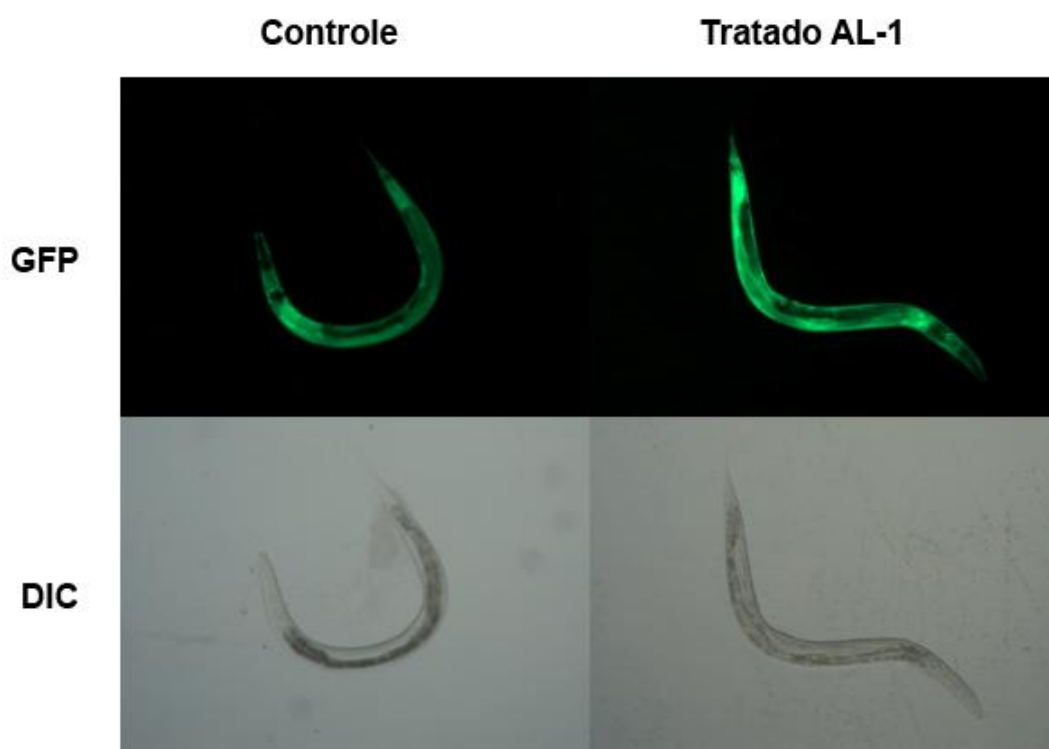


FIGURA 4 - Localização subcelular de *DAF-16::GFP* em animais tipo selvagem tratados com AL-1. GFP, proteína fluorescente verde; DIC, contraste de interferência diferencial.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO EXTRATO DE AÇAÍ

A flora brasileira é rica em espécies com princípios ativos de importância terapêutica, com potencial não apenas para a utilização na medicina natural como também na agricultura natural no controle integrado de pragas e doenças de plantas cultivadas. Muitas espécies de plantas medicinais contêm fenóis, quinonas, saponinas, flavanóides e terpenóides em quantidades apreciáveis de repelir insetos, também exercer atividades antioxidantes, antiinflamatórias, antifúngicas e etc (SILVA & VIZZOTO, 1996). Desta forma, a flora brasileira é alvo de grande interesse pelas indústrias farmacêuticas, na tentativa de descoberta de novos medicamentos para o arsenal terapêutico ou agropecuário. Mas para identificar um composto natural com propriedades biológicas de interesse é necessário investigar as suas propriedades tanto *in vitro* assim como avaliar as suas funções em sistemas biológicos *in vivo*.

O estresse oxidativo contribui para a etiologia de várias doenças degenerativas como isquemia e processos de envelhecimento, então foi sugerido que compostos que eliminem os EROS, seja por ação direta ou indireta, podem prevenir ou ao menos retardar estes processos. A identificação de uma classe de compostos químicos que retardam o envelhecimento em muitas espécies é altamente desejável tanto como instrumento para futuras pesquisas, mas também como potencial terapêutico para retardar as doenças relacionadas à idade.

O açaí (*Euterpe olerace* Mart.) é uma fruta original da Amazônia rica em antioxidantes polifenólicos, flavanóides e antocianinas principalmente cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo (DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2004; SCHAUSS *et al.*, 2006). Vários trabalhos têm demonstrado que açaí tem efeitos antioxidantes tanto *in vitro* (SPADA *et al.*, 2008,) quanto *in vivo* (JENSEN *et al.*, 2008; SPADA *et al.*, 2009, de MOURA *et al.*, 2011) e que esta capacidade antioxidante está associada as suas frações de antocianinas e dos compostos fenólicos totais (SANTOS *et al.*, 2008). Apesar dos vários estudos *in vivo*, apenas um deles demonstrou suas propriedades antioxidantes e pró-longevidade de maneira sistêmica usando a *Drosophila melanogaster*. Nesse contexto, o principal objetivo deste trabalho foi estabelecer o *C. elegans* como modelo para avaliar os efeitos antioxidantes globais do extrato de açaí no *C. elegans*.

5.1.1 Quantificação de Antocianinas nos Extratos de Açaí

Devido à crescente comercialização e ao consumo do extrato de açaí, e à sua constante indicação como fonte de antioxidantes, o primeiro objetivo deste trabalho foi o de quantificar as antocianinas presentes no extrato de açaí de origem industrial por processo de liofilização.

Neste trabalho, o método de pH diferencial foi utilizado para quantificar as antocianinas em dois extratos liofilizados da Liotécnica Alimentos, AL-1 código 120.044.32 e AL-2 código 120.044.022. Como demonstrado na Tabela 1, a concentração de antocianinas monoméricas foram próximos para AL-1 medida com um ano de diferença de 15,8 mg/100 g em 05/03/2010 e 14,6 mg/100 g em 10/04/2011, indicando que as antocianinas neste processamento são estáveis. Apenas a quantidade de antocianinas monoméricas da amostra AL-2 foi superior (34,7 mg/100 mg) em relação a AL-1. Os resultados obtidos neste presente trabalho estão de acordo com dados já publicados na literatura. Teixeira; Estringheta; Oliveira (2008) e Kuskoski *et al.*, (2006) encontraram respectivamente 19,62mg/100g e 22,8mg/100g de antocianinas de várias polpas congeladas. Por outro lado, valores bem mais elevados de 92,8 mg/100 g foi observado por Albarici *et al.*(2007).

Já foi documentada que existe uma grande variação nas concentrações de antocianinas em diferentes extratos de açaí sendo encontrado valores desde 13,75 a 228,77 mg/100 g (COHEN *et al.*, 2006). A justificativa em parte para esta grande variação se deve ao fato das antocianinas serem pigmentos muito instáveis que podem ser degradados durante o processamento e a estocagem. Outros fatores também podem influenciar na composição dos frutos e de sua polpa, como época da safra, tipo de solo, influência das marés, qualidade da água de inundação dos solos, localização espacial. Em síntese, acredita-se que os fatores acima mencionados podem exercer influências sobre a composição dos frutos e da polpa e, portanto sobre a qualidade do produto final comercializado. Tais fatores devem ser responsáveis pela distinção de populações de diferentes procedências, mas não se sabe a real contribuição de cada um (FARIAS NETO *et al.*, 2005). Apesar disto, nossos resultados indicam que a antocianina presente no extrato de açaí liofilizado AL-1 é relativamente estável. Dessa forma seria

interessante não só dosar antocianinas encontradas com a capacidade antioxidante *in vitro* utilizando ensaio de DPPH e TROLOX.

5.1.2 Ensaios Biológicos

O *C. elegans* é um organismo modelo já bem estabelecido para estudos de longevidade assim como para a avaliação dos efeitos biológicos tanto de antioxidantes fitoquímicos (PIETSCH *et al.*, 2009; MENSACK *et al.*, 2010; MATORELL *et al.*, 2011) quanto sintéticos (HOSEGAWA *et al.*, 2010).

Como até o momento, nenhum estudo utilizando açaí foi realizado no *C. elegans*, a primeira etapa do trabalho foi estabelecer as condições ideais para o tratamento do *C. elegans* com este extrato. Inicialmente foram testadas a adição de 100 mg/ml e 200 mg/ml de AL-1 ao meio de cultura *E. coli* que serve como alimento para o nematodo. Foi observado que o desenvolvimento dos animais tratados com 100 mg/ml de AL-1 de L1 até L4 ocorreu normalmente. Por outro lado, o tratamento com 200 mg/ml foi tóxico pois os animais não se desenvolveram e ficaram estacionados no estágio L1. Portanto, todos os experimentos de resistência ao estresse e longevidade realizados para avaliar capacidade antioxidante do AL no *C. elegans* foram feitos usando apenas a concentração de 100mg/ml de extrato.

Spada *et al.* (2008) observaram que o tratamento com 5, 10 e 15% de polpa de açaí em *Saccharomyces cerevisiae* tem um efeito mutagênico devido ao aumento de linhagens mutantes revertentes tratadas em relação ao controle. Apesar disto, os autores sugerem que o risco de efeitos mutagênicos nos seres humanos é baixo, uma vez que as concentrações testadas são muito mais altas do que as usadas no consumo humano (SPADA *et al.*, 2008). Apoiando este argumento, Ribeiro *et al.* (2010), utilizando a contagem de células micronucleadas e ensaio do DNA cometa, não observaram respectivamente nenhum efeito citotóxico ou genotóxico em camundongos tratados com 3,33, 10 ou 16,67 g/Kg peso corporal, doses estas que se aproximam ao consumo de açaí pelo homem.

Para criar as condições de estresse oxidativo, foi utilizado o tert-butil hidroperóxido, um análogo do peróxido de hidrogênio mais estável em meio líquido que ataca proteínas e lipídeos e remove GSH (MATHEWS *et al.*, 1994). Normalmente o

tratamento do *C. elegans* com 5 e 7,5 mM de t-BOOH causa uma redução da sobrevivência dos animais tipo selvagem para cerca de 42% e 21% após 6 a 9 horas respectivamente (Gráfico 1 e 2). Foi observado que o tratamento por 48h com 100 mg/ml dos extratos de açaí liofilizado (AL) aumentou a sobrevivência do *C. elegans* em t-BOOH. O tratamento do *C. elegans* com 100 mg/ml do AL aumentou para quase 75% ($p < 0,05$) a fração de sobreviventes após 9 horas em 5 mM t-BOOH (Gráfico 1A) mas não em 7,5 mM (Gráfico 1B).

Uma variedade de ensaios *in vitro* já mostrou que a polpa de açaí tem uma alta capacidade antioxidante, especialmente contra radicais superóxido e peróxil (SCHAUSS *et al.*, 2006). Dentre os ensaios *in vitro* utilizando culturas de células, Jensen *et al* (2008) observaram que células polimornucleares incubadas com H₂O₂ e tratadas com bebida MonaVie, cujo principal componente é o açaí, tem uma menor produção de ERO. Dentre os estudos *in vivo*, já foram demonstrados que a suplementação da polpa de açaí na dieta melhora o perfil lipídico e os marcadores de estresse oxidativo de ratos hipercolesterolêmicos (SOUZA *et al.*, 2009), aumenta a longevidade de *Drosophila* tratado com dieta hiperlipídica (SUN *et al*, 2010), modula a produção de ERO em neutrófilos e aumenta a produção de GSH no fígado de ratos (GUERRA *et al.*, 2011). Além disso, ensaios clínicos em indivíduos saudáveis mostraram que o consumo de açaí resulta em um aumento significativo da capacidade antioxidante do plasma (JENSEN *et al.*, 2008). Apesar de todos estes dados, o resultado apresentado nesta dissertação é o primeiro que mostra de uma maneira sistêmica que o tratamento com açaí aumenta a sobrevivência de um animal em condições de estresse oxidativo.

Este efeito antioxidante do tratamento de compostos ricos em polifenóis no *C. elegans* também já foi descrito por Pun *et al.* (2009). Neste trabalho, estes pesquisadores observaram que o tratamento com extratos da casca do pinheiro, que é rico em polifenóis e procianidinas, aumenta a resistência do *C. elegans* ao paraquat, herbicida que gera radicais superóxido. Os autores mostraram que estes extratos possuem atividade antioxidante através do ensaio TEAC (Trolox Equivalent. Antioxidant Capacity) e sugerem que o aumento da resistência se deve a capacidade do extrato de pinheiro de remover o OH[·].

Por outro lado, Wilson *et al.* (2006) não observaram nenhuma melhora na sobrevivência do *C. elegans* tratado com extrato de mirtilo quando submetidos a H₂O₂ e paraquat, apesar deste extrato conter uma mistura de vários polifenóis tais como antocianinas, proantocianidinas e ácidos clorogênicos. Neste mesmo trabalho, eles observaram que o extrato de mirtilo aumenta a resistência ao estresse térmico e longevidade do *C. elegans* e que a fração das procianidinas é a responsável por estes efeitos benéficos (WILSON *et al.*, 2006).

Os estudos listados acima sobre açaí nos levam a pensar que o efeito antioxidante do açaí se deve aos seus compostos polifenólicos, especialmente as antocianidinas 3-glicosídeo e 3-rudinosídeo. Entretanto, isto não parece ser exclusivo para os polifenóis uma vez que Wilson *et al.* (2006) não observou o mesmo efeito com extrato de mirtilo. Neste cenário é possível supor que deva existir uma ação sinérgica para proporcionar os efeitos benéficos e/ou para minimizar os efeitos tóxicos ou adversos de constituintes individuais dos extratos de frutas e vegetais (YU *et al.*, 2010). Uma possível resposta a essa questão seria a utilização do corante H2DCF-DA (utilizado para quantificar EROs na célula).

O efeito benéfico do tratamento com 100 mg/ml e tóxico com 200 mg/ml de AL-1 é uma questão bastante interessante que sugere que este possui um efeito do tipo hormético. Hormese ou efeito hormético é o termo utilizado quando uma determinada condição tem efeitos opostos em doses altas e em doses baixas. Já tem sido bastante documentado o efeito hormético de plantas medicinais e de fitoquímicos específicos (RATTNAM, 2006; SON; CAMANDOLA; MATTSON, 2008).

Tem sido sugerido que o mecanismo geral de ação dos fitoquímicos seja através da ativação de vias de resposta celular adaptativa ao estresse. De uma perspectiva evolutiva, as propriedades nocivas de fitoquímicos desempenham um papel importante na dissuasão de insetos e outras pragas fitófagas. No entanto, quando ingerido em doses sub-tóxicas, os fitoquímicos induzem uma resposta celular moderada ao estresse. As vias “horméticas” ativadas por fitoquímicos incluem diferentes quinases e fatores de transcrição que induzem a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes, proteínas chaperonas, fatores neurotróficos e outras proteínas citoprotetoras. Exemplos específicos de tais vias incluem as vias de sinalização de NF-κB, Nrf-2/ARE, FOXO, sirtuinas e outras (RATTNAM, 2006; SON; CAMANDOLA; MATTSON, 2008).

Quando ingeridos polifenóis também podem modular uma variedade de enzimas de respostas a xenobióticas tais com a citocromo P450 (McPHERSON; TINGLE; FERGUSON, 2001). É muito comum a geração de compostos mais tóxicos pela P450 (VERMEULEN, 1996). A produção de tais compostos secundários mais tóxicos poderia explicar estes efeitos deletérios do tratamento com maiores concentrações do extrato de açaí.

Tem sido postulado que compostos que possuem propriedades antioxidantes em sistemas biológicos podem conferir proteção a diferentes condições de estresse. Assim, além da resistência ao estresse oxidativo também foi avaliado se o AL-1 aumenta a resistência ao estresse térmico. O *C. elegans* se desenvolve normalmente em temperaturas de 16°C a 25 °C sendo que a sobrevivência da população começa a declinar rapidamente acima de 25°C. Ensaio de termotolerância em *C. elegans* são realizados com bastante frequência para avaliar o efeito de compostos e extratos de plantas (WILSON et al., 2006; BENEDETTI et al., 2008; KAMPKÖTTER et al., 2007; KAMPKÖTTER et al., 2008; RATTNAM, 2006; SON; CAMANDOLA; MATTSON, 2008; PIETCSH et al., 2009). No presente estudo, o tratamento com 100 mg/ml de AL-1 não aumentou a sobrevivência do *C. elegans* a 35°C. Nenhum trabalho publicado até o momento avaliou o efeito do açaí na resistência ao choque térmico a fim de comparação.

Estes resultados sugerem que o potencial antioxidante do açaí é mais eficiente para proteção contra danos gerados por estresse oxidativo do que térmico. Enquanto que o ERO gerado no estresse oxidativo é capaz de destruir macromoléculas, a resposta celular ao estresse térmico causa primariamente a desnaturação e agregação protéica. Muitos efeitos fenotípicos e morfológicos deste estresse podem ser explicados pela agregação de proteínas e desequilíbrio da homeostase protéica (HASLBECK et al., 2004). Assim, é possível propor que os efeitos do açaí sejam específicos para aliviar a injúria do estresse oxidativo e não do térmico uma vez que os polifenóis são capazes de neutralizar cátions diretamente. Mas ao contrário do nosso resultado, Wilson et al. (2006) observaram que a fração de proantocianidina do extrato de mirtilo aumenta a resistência ao estresse térmico, mas não oxidativo, do *C. elegans*.

Os efeitos benéficos de compostos polifenólicos de frutas e vegetais são principalmente extrapolados a partir de estudos *in vitro* ou *in vivo* de suplementação

dietética de curta duração. Devido ao custo e duração, relativamente pouco se conhece se os polifenóis dietéticos são benéficos de uma forma sistêmica para os seres vivos, particularmente em respeito à longevidade.

Neste sentido, o *C. elegans* é um excelente modelo para ensaios de longevidade, pois além da alta homologia com genoma de mamíferos, experimentos de longevidade podem ser realizados em algumas semanas a baixo custo. Neste trabalho, o *C. elegans* foi tratado com 100 mg/ml de AL-1 por todo seu tempo de vida a partir do estágio L1. Mas não foi observado um aumento da longevidade, nem no tempo de vida médio e máximo do *C. elegans* tratado com AL-1 em relação ao controle (Gráfico 3).

Até o presente, apenas um artigo na literatura investigou o efeito do açaí na longevidade que foi realizado na *Drosophila melanogaster*. Assim como observado nesta dissertação, a suplementação de 2% do extrato de açaí na dieta padrão da *Drosophila* não promoveu um aumento da longevidade delas (SUN *et al.*, 2010). Entretanto, moscas fêmeas alimentadas com uma dieta hiperlipídicas e com 2% do extrato de açaí tiveram um aumento do seu tempo de vida médio (SUN *et al.*, 2010).

Esta ausência de efeito pró-longevidade com a suplementação do açaí na dieta padrão se parece com a do resveratrol, um composto polifenólico abundante na uva. Já foi documentado que a suplementação com o resveratrol não aumentou a longevidade da *Drosophila*, do *C. elegans* (BASS *et al.*, 2007) e nem do camundongo (BAUR *et al.*, 2006) submetidos a dietas padrão. Entretanto, o resveratrol prolonga a longevidade de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (BAUR *et al.*, 2006). Apesar de não aumentar a longevidade dos camundongos com dieta padrão, o resveratrol parece melhorar a saúde de maneira geral, pois foi observado um efeito benéfico nas funções cognitivas destes camundongos (PERSON *et al.*, 2008).

Por outro lado, vários trabalhos têm descrito que extratos de plantas ricos em polifenóis, tais como mirtilo (WILSON *et al.*, 2006), casca de pinheiro (PUN *et al.*, 2009) e maçã (SUNAGAWA *et al.*, 2010) são capazes de aumentar a longevidade do *C. elegans*. Extrato de mirtilo aumentou o tempo de vida médio do *C. elegans* em 28%. Este tratamento também retardou o declínio de várias funções relacionadas ao envelhecimento tais como batimento faríngeo e acúmulo de lipofuscina (WILSON *et al.*, 2006). Os efeitos pró-longevidade assim como o aumento da termotolerância foram atribuídos a fração de procianidinas do extrato de mirtilo (WILSON *et al.*, 2006). A

casca de pinheiro, além de aumentar a resistência ao estresse oxidativo, aumentou o tempo de vida médio e máximo do *C. elegans* (PUN *et al.*, 2009). Sunagawa *et al.* (2010) observaram que os polifenóis e as procianidinas da maçã são capazes de aumentar o tempo de vida médio em 12,0 e 12,1% respectivamente. Entretanto o tratamento do *C. elegans* com a (-)-epicatequina, uma das principais procianidina da maçã, não teve nenhum efeito na longevidade dos animais (SUNAGAWA *et al.*, 2010).

Esta variabilidade dos efeitos dos extratos de plantas ricos em polifenóis na modulação da longevidade do *C. elegans* chama a atenção por dois pontos. O primeiro é de que a atribuição de atividade antioxidante *in vitro* a estes extratos não necessariamente irá ter efeitos biológicos *in vivo*. Na verdade muitos antioxidantes *in vitro* mostram pouca ou nenhuma capacidade antioxidante *in vivo* (GRUBER *et al.*, 2009; PUN *et al.*, 2009). O segundo ponto é de que a presença de outros componentes nos extratos de plantas deve exercer uma influência nos efeitos benéficos sobre as diferentes funções biológicas (YU *et al.*, 2010).

5.1.3 Dosagens Bioquímicas

Baixos e constantes níveis de EROS são indispensáveis em muitos processos bioquímicos, incluindo apoptose celular (GHOSH & MYERS, 1998). Em contraste, altas concentrações ou inadequada remoção de EROS resultam em um quadro de estresse oxidativo, o qual pode gerar danos a macromoléculas biológicas e severos distúrbios metabólicos. Para que se predomine o equilíbrio homeostático e as funções biológicas sejam preservadas, é indispensável que organismo controle a presença de ambos, oxidantes e antioxidantes, continuamente. Os sistemas biológicos desenvolveram a capacidade de promover resposta adaptativa que podem compensar o estresse oxidativo, como por exemplo, um sistema antioxidante altamente complexo, que envolve uma variedade de componentes endógenos e exógenos com a função de neutralizar espécies reativas de oxigênio (SIES,1993).

Pelo fato do AL ter propiciado um significativo efeito antioxidante *in vivo* no *C. elegans*, foi avaliado também seu efeito sobre a atividade de sulfidrilas totais, catalase e de proteína carbonilada .

A enzima catalase participa do sistema endógeno de defesa antioxidante, sendo responsável, em conjunto com a enzima superóxido dismutase, pela neutralização de radicais superóxido, nocivos ao organismo, transformando-os em água e oxigênio molecular (SCHAUSS, 2006). A análise da atividade da catalase *in vivo* no *C. elegans* mostrou que o tratamento com AL-1 não causou nenhuma alteração em relação aos animais não tratados. Estes resultados foram semelhantes aos resultados observados *in vivo* por Guerra *et al.* (2011) e de Souza *et al.* (2010). Nestes trabalhos, a suplementação de 2% de açaí na dieta normal de ratos não alterou significativamente os níveis de atividade da catalase. Spada *et al.* (2009) também não observaram nenhuma diferença estatística na atividade da catalase nos tecidos do cortex cerebral, hipocampo e cerebelo de ratos tratados *ex vivo* com açaí.

Além da análise das atividades da catalase como um marcador antioxidante, foram também analisados os níveis de sulfidrilas totais e proteína carbonilada como marcadores de estresse oxidativo no *C. elegans*. Os radicais sulfidrilas representam todos os grupos tióis encontrados na glutatona, em proteínas e em compostos de baixo peso molecular. Os tióis podem ser oxidados quando o estresse oxidativo está elevado, tendo assim seus níveis diminuídos (WISDOM *et al.*.,1991). Já os grupos carbonílicos representam o dano oxidativo às proteínas, podendo constituir análise do estado oxidativo do organismo. O tratamento com 100 mg/ml de AL-1 não proporcionou alterações significantes para ambos os parâmetros. Spada *et al.* (2009) também relatou que o tratamento *ex vivo* com 40% de açaí nos homogenatos do tecido nervoso não alterou os níveis de proteína carbonilada. Por outro lado, Guerra *et al.* (2011) e de Souza *et al.* (2010) observaram uma redução significativa de proteína carbonilada e aumento de grupos SH totais ou GSH no fígado de ratos suplementados com 2% de açaí na dieta normal.

A capacidade de extratos de plantas em alterar marcadores de estresse oxidativo é bastante variável na literatura. Por exemplo, Pun *et al.* (2009) observaram que diferentes extratos de plantas com comprovada capacidade antioxidante *in vitro* foram capazes tanto de aumentar quanto diminuir os níveis de proteína carbonilada no *C. elegans*.

Em nossa opinião, a justificativa para não ter sido observada quaisquer variações nestas dosagens é porque o açaí não altera a homeostase do animal crescendo em condições normais, porém este mesmo tratamento é capaz de aumentar a defesa

oxidante do animal perante a um desafio tal como com t-BOOH. Uma proposta interessante para confirmar esta hipótese seria tratar previamente o *C. elegans* com açaí e então submetê-los a uma condição de estresse para então realizar as dosagens bioquímicas. Se o tratamento com açaí tiver algum efeito nos marcadores bioquímicos, poderia ser esperado um aumento dos níveis de sulfidrilas totais e reduzisse os níveis de proteína carbonilada em comparação aos animais somente submetidos ao estresse oxidativo.

Dentro desta linha de raciocínio, vários trabalhos já demonstraram que a suplementação de açaí associada a uma condição de estresse é capaz de melhorar vários marcadores bioquímicos. Spada *et al.* (2009) observaram que no homogenato do córtex cerebral, hipocampo e cerebelo de ratos tratados com H₂O₂ a atividade de SOD, CAT e os níveis de proteína carbonilada estão aumentados e quando são tratados previamente com a polpa do açaí os valores encontrados retornam para níveis semelhantes ao do grupo controle. De Moura *et al.* (2011) mostraram que a quantidade de GSH no pulmão de camundongos com efisema pulmonar é reduzida em relação ao controle e que a ingestão de fumaça de cigarro associada com açaí retorna os níveis de GSH semelhante ao grupo controle. De Souza *et al.* (2010) relata que a suplementação de 2% de açaí na dieta hipercolesterolêmica reduz os níveis de proteína carbonilada e aumenta os níveis de sulfidrilas totais no fígado de ratos quando comparados com aqueles submetidos a dieta hipercolesterolêmica. Guerra *et al.* (2011) também observaram uma redução dos níveis de proteína carbonilada no fígado de ratos diabéticos tratados com 2% de açaí em relação ao grupo de ratos diabéticos. Finalmente, Sun *et al.* (2010) mostraram que moscas crescidas em dietas hiperlipídicas e suplementadas com açaí tem um tempo de vida médio maior que as moscas alimentadas somente com a dieta hiperlipídica.

5.2 POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO DO EXTRATO DE AÇAÍ

As propriedades biológicas de extratos de plantas e flavonóides têm sido intensamente investigadas *in vitro* e em sistemas *ex vivo* e *in vivo* de mamíferos. Estes compostos e extratos podem agir como anti- ou pró-oxidantes influenciando o sistema redox celular e/ou modulando vias de sinalização (WILLIAMS *et al.* 2004). Por esta razão, os mecanismos de sua ação biológica ainda são objetos de intensa investigação. Neste sentido, o *C. elegans* é um excelente modelo não só para determinar o potencial protetor dos flavonóides e extratos vegetais, bem como para investigar os mecanismos moleculares da sua ação (WU *et al.*, 2002; SMITH; LUO, 2003, 2004, GUTIERREZ-ZEPEDA *et al.*, 2005, BROWN; EVANS; LUO, 2006, WILSON *et al.*, 2006; KAMPKÖTTER *et al.*, 2007).

No presente estudo, foi mostrado que o tratamento de *C. elegans* com AL aumentou a sua sobrevivência em estresse oxidativo, porém sem aumentar a resistência em condições de estresse térmico e em condições normais. Considerando que os antioxidantes podem atuar diretamente devido a sua capacidade de captar radicais das substâncias ou indiretamente através da modulação de diferentes vias de sinalização levando a um aumento da resistência ao estresse oxidativo, este trabalho se propôs também a tentar elucidar o possível mecanismo de ação da atividade protetora do AL. Em *C. elegans* dois fatores de transcrição, DAF-16 e SKN-1, promovem a expressão de enzimas antioxidantes ou de detoxificação.

5.2.1 A Via de Sinalização SKN-1/p38 MAPK

No *C. elegans*, a conservada via de sinalização SKN-1/p38 MAPK é responsável pela ativação de genes de Fase II de detoxificação durante estresse oxidativo e na regulação da longevidade em condições normais, de restrição calórica e de sinalização reduzida da insulina (TULLET *et al.*, 2009).

Para investigar se o aumento da resistência ao estresse observado no *C. elegans* tratado com AL foi dependente da via de SKN-1/p38 MAPK, os ensaios de resistência ao estresse oxidativo foram repetidos usando os mutantes *skn-1(RNAi)* e *sek-1(km4)* (Gráficos 5 e 6). Os resultados obtidos com os mutantes *skn-1(RNAi)* foram

inconclusivos. Apesar deste experimento ter sido realizados várias vezes, em nenhuma delas o tratamento com açai aumentou a sobrevivência em condições de estresse do grupo controle (Gráfico 5). Uma possível razão de não se observar o efeito protetor do açai neste experimento pode ser devido ao procedimento de RNAi. Nos experimentos de RNAi, foi utilizada a linhagem de *E. coli* HT115 enquanto que nos outros experimentos os *C. elegans* foram crescidos na linhagem OP50. Já foi descrito que a linhagem HT115 é menos patogênica para o *C. elegans* (PARTRIDGE & GEMS, 2007; SHUHEISO *et al.*, 2011). O crescimento do *C. elegans* em uma bactéria menos patogênica pode estabelecer um novo estado de homeostase no animal e assim, o aumento da resistência ao estresse observado nos animais mantidos em OP50 não é mais observado nos animais mantidos em HT115. Para elucidar esta questão é importante repetir estes experimentos com o mutante de deleção *skn-1(zu67)* que são mantidos em OP50 para comparar os resultados.

Os resultados de resistência ao estresse oxidativo obtidos com os mutantes *sek-1(km4)* mostraram que os mutantes tratados não tiveram a sobrevivência aumentada (Gráfico 6). Este resultado sugere que o aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido por AL depende da ativação da via p38 MAPK. Estes dados são ainda muito preliminares, pois ainda falta realizar outros experimentos para corroborar este dado. Entre os experimentos que pretendemos realizar está a análise da resistência ao estresse oxidativo com o mutante *skn-1*, análise da localização nuclear da linhagem transgênica *SKN-1B/C::GFP*, e a análise da ativação da expressão de genes regulados por SKN-1 tais como *gcs-1* e *gst-4*.

5.2.2 A Via de Sinalização de DAF-16

O fator de transcrição DAF-16/FoxO ativa a expressão de genes que aumentam a longevidade e a resistência ao estresse (MURPHY *et al.*, 2003).

Para investigar se o aumento da resistência ao estresse observado no *C. elegans* tratado com AL ativa a via de DAF-16/FoxO, os ensaios de resistência ao estresse oxidativo foram repetidos usando o mutante de deleção *daf-16(mgDf47)*. Os resultados obtidos indicam que o aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido pelo com AL depende de DAF-16 (Gráfico 7).

Outra estratégia utilizada para verificar o envolvimento de DAF-16 foi através da análise da localização nuclear da linhagem transgênica *DAF-16::GFP* tratada com AL. Apesar da resistência ao estresse oxidativo parecer depender de DAF-16, não foi observada a indução de *DAF-16::GFP* com o tratamento de AL-1. Uma explicação para os resultados aparentemente contraditórios pode ser devido ao tempo usado para analisar este transgênico não ter sido o mais adequado, 48 horas desde o estágio L1. Vários autores analisaram a localização subcelular de *DAF-16::GFP* apenas após 1 a 24 horas após a indução (PRZYBYSZ *et al.*, 2009; POWOLNY *et al.*, 2011). Já foi demonstrado que a quercetina é capaz de aumentar a localização nuclear de *DAF-16::GFP* após 72 horas com o tratamento de quercetina (KAMPKÖTTER *et al.*, 2007; KAMPKÖTTER *et al.*, 2008). Além disso, alguns autores têm sugerido que fatores de transcrição podem ter sua atividade modulada, mas sem necessariamente aumentar a sua concentração no núcleo (WANG *et al.*, 2010). Outra possível explicação pode ser devido à dependência de co-fatores necessários a ação de fatores de transcrição. Já foi demonstrado que a translocação de DAF-16 pode não ser efetiva se cofatores nucleares estiverem faltando (HENDERSON; BONAFÈ; JOHNSON, 2006).

Da mesma maneira que foi sugerido para investigar o envolvimento de SKN-1 no tratamento com AL, é importante também avaliar a indução de genes efetores de DAF-16 para corroborar os resultados. Sun *et al.* (2010) observaram que o tratamento com açaí aumentou a expressão do gene *l(2)elf*, que codifica uma proteína de heat shock e dois genes de detoxificação *gstd1* e *mtnA* e diminuiu a expressão do gene para piruvato carboxiquinase *pepck* da via da gliconeogênese. Wilson *et al.* (2006) mostraram que o extrato de mirtilo além de retardar o declínio de várias funções relacionadas ao envelhecimento também impediu o aumento da expressão de genes para proteínas heat shock e aumentou a longevidade do *C. elegans*. O aumento da longevidade induzida pelo extrato de mirtilo parece depender via de sinalização da proteína quinase dependente de Ca(+2)-Calmodulina (CaMKII), que é importante para a resistência ao estresse osmótico (WILSON *et al.*, 2006).

Alimentos funcionais são um dos segmentos que mais crescem dentro da indústria de alimentos. Este mercado é movido pelo aumento do tempo de vida da população, aumento do custo de assistência á saúde, avanços tecnológicos na produção de alimentos e consciência dos benefícios de uma dieta saudável. Apesar do

desenvolvimento de drogas e fármacos ser necessário para tratar problemas de saúde específicos, a intervenção nutricional através de alimentos funcionais pode ser uma maneira efetiva de melhorar a qualidade de vida. Conseqüentemente, estudos sobre ingredientes alimentares com propriedades antioxidantes é de grande interesse. Assim, é importante avaliar estas propriedades em sistemas biológicos *in vivo*. O *C. elegans* se tornou um organismo modelo central na pesquisa de longevidade e estresse oxidativo. Os motivos que levaram a isto se devem ao fato de ser um organismo multicelular com o genoma já completamente seqüenciado e possuir vias de metabólicas conservadas entre mamíferos, o que permite explorar os mecanismos genéticos que controlam a longevidade e resistência ao estresse. Neste contexto, este trabalho destaca-se por ser o primeiro a avaliar as propriedades antioxidantes do açaí através da abordagem global dos seus efeitos em organismo como um todo mostrando que este aumenta a resistência ao estresse oxidativo e que é possivelmente através de SKN-1 e DAF-16.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

- O extrato de açaí industrializado liofilizado (AL) apresenta quantidades de anoticianinas comparável com já publicados
- O crescimento do *C. elegans* em 200 mg/ml de AL foi tóxico enquanto que o tratamento com 100 mg/ml permitiu o desenvolvimento normal.
- O tratamento do *C. elegans* com 100 mg/ml de AL aumenta a resistência ao estresse oxidativo,
- O tratamento do com 100 mg/ml de AL não aumenta a sobrevivência do *C. elegans* nem condições de estresse térmico e nem em condições normais.
- O aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido pelo AL foi dependente das vias de sinalização p38 e DAF-16, uma vez que o tratamento com AL não aumentou a sobrevivência dos mutantes *sek-1* e *daf-16* em condições de estresse oxidativo.
- As análises dos genes repórteres *DAF-16::GFP* realizadas até o momento não corroboraram estas observações.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content and metabolism. **Nutrition**, v. 18, p. 75-81, 2002.

ALBARICI, T.R.; VALETA, A.C. Efeitos da temperatura nas antocianinas do açaí. **Comunicado técnico**, p. 1517-4786, 2007.

AN, J.H. *et al.* Regulation of the *Caenorhabditis elegans* oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3. **Proceedings of the National Academic of Science**, v. 102, p. 16275-16280, 2005.

AN, J.H.; BLACKWELL, T.K. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. **Genes & Development**, v. 17, p. 1882-1893, 2003.

BASS, T. M. *et al.* Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, n. 10, p. 546-552, 2007.

Baur, J.A. *et al.* Resveratrol improves health and survival of mice on a high calorie diet. *Nature*, v. 444, n. 7117, p. 337-42, 2006.

BENEDETTI, M.G. *et al.* Compounds that confer thermal stress resistance and extended lifespan. **Experimental Gerontology**. v. 43, p. 882-891, 2008.

BISHOP, N.A, GUARENTE,L. Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. **Nature**, v. 447, p. 545-549, 2007.

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

BROWN, M. K.; EVANS, J. L.; LUO, Y. Beneficial effects of natural antioxidants EGCG and [alpha]-lipoic acid on life span and age-dependent behavioral declines in *Caenorhabditis elegans*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 3, p. 620-628, 2006.

Chan, K., X. D. Han, et al. (2001). An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 8, p. 4611-6, 2001.

CHOE, K.P.; PRZYBYSZ, A.J.; STRANGE, K. The WD40 repeat protein WDR-23 functions with the CUL4/DDB1 ubiquitin ligase to regulate nuclear abundance and activity of SKN-1 *Caenorhabditis elegans*. **Mol Cell Biol**, v. 29, n. 10, p. 2704-15, 2009.

CHOI, S.K. *et al.* Promotion of Met-tRNAⁱMet binding to ribosomes by yIF2, a bacterial IF2 homolog in yeast. **Science**, v. 280, p. 1757–1760, 1998.

COHEN, K.O.; MONTE, D.C. “Quantificação do teor de antocianinas totais da polpa de açaí de diferentes populações de açaizeiro”. Embrapa Amazônia Oriental. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 60, p. 1517-2228, 2006.

COOKE, M.S.*et al.* "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease." **Faseb Journal**, v. 17, n. 10, p. 1195-214, 2003.

DEL POZO-INSFRAN, D., C. H. Brenes, et al. "Phytochemical composition and pigment stability of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.)." **J Agric Food Chem.** v. 52, n.6, p. 1539-45, 2004.

DEL POZO-INSFRAN, D., S. S. Percival, et al. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. **J Agric Food Chem.** v.54, n. 4, p. 1222-9. 2006.

Ding, M., Shi, X, *et al* “Cyanidin-3-glucoside, a Natural Product Derived from Blackberry, Exhibits Chemopreventive and Chemotherapeutic Activity”. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 25, p. 17359-68, 2006.

DINKOVA-KOSTOVA, A.T. *et al.* Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. **Proceedings of the National Academic of Science**, v. 99, p. 11908–11913, 2002.

DINKOVA-KOSTOVA, A.T. *et al.* Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 4584-9, 2005.

ENIO, C.V. Alimentos Funcionais. **Revista de Medicina de Minas Gerais**, v. 13, n. 4, p. 260-262, 2003.

GUERRA, J.F.C. *et al.* Dietary açaí modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. **J Clin Biochem Nutr**, v.49, n X p. 1-7, 2011.

FARIAS NETO, J.T.de. *et al.* Variabilidade genética em progênes jovens de açaizeiro. **Cerne**. v. 11, n.4, p. 336-41, 2005.

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

FORSBERG, H. *et al.* The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids. **Molecular Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 215-228, 2001.

GHOSH, J.; MYERS CE. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 95, n. 22, p. 13182-7, 1998

GRIFFITHS, M.M.; WILLIAMS JR., R.C. In vitro peripheral blood and synovial fluid lymphocyte interactions. **Arthritis and Rheumatism**, 2005.

GRUBER, J. *et al.* Deceptively simple but simply deceptive - *Caenorhabditis elegans* lifespan studies: Considerations for aging and antioxidant effects. **FEBS Letters**, v. 583, n. 21, p. 3377-3387, 2009.

GUTIERREZ-ZEPEDA, A. *et al.* Soy isoflavone glycitein protects against beta amyloid-induced toxicity and oxidative stress in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **BMC Neuroscience**, v. 25, n. 6, p. 54, 2005.

HASLBECK, M. *et al.* Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**, v. 23, n. 3, p. 638-649, 2004.

HASEGAWA K, MIWA J. Genetic and cellular characterization of *Caenorhabditis elegans* mutants abnormal in the regulation of many phase II enzymes. *Plos one*, v. 5, n. 6, p.1-10, 2010.

HAYES, M. *et al.* The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. **Cancer Research**, v. 61, n. 8, p. 3299-307, 2001.

HENDERSON, S. T.; JOHNSON, T. E. daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Current Biology**, v. 11, n. 24, p. 1975-1980, 2001.

HENDERSON, S.T.; BONAFÈ, M.; JOHNSON, T.E. daf-16 protects the nematode *Caenorhabditis elegans* during food deprivation. **Journal of Gerontology**, v. 61, n. 5, p. 444-60, 2006.

HOGAN, S. *et al.* Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from Açai. **Food Chemistry**, v. 118, p. 208-214. cccccc2010

1 HONDA, Y.; HONDA, S. The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. **The FASEB Journal**, v. 13, p. 1385-1393, 1999.

HU, R. *et al.* Identification of Nrf2-regulated genes induced by chemopreventive isothiocyanate PEITC by oligonucleotide microarray. **Life Science**, v. 79, p. 1944-1955, 2006.

Itoh, K., T. Chiba, *et al.* . "An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements." **Biochem Biophys Res Commun**, v.236, n. 2, p. 313-22, 1997.

Itoh, K., N. Wakabayashi, *et al.* Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. **Genes Dev**, v. 13, n. 1, 76-86, 1999.

INOUE, H. *et al.* The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. **Genes and Development**, v. 19, p. 2278-2283, 2005.

JENSEN, G.S. *et al.* Pain Reduction and Improvement in Range of Motion After Daily Consumption of an Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Pulp-Fortified Polyphenolic-Rich Fruit and Berry Juice Blend. **J Med Food**, v. XX, n. X, p. 1-10, 2011

JENSEN, G.S. *et al.* In Vitro and in Vivo Antioxidant and Anti-inflammatory Capacities of an Antioxidant-Rich Fruit and Berry Juice Blend. Results of a Pilot and Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled, Crossover Study, **J. Agric. Food Chem**, v. 56, n. 18, p. 8326–8333, 2008.

JUGE, N.; MITHEN, R.F.; TRAKA, M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 9, p. 1105–1127, 2007.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 387-399, 2006.

KAMATH, R.S. *et al.* Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested doublestranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Genome Biology**, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2001.

KAMPKÖTTER, A. *et al.* Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 149, n. 2, p. 314-323, 2008.

KAMPKÖTTER, A. *et al.* The Ginkgo biloba extract EGb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans*. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 139-147, 2007.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; MORALES, M.T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p 1283-1287, 2006.

KUNDU, J.; SURH, Y.-J. Nrf2-Keap1 Signaling as a Potential Target for Chemoprevention of Inflammation-Associated Carcinogenesis. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 6, p. 999-1013, 2010.

KLUTH, D., A. *et al.* "Modulation of pregnane X receptor- and electrophile responsive element-mediated gene expression by dietary polyphenolic compounds. **Free Radic Biol Med**, v. 42, n3, p.315-25.2007.

LANDIS, J.N.; MURPHY, C.T. Integratqwtion of diverse inputs in the regulation of *Caenorhabditis elegans* DAF-16/FOXO. **Developmental Dynamics**, [v. 239](#), n. 5, p. 1405-12, 2010.

LEE, J.M. *et al.* Identification of the NFE2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 12029-12038, 2003.

LEVINE, R.L. *et al.* Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 346-356, 1994.

Leung, L., M. Kwong, *et al.* Deficiency of the Nrf1 and Nrf2 transcription factors results in early embryonic lethality and severe oxidative stress." **J Biol Chem**, v. 278, n. 48, p. 48021-9.2003.

LICHTENTHALER, R. *et al.* Total oxidant scaveng capacities of *Euterper oleracea* Mart. (Açaí) fruits. *Int J Food Sci Nutri*, v. 56, n. 1, p. 53-56, 2005.

2 LITHGOW, G.J. *et al.* Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. **Proceedings of the National Academic of Science**, v. 92, n. 16, p. 7540-4, 1995.

LOWRY, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, [v. 193](#), p. 265-275, 1951.

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

Manela-Azulay, M. *et al.* Vitamina C. **An bras Dermatol**, v.78, n.3, p.265-274, 2003.

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability, **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727–747, 2004.

MARTORELL P. *et al.* Use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as model organisms to study the effect of cocoa polyphenols in the resistance to oxidative stress. **J Agric Food Chem**. v. 59, n. 5, p. 2077-85, 2011

MATIAS, G.S. *et al.* Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). **ALAN**, vol.58, no.2, p.187-192. 2008

MATHEWS W.R. *et al.* Lipid peroxidation as molecular mechanism of liver cell injury during reperfusion after ischemia. **Free Radic Biol Med**. V. 16, n. 6, p.763-70, 1994.

MASELLA, R. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 577-586, 2005.

MENEZES, E.M.S.; TORRES. A.T.; SRUR. A.U.S. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. **Acta Amazonica**, v. 38, n.2, p. 311-316, 2008.

MENZEL, R., M. Rodel, "CYP35: xenobiotically induced gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*." **Arch Biochem Biophys**. v. 438, n.1, p. 93-102, 2005.

MENSACK.M.M. *et al.* Characterization of low molecular weight chemical fractions of dry bean (*Phaseolus vulgaris*) for bioactivity using *Caenorhabditis elegans* longevity and metabolite fingerprinting. **J Agric Food Chem**, v. 58, n.11, p. 6697-705, 2010.

MERTENS-TALCOTT, U.S. *et al.* Pharmacokinetics of Anthocyanins and Antioxidant Effects after the Consumption of Anthocyanin-Rich Açai Juice and Pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in Human Healthy Volunteers. **J. Agric. Food Chem**, v. 56, n. 17, p. 7796–7802, 2008.

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

McCORD, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 108, p. 652– 659, 2000.

McPHERSON, R.A.; TINGLE, M.D.; FERGUSON, L.R. Contrasting effects of acute and chronic dietary exposure to 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline (IQ) on xenobiotic metabolising enzymes in the male Fischer 344 rat: implications for chemoprevention studies. **European Journal of Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 39-47, 2001.

MOSKAUG *et al.* Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, p. 315-324, 2004.

MOURA, R.S. *et al.* Addition of açaí (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. **Food and Chemical Toxicology**, p. 2-9, 2011.

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

NORATTO, G.D. *et al.* Polyphenolics from Açai (*Euterpe oleracea*. Mart.) and RED Muscadine Grape (*Vitis rotundifolia*) Protect Human Umbilical Vascular Endothelial Cells (HUVEC) from Glucose and Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation and Target MicroRNA-126. **J Agric Food Chem** 2011

OKUYAMA, T. *et al.* The ERK-MAPK pathway regulates longevity through SKN-1 and insulin-like signaling in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*, v. 285, n. 39, p. 30274-81, 2010.

OLIVEIRA, *et al.* Effects of an extract obtained from *Euterpe oleracea* Mart. In the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 56, n. 6, p. 619-26, 2010.

OLIVEIRA, R. P. *et al.* Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Ageing Cell*, v. 8, p. 524–541, 2009.

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

PACHECO-PALENCIA, L. A.; MERTES-TALCOTT.S.; TALCOTE, S. T. Chemical composition, properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil Acai (*Euterpe oleracea* Mart). *J Agric Food Chem*, v. 56. N. 12, p. 4631-6, 2008.

PARTRIDGE.; L, GEMS D. Benchmarks for ageing studies. *Nature*, v. 450, p. 165-167, 2007.

PÉREZ. V *et al.* Is the Oxidative Stress Theory of Aging Dead?. *Biochim Biophys Acta*, n. 1790, v. 10, p. 1005–1014, 2009.

PIETSCH, K. Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology*, v. 10, p. 565-578, 2009.

POWOLNY, A.A. *et al.* The garlic constituent diallyl trisulfide increases the lifespan of *C. elegans* via skn-1 activation. *Experimental Gerontology*, v. 46, n. 6, p. 441-52, 2011.

PRZYBYSZ, A.J. *et al.* Increased age reduces DAF-16 and SKN-1 signaling and the hormetic response of *Caenorhabditis elegans* to the xenobiotic juglone. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 130, n. 6, p. 357-69, 2009.

PUN, P.B. *et al.* Ageing in nematodes: do antioxidants extend lifespan in *Caenorhabditis elegans*?. *Biogerontology*. v. 11, n. 1, p. 17-30, 2009.

RAMOS-GOMEZ, M. *et al.* Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice, *Proceedings of the National Academic of Science*, v. 98, p. 3410–3415, 2001.

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

RIBEIRO, J.C. *et al.* Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the

erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutation Research*, v. 695, p22-28, 2010

SARKADI, B. *et al.* Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoprotection defense system. ***Physiological Reviews***, v. 86, p. 1179-1236, 2006.

SANTOS, G.M. *et al.* Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). ***Archivos Latinoamericanos de Nutricion***, v. 58, n. 2, p187-192, 2008.

SCHAUSS, A. *et al.* Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart.(Acai). ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 54, n. 22, p. 8604-10, 2006.

SCHROECKSNADEL, K. *et al.* Tryptophan degradation increases with stage in patients with rheumatoid arthritis. ***Clinical Rheumatology***, v. 25, p. 334–337, 2006.

SEDLAAK, J.; LINDSAY, R.H. *et al.* Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, v. 25, n.1, p. 192-205, 1968.

SHARONI, Y. *et al.* Carotenoids and transcription. ***Archives of Biochemistry and Biophysics***, v. 430, p. 89-96, 2004.

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

SILVA JR., A.A.; VIZZOTTO, V.J. Plantas medicinais, aromáticas e fitoprotetoras. ***Agropecuária Catarinense***, v.9, n.1, p.5-8, 1996.

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

SON, T.G.; CAMANDOLA, S.; MATTSON, M.P. Hormetic Dietary Phytochemicals. ***NeuroMolecular Medicine***, v. 10, p. 236–246, 2008.

SOUZA, M.O. *et al.* Diet supplementation with acai(*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. ***Nutrition***. v. 26, n 7-8, p. 804-10, 2009.

SUN, X. *et al.* "Açaí palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet". ***Exp. Gerontol***, v. 45, n. 3, p. 243-51, 2010.

SPADA, P.D. *et al.* Frozen fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats. ***Journal of Medicinal Food***, v. 12, n. 5, p. 1084-1088, 2009.

SPADA, P.D. *et al.* Antioxidant, Mutagenic, and Antimutagenic Activity of Frozen Fruits. **Journal of Medicinal Food**. v. 11, n. 1, p. 144-151, 2008.

SPORN, M. B. and K. T. Liby. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. **Nat Clin Pract Oncol**. v.2, n.10, p. 518-25. 2005.

SUNAGAWA, T. *et al.* Procyanidins from Apples (*Malus pumila* Mill.) Extend the Lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Biol and Pharmacological**, v.77, n. 2, p. 122-127,2011

TEIXEIRA , L.N; STRIGHETA, P.C; OLIVEIRA, F.A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. Revista Ceres, v. 55, n. 4, p. 297-304, 2008.

TULLET, J.M. *et al.* Direct inhibition of the longevity-promoting factor skn-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. **Cell biology**, v. 132, p. 1025-1038, 2008.

VANFLETEREN, J.R.; DE VREESE, A. The gerontogenes age-1 and daf-2 determine metabolic rate potential in aging *Caenorhabditis elegans*. **FASEB Journal**, v. 9, p. 1355-1361, 1995.

VERMEULEN, P.B. *et al.* Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. **European Journal of Cancer**, v. 32A, n. 14, p. 2474-84, 1996.

VISWANATHAN, M. *et al.* A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span. **Developmental Cell**, v. 9, p. 605-615, 2005.

WALKER, A.K. *et al.* A conserved transcription motif suggesting functional parallels between *C. elegans* SKN-1 and Cap 'n' Collar-related bZIP proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 22166-22171, 2000.

WANG. J. *et al.* RNAi screening implicates a SKN-1-dependent transcriptional response in stress resistance and longevity deriving from translation inhibition. **PLoS Genet**, v. 6, n. 8, p.1-17, 2010

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 7, p. 838-849, 2004.

WISDOM. S.J.; WILSON. R.; MCKILLOP, J.H.; WALKER J.J. Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. **J**, v. 165, n. 6, p. 1701-4, 1991

WU, J. *et al.* Effects of the narrow band gap on the properties of InN. **Physical Review**, v. 66, n. 2002.

UDANI, J.K.; SINGH, B.B.; SINGH, V.J.; BARRETT. M.L. Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: A pilot study. **Nutrition Journal**, v. 10, n. 45, p. 1-7, 2011.

YEN, K.; NARASIMHAN, S.D.; TISSENBAUM, H.A. DAF-16/Forkhead box O transcription factor: many paths to a single Fork(head) in the road. **Antioxidants e Redox Signaling**, v. 14, n. 4, p. 623-34, 2011.

YOU, Y. *et al.* Insulin, cGMP, and TGF- β Signal Regulate Food Intake and Quiescence in *C. elegans*: A Model for Satiety. **Cell metabolism**, v. 7, n. 3, 249-257, 2008.

YU, Y. *et al.* Cinnamomum cassia Bark in Two Herbal Formulas Increases Life Span in *Caenorhabditis elegans* via Insulin Signaling and Stress Response Pathways. **Plos one**, v. 5, n. 2, p. 1-10, 2010.

ZIPPER, L. M. AND R. T. MULCAHY. The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm." **J Biol Chem**, v.277, n.39, p 36544-52. 2002.